Российская академия наук

Федеральное агентство научных организаций

ФГБУН «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН»

ФБГУН Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина Российской академии наук

ГНУ "Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси"

ФБГУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук

ГБУ «Волгоградский региональный ботанический сад»

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

УДК 504.73:57.085.2
М 67

Печатается по постановлению Ученого совета ФГБУН «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН» № 14 от «17» июня 2016 г.

Оргкомитет конференции

Председатель оргкомитета: д.б.н. **И.В. Митрофанова**, заведующая отделом биологии развития растений, биотехнологии и биобезопасности ФГБУН «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН».

Сопредседатели: член-кор. РАН, д.б.н. **В.А. Багиров**, начальник Управления координации и обеспечения деятельности организаций в сфере сельскохозяйственных наук ФАНО д.с.-х.н., **Ю.В. Плугатарь**, директор ФГБУН «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН» д.б.н., академик АН Республики Беларусь, **В.Н. Решетников**, почетный директор Государственного научного учреждения «Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси» к.с.-х.н., **О.И. Молканова**, заведующая лабораторией биотехнологии растений ФБГУН Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН.

Члены научного комитета:
д.б.н., проф. **О.В. Митрофанова**, главный научный сотрудник лаборатории биотехнологии и вирусологии растений ФГБУН «НБС-ННЦ»; д.б.н., проф. **А.С. Демидов**, директор ФБГУН Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН; д.б.н., **В.В. Титок**, директор ГНУ «Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси»; д.б.н. **А.М. Кудрявцев**, заместитель директора по научной работе ФБГУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова; академик РАН **П.Н. Харченко**, научный руководитель института ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии»; professor, **Dr. S. Mohan Jain,** Department of Agricultural Sciences, University of Helsinki; д.б.н. **С.В. Долгов,** заведующий лабораторией генной инженерии растений ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии»; д.б.н., проф. **И.Н. Третьякова,** ведущий научный сотрудник ФГБУН Институт леса им. В.Н.Сукачева СО РАН; д.б.н., проф. **В.Д. Работягов**, главный научный сотрудник лаборатории ароматических и лекарственных растений ФГБУН «НБС-ННЦ»; д.б.н., проф., **С.В. Шевченко**, главный научный сотрудник лаборатории репродуктивной биологии и физиологии растений ФГБУН «НБС-ННЦ»; к.б.н. **А.А. Веевник**, заместитель директора по научной и инновационной работе ГНУ «Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси»; к.с.х.н. **И.Ю. Ковальчук** ведущий научный сотрудник лаборатории криосохранения гермоплазмы Института биологии и биотехнологии растений; к.б.н., **Е.В. Спиридович**, заведующая лабораторией прикладной биохимии ГНУ «Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси»; к.б.н. **О.И. Коротков**, заведующий лабораторией парковедения ФГБУН «НБС-ННЦ»; к.б.н., **Губанова Т.Б.**, старший научный сотрудник лаборатории физиологии и репродуктивной биологии растений ФГБУН «НБС-ННЦ»; к.б.н., **А.Е. Палий**, заведующая лабораторией биохимии ФГБУН «НБС-ННЦ»
Секретарь оргкомитета: к.б.н., А.И. Ругузова.

Митрофанова И.В.
М 67 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. – 352 с.
ISBN 978-5-906877-23-9

УДК 504.73:57.085.2

© ФГБУН «НБС-ННЦ», 2016
© ИТ «АРИАЛ», 2016

ISBN 978-5-906877-23-9

The Russian Academy of Scienes

The Federal Agency for Scientific Organizations

FSBSI «Nikita Botanical Gardens – National Scientific Centre RAS»

FBSIS N.V. Tsytsin Main Botanical Garden of the Russian Academy of Sciences

SSI «Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus»

FBSIS N.I. Vavilov Institute of General Genetics of the Russian Academy of Sciences

SBI «Volgograd Regional Botanical Garden»

Proceedings
of the VII International Scientific and Practical Conference
«Biotechnology as an Instrument for Plant Biodiversity Conservation
(*physiological, biochemical, embryological, genetic and legal aspects)*», devoted to the 30th anniversary of Biotechnology Department in Nikita Botanical Gardens

Yalta, Crimea, Russia
September, 25 – October,01, 2016

Simferopol
PP «ARIAL»
2016

UDC 504.73:57.085.2
M 67

Organizing Committee

Chairman: Dr.Sci. **Irina Mitrofanova,** the Head of the Department of Plant Developmental Biology, Biotechnology and Biosafety at FSBSI «Nikita Botanical Gardens – National Scientific Centre RAS»

Co-chairmen: Corresponding Member of RAS, Dr.Sci. **Vugar Bagirov**, the Head of the Department of Coordination and Providing Scientific Organizations` Activities in Agricultural Sciences FASO
Dr.Sci., **Yuri Plugatar,** the Director of FSBSI "Nikita Botanical Gardens – National Scientific Center RAS"
Dr.Sci., Academician of NAS of Belorus, **Vladimir Reshetnikov** the Honourable Director of the State Scientific Institution Central Botanical Garden of NAS of Belarus
Ph.D., **Olga Molkanova**, the Head of Plant Biotechnology Laboratory at FBSIS N.V. Tsytsin Main Botanical Garden of the RAS

Scientific Organizing Committee:
Dr.Sci., Prof. **Olga Mitrofanova**, the Main Researcher of the Laboratory of Plant Biotechnology and Virology at FSBSI «Nikita Botanical Gardens – National Scientific Centre RAS»; Dr.Sci., **Alexander Demidov,** the Director of N.V. Tsytsin Main Botanical Garden of RAS; Dr.Sci., **Vladimir Titok**, the Director of the State Scientific Institution Central Botanical Garden of NAS of Belarus; Dr.Sci., **Alexander Kudryavtsev,** the Vice-director on Scientific Work at FBSIS N.I. Vavilov Institute of General Genetics of RAS; Academician RAS, **Peter Kharchenko,** the Scientific Director at FSBSI "All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology"; Professor, Dr., **S. Mohan Jain,** Department of Agricultural Sciences, University of Helsinki; Dr.Sci., **Sergey Dolgov,** the Head of the Laboratory of Plant Genetic Engineering at FSBSI "All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology"; Dr.Sci., Prof., **Iraida Tretyakova,** the Leading Researcher at Forest Institute, Siberian Branch of the RAS; Dr.Sci. **Valery Rabotyagov,** the Main Researcher of the Laboratory of Aromatic and Medical Plants at FSBSI «Nikita Botanical Gardens – National Scientific Centre RAS»; Dr.Sci., Prof., **Svetlana Shevchenko**, the Main Researcher of the Laboratory of Plant Reproductive Biology and Physiology at FSBSI «Nikita Botanical Gardens – National Scientific Centre RAS»; Ph.D., **Alexander Veevnik**, the Vice-director on Scientific and Innovation Work at State Scientific Institution Central Botanical Garden of NAS of Belarus; Ph.D., **Irina Kovalchuk**, the Leading Researcher of the Laboratory of Germplasm Cryopreservation at the Institute of Plant Biology and Biotechnology; Ph.D., **Elena Spiridovich**, the Head of the Laboratory of Applied Biochemistry of the State Scientific Institution Central Botanical Garden of NAS of Belarus; Ph.D., **Tatyana Gubanova**, the Senior Reseacher of the Laboratory of Plant Reproductive Biology and Physiology at FSBSI «Nikita Botanical Gardens – National Scientific Centre RAS»; Ph.D., **Anfisa Paliy**, the Head of Biochemistry Laboratory at FSBSI «Nikita Botanical Gardens – National Scientific Centre RAS»
Secretary: Ph.D. A.I. Ruguzova

Mitrofanova I.V.
M 67 Proceedings of the of the VII International Scientific and Practical Conference «Biotechnology as an Instrument for Plant Biodiversity Conservation (physiological, biochemical, embryological, genetic and legal aspects)», devoted to the 30th anniversary of Biotechnology Department in Nikita Botanical Gardens Yalta, Crimea, Russia September, 25 – October,01, 2016 – Simferopol : PP «ARIAL», 2016. – 352 p.
ISBN 978-5-906877-23-9

UDC 504.73:57.085.2

© Nikita Botanical Gardens – National Scientific Centre, 2016
ISBN 978-5-906877-23-9
© PP «ARIAL», 2016

ОСНОВНЫЕ СПОНСОРЫ КОНФЕРЕНЦИИ

THE MAIN SPONSORS OF THE CONFERENCE

ООО «Диаэм» / Dia-M LLC

ООО "Вайсс Климатехник" / Weiss Klimatechnik

НПО «АльтерЛаб» / AlterLab

ООО «Компания Хеликон» / Helicon

ООО «Аламед» / AlaMed

АНО «АВТех» / AWTech

Курортный комплекс “Ripario Hotel Group”

Приветственное слово

От лица Организационного Комитета мы рады приветствовать всех гостей и участников VII научно-практической конференции «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира (физиолого-биохимические, эмбриологические, генетические и правовые аспекты)», которая в этом году посвящена 30-летию отдела биотехнологии растений Никитского ботанического сада.

Биотехнология (технологии для жизни) как самостоятельная наука сформировалась в середине 70-х годов XX столетия. На принципиально новой основе она призвана решать такие глобальные проблемы современности, как продовольственная, энергетическая, ресурсная безопасность, защиты окружающей среды и др. Во многих странах мира развитию биотехнологии придается первостепенное значение. С 80-х годов прошлого столетия началось активное освоение новых биотехнологических методов, а конец 20 века и начало 21 века в мире ознаменовались бурным развитием не только биотехнологических исследований, но и наукоемких производств. Практически каждая страна мира имеет свою программу развития биотехнологий до 2020-2050 гг.

Коллекционный генофонд ФГБУН «НБС-ННЦ» включает в себя разнообразные виды и сорта декоративных, субтропических и косточковых плодовых, эфиромасличных растений (по сути кладезь мирового генофонда), имеющие как эстетическое, так и народнохозяйственное значение. Вместе с тем, возникающие трудности при традиционном размножении, оздоровлении, в процессе интродукции, селекции и сохранения многолетних садовых культур заставляют ученых обращаться к современным методам биотехнологии и биоинженерии.

Начало комплексным биотехнологическим исследованиям в Никитском ботаническом саду было положено всемирно известным ученым, специалистом в области фитопатологии и вирусологии растений, заслуженным деятелем науки и техники, доктором биологических наук, профессором Ольгой Владимировной Митрофановой, которая в начале 70-х годов прошлого столетия организовала группу вирусологии и культуры органов и тканей. Особую роль в создании группы сыграла комиссия ВАСХНИЛ по проверке научной деятельности организации и лично академик АН СССР И.Г. Атабеков. В 80-е годы биотехнология растений в Никитском ботаническом саду сформировалась как самостоятельное научное направление. Благодаря использованию различных знаний в области вирусологии, микробиологии, генетики, биохимии, физиологии и эмбриологии растений стало возможным активное развитие и расширение сферы применения биотехнологических исследований. В 1986 году был организован отдел биотехнологии растений, сотрудники которого и в настоящее время продолжают свои исследования, разрабатывают новые технологии, работают на мировом уровне, активно сотрудничая с биотехнологическими лабораториями и компаниями как у нас в стране, так и за рубежом. В рамках программы развития научной организации и гранта Российского научного фонда (2014-2018 гг.) № 14-50-00079, направлений «Биотехнология» и «Биоинженерия» за короткий период удалось модернизировать лабораторную базу отдела, создав новый современный научно-технологический комплекс «Биотрон-2015» и «Геномика-2016».

Выражаем искреннюю благодарность всем ключевым и приглашенным докладчикам, участникам с сессионными и стендовыми докладами за сотрудничество в процессе подготовки и проведения конференции.

Особую благодарность мы также хотим высказать спонсорам конференции, которые постарались, чтобы международный биотехнологический форум прошел на высоком уровне.

С глубоким уважением и признательностью,

Митрофанова Ирина Вячеславовна, д.б.н.
Председатель оргкомитета конференции

Плугатарь Юрий Владимирович, д.с.-х.н.,
Директор ФГБУН «НБС-ННЦ»
Сопредседатель оргкомитета конференции

Welcome Address!

On behalf of the Organizing Committee we are pleased to welcome all the guests and participants of the VII International Scientific and Practical Conference «Biotechnology as an Instrument for Plant Biodiversity Conservation (physiological, biochemical, embryological, genetic and legal aspects)». This year our Conference is devoted to the 30th anniversary of Biotechnology Department in Nikita Botanical Gardens.

Biotechnology (life technologies) as an independent science emerged in the mid 70-ies years of the XX century. Based on the fundamentally new principles it is designed to solve such global problems as food, energy and resource safety, environmental protection and some others. In many countries biotechnology development is in priority. Since the 80-ies years of the last century active development of new biotechnological methods started and the end of the 20th - beginning of the 21th century were marked by rapid development not only biotechnological research, but also high-biotech industries. Most of the countries all over the world have their own programs for biotechnology development until 2020-2050.

Genefond collections in FSBSI "NBG-NSC" include a variety of species and cultivars of ornamental, aromatic, subtropical and stone fruit plants (in fact the global gene-pool resource) with both aesthetic and economic value. However, difficulties in conventional propagation, cleaning up, introduction, breeding and preservation of perennial horticultures make scientists to use modern methods of biotechnology and bioengineering.

Complex biotechnological researches in Nikita Botanical Gardens were initiated by a world famous scientist, specialist in plant pathology and virology, Honored Science and Technology Worker, Doctor of Science in Biology, Professor - Olga Vladimirovna Mitrofanova, who organized a group of virology, organ and tissue culture studies in the early 70-ies of the last century. A special contribution to that group establishment was made by VASKhNIL Inspection Commission of the Institution scientific activity and personally academician of the Academy of Sciences of the USSR - I.G. Atabekov. Over the next 20 years plant biotechnology in Nikita Botanical Gardens was formed as an independent scientific direction. Through the use of a variety of knowledge in plant virology, microbiology, genetics, biochemistry, physiology and embryology it was made possible active development and extension of biotechnology research application. In 1986 Plant Biotechnology Department was established and scientiests of the department continues research investigations, develop new technology, work at a global level in cooperation with biotech laboratories and companies both in our country and abroad. Nowadays, scientific organization development program and research grant № 14-50-00079 of the Russian Science Foundation (2014-2018), directions "Biotechnology" and "Bioengineering" enabled to upgrade laboratory facilities and create a new modern scientific and technological complex "Biotron-2015"and"Genomics-2016".

We express our sincere gratitude to all the key and invited speakers, participants presented oral and poster presentations for their cooperation during the preparation and holding of the conference.

Our special thanks to the sponsors of the conference, who made their best for holding International Biotechnology Forum at a high level.

With great respect and appreciation,

Irina Mitrofanova, Dr. Sci. in Biology
Chairman of the Organizing Committee

Yuri Plugatar, Dr. Sci. in Agriculture,
Director FSBSI "NBG-NSC"
Co-Chaiman of the Organizing Committee

ПЛЕНАРНЫЕ ДОКЛАДЫ

PLENARY REPORTS

БИОТЕХНОЛОГИИ ОЗДОРОВЛЕНИЯ, РАЗМНОЖЕНИЯ И СОХРАНЕНИЯ САДОВЫХ КУЛЬТУР

И.В. Митрофанова
ФГБУН «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН», г. Ялта, Россия, e-mail: *irimitrofanova@yandex.ru*

Ботанические сады как центры биоразнообразия растений являются в настоящее время основными держателями генофондовых коллекций садовых культур. Интенсификация садоводческой отрасли, активизация продажи и обмена растительным материалом между странами, ослабление контроля за поступающим из-за рубежа посадочным материалом способствовали распространению фитопатогенов. Поэтому в настоящее время не вызывает сомнение необходимость мониторинга бактериальных, грибных и вирусных патогенов в садово-парковых агроценозах. В Никитском ботаническом саду проводятся многолетние и многосторонние исследования по выявлению причин усыхания деревьев косточковых и семечковых плодовых культур. Установлено, что основной причиной является распространение сосудистых заболеваний. У более 3000 сортообразцов косточковых и семечковых плодовых культур идентифицированы возбудители вертициллеза, бактериоза и вирусных инфекций, среди которых Apple chlorotic leaf spot virus – ACLSV (черешня сорта Рубиновая Ранняя), Cherry leaf roll virus – CLRV (черешня сорта Талисман), Prune dwarf virus – PDV (персик сорта Янги, груша сорта Талгарская Красавица), Prunus necrotic ringspot virus – PNRSV (персик сортов Мрия, Лебедев, черешня сорта Дилемма); Plum pox virus – PPV Эти пять возбудителей вирусной инфекции обнаружены на сортах персика и нектарина в Крыму. Нами обследованы коллекции целого ряда декоративных и эфиромасличных растений. Показана степень поражения коллекций этих культур.

Стратегией развития садоводства в целом в России должно быть масштабное оздоровление садовых культур и производство безвирусного посадочного материала на базе крупных биотехнологических комплексов. Знание и опыт научных кадров высокой квалификации является основой создания таких современных компаний. Экспериментальный поиск путей решения проблемы безвирусного садоводства привел нас к созданию модели системы освобождения растений от вирусов, которая должна использоваться в размножении плодовых, ягодных, эфиромасличных и лесо-декоративных культур, если государство хочет иметь оздоровленный посадочный материал. Стабильное получение безвирусной растительной продукции обеспечивает комплексное применение методов диагностики, культуры апикальных и пазушных меристем, хемо- и термотерапии *in vitro*, микроразножения, адаптации ex *vitro*, ретестирования и оценка физиолого-биохимического состояния растительного объекта. Для каждой культуры должен быть свой протокол, строго выполняемый и учитывающий воздействие трофических, гормональных и физических факторов культивирования. Необходимо создание растительных генобанков *in vitro* для сохранения ценных видов и сортов растений, а также для восстановления утраченных сортов.

Ключевые слова: *садовые растения, мониторинг фитопатогенов, диагностика, оздоровление, генобанк, in vitro*

Исследования выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 14-50-00079.

BIOTECHNOLOGY OF CLEANING UP, PROPAGATION AND CONSERVATION OF HORTICULTURE PLANTS

I.V. Mitrofanova
Nikita Botanical Gardens - National Scientific Centre, Yalta, Russia,
e-mail: *irimitrofanova@yandex.ru*

Botanical Gardens, as plant biodiversity centers are the main holders of horticulture crops gene pool collections. Intensification of horticulture industry, sale and exchange of plant material between countries, weakening of control over incoming from abroad planting material contributed to the spread of plant pathogens. Therefore, it is not in doubt the need for monitoring of bacterial, fungal and viral pathogens in landscap agrocenoses. Long-term and complex studies to identify the causes of stone and pome fruit crop trees desiccation are held in Nikita Botanical Gardens. It was found out that the main cause of trees desiccation was the spread of vascular diseases. At more than 3000 samples of stone and pome fruit crops Verticillium, bacteriosis and viral pathogens, including Apple chlorotic leaf spot virus - ACLSV (cherry cultivar Rubinovaya Rannyaya), Cherry leaf roll virus - CLRV (cherry cultivar Talisman), Prune dwarf virus - PDV (peach cultivar Yangi, pear cultivar Talgarskaya Krasavitsa), Prunus necrotic ringspot virus - pNRSV (peach cultivars Mriya, Lebedev, cherry cultivar Dilemma) and Plum pox virus - PPV were identified. Those five viral pathogens were found in peaches and nectarine cultivars in the Crimea. We examined a number of decorative and aromatic plants collections. The rate of damages in those crops collections was demonstrated.

A large-scale cleaning up of horticulture crops and production of virus-free planting material on the base of large biotech complexes should be the strategy for horticulture development in Russian Federation. Knowledge and experience of highly qualifide scientific specialists are the base for creation of such modern companies. Experimental search for the ways of solving the problem of disease-free horticulture led us to creation of a model system for plants` cleaning up that sould be used fruit, berry, aromatic and forest-ornamental crops, if the state is needed in virus-free planting material. Complex application of diagnostic methods, apical and axillary meristem culture, *in vitro* chemo- and thermotherapy, micropropagation, *ex vitro* adaptation retest and assessment of plant physiological and biochemical status provides regular obtaining of virus-free plant production. Particular protocol doing exactly and considering effects of trophic, hormonal and physical factors over the cultivation should be developed for each crop. It is necessary to create plant genebanks *in vitro* for conservation of valuable plant species and cultivars, as well as for resumption of lost cultivars.

Keywords: *garden plants, plant pathogens monitoring, diagnostics, rehabilitation, genebank, in vitro*

Aknowlegment
This study was funded by research grant N 14-50-00079 of the Russian Science Foundation.

ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ СОРТОВ ПШЕНИЦЫ МЕТОДАМИ СЕКВЕНИРОВАНИЯ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ

О.Н. Хапилина, Д.С. Тагиманова, А.П. Новаковская, А.О. Увашов, А.А. Аменов, А.С. Туржанова, Ж.С. Купешев, Р.Н. Календарь
РГП "Национальный центр биотехнологии", Астана, Казахстан
e-mail: *ruslan.kalendar@mail.ru*

Необходимость сохранения и рационального использования всего многообразия мировых генетических ресурсов стала как никогда ранее насущной. Продолжающаяся утрата разнообразных генетических ресурсов растений, пригодных для производства продовольствия и ведения сельского хозяйства, существенно сокращает имеющиеся у нас варианты действий, равно как и возможности будущих поколений адаптироваться к этим изменениям и обеспечить продовольственную безопасность, экономическое развитие. Биологическое разнообразие видов семейства Poaceae, обладающих полезными генами для твердой и мягкой пшениц, охватывает виды рода *Triticum* L., *Aegilops* L., *Agropyron* Gaertn., *Secale* L. и *Hordeum* L.

С помощью новых технологий секвенирования можно быстро идентифицировать новые аллели генов и генных областей, как у индивидуальных линий, так и у диких форм видов пшеницы. Выявленный полиморфизм можно связать с аллельными вариантами важнейших генов пшеницы, включая изоферменты, гены устойчивости к болезням и стрессам, запасные белки и другие гены. Полногеномное секвенирование и биоинформатика будут интенсивно развиваться наряду с геномным и транскриптомным секвенированием, высокопроизводительным скринингом SNP-полиморфизма, что позволит детально анализировать происхождение культурных растений, QTL-признаки у полиплоидных культур и даст новые возможности для селекции. На сегодняшний день секвенировано частично или полностью (*http://plants.ensembl.org/*) несколько геномов однодольных из семейства Poaceae. Сравнительный анализ между этими различными геномами позволил определить консервативные участки генов, которые могут быть исследованы с использованием молекулярных маркеров, для выявления генов-кандидатов для признаков, которые хорошо сохраняются между видами.

Нами проведена работа по изучению генетического разнообразия генов линий пшениц из мировых коллекций для выявления полиморфизма в кодирующей и некодирующих последовательностях и регуляторных участкам генов, с помощью секвенирования нового поколения. Получены данные по нуклеотидным последовательностям аллельных форм для некоторых изоферментов, запасных белков, генов фотопериода и яровизации. Определена связь полиморфизма ДНК последовательностей генов с аллелями белков этих генов.

Ключевые слова: *пшеница, генетическое разнообразие, секвенирование нового поколения*

GENETIC DIVERSITY OF WHEAT VARIETY STUDY BY NEW GENERATION OF SEQUENCING

O.N. Khapilina, D.S. Tagimanova, A.P. Novakovskaya, A.O. Uvashov, A.A. Amenov, A.S. Turzhanova, Z.S. Kupeshev, R.N. Kalendar
RSE "National Center for Biotechnology", Astana, Kazakhstan
e-mail: *ruslan.kalendar@mail.ru*

The need for conservation and management of the world's genetic resources has become more than ever the urgent earlier. The continuing loss of a variety of plant genetic resources that are suitable for food and agriculture significantly reduces our available options, as well as the ability of future generations to adapt to these changes and to ensure food security, economic development. Biological diversity of species of the family Poaceae, with useful genes for hard and soft wheats, covers species of the genus *Triticum L., Aegilops L., Agropyron Gaertn., Secale L.* and *Hordeum* L.

New generation of sequencing technologies allowed to quickly identifying new alleles of genes and gene regions from individual lines and in wild species forms of wheat. The identified polymorphisms may be associated with allelic variants of the major genes of wheat, including isoenzymes, resistance genes to disease and stress, storage proteins and other genes. Whole genome sequencing and bioinformatics will develop rapidly along with the genomic and transcriptomic sequencing, high-throughput screening SNP-polymorphism, which will analyze in detail the origin of cultivated plants, the QTL-signs in polyploid crops and provide new opportunities for breeding. To date, partially or completely sequenced (*http://plants.ensembl.org/*) several genomes of Poaceae monocots of the family. A comparative analysis between the genomes of different possible to determine the conserved regions of genes that can be investigated using molecular markers for the identification of candidate genes for traits which are well conserved between species.

We have carried out the work on the study of genetic diversity of genes of wheat lines from world collections to identify polymorphisms in the coding and non-coding sequences and regulatory regions of genes, with the new-generation of sequencing. Data on the nucleotide sequences of allelic forms for some isoenzymes, storage proteins, genes photoperiod and vernalization. A relation of polymorphism of DNA sequences of genes to proteins alleles of these genes.

Keywords: *wheat, genetic diversity, new generation of sequencing*

INDUCED MUTATIONS FOR CROP IMPROVEMENT

S. Mohan Jain
Department of Agricultural Sciences, University of Helsinki, PL-27, Helsinki, Finland,
e-mail: *mohan.jain@helsinki.fi*

Plant breeders are faced with a challengeto sustain food production worldwide under the climate change, and ever-increasing human population growth, especially in the developing countries. Any food shortages in the developing countries will have a great impact on social infrastructure and the national economy. Imports of food would cost them immensely and fall on international donors. The cost effective technologies are needed to sustain food production. Induced mutations have been highly effective to enhance the rate of mutation frequency as compared to the spontaneous mutations for crop improvement.The main advantage of mutant induction is direct mutant selection with multiple traits under the selection pressure. Mutations can be induced by physical and chemical mutagens as well by transgenesis, and cisgenesis. Among physical mutagens, gamma radiation and ethyl methane sulfonate (EMS) chemicalare commonly used for mutation induction by using seeds and *in vitro* cultures-haploid tissues, somatic embryos etc**.** Under the space breeding program**,** several useful mutant varieties have been released, e.g. sweet sorghum mutant had 20% more carbohydrates-well suited for food, feed and bio-energy. International Atomic Energy Agency (IAEA), Vienna maintain mutant data base, and reported more than 3500 mutant varieties released worldwide. A cotton mutant variety NIAB-70, released by Pakistan, saved Pakistani textile industry. By transgenic approach, single gene trait transgenic plants have been produced. Moreover, induced mutations are highly cost effective as compared to transgenic approach. By using *in vitro* techniques plant regeneration is successful in all major horticultural and crop plants. Micropropagation via organogenesis is routinely used for clonal propagation of major ornamental plants and fruit trees. *In vitro* selection of useful traits under the selection pressure and plants were regenerated. This overview highlights several mutants of horticultural and crop plants.

Keywords: *physical mutagens, chemical mutagens, in vitro techniques*

CLONAL CRYOBANKING: A STRATEGY FOR THE PRESERVATION OF WOODY PLANT GERMPLASM

Maurizio Lambardi
IVALSA/Trees and Timber Institute, National Research Council (CNR), Sesto Fiorentino (Florence), Italy, e-mail: *lambardi@ivalsa.cnr.it*

Plant cryopreservation has greatly evolved in recent years, being today a safe cost-effective complementary approach to the traditional *ex situ* conservation of plant biodiversity.

A milestone in the cryopreservation of woody plant material dates back to 1990, when Akira Sakai and co-workers developed the Plant Vitrification Solution n°2 (PVS2) which showed to be very effective for the induction of cell vitrification during ultra-rapid freezing in liquid nitrogen. Since then, the number of PVS2-based protocols, mainly developed for the cryopreservation of shoot tips, increased yearly while at the same time new and effective encapsulation- and droplet-based methods were also proposed. A range of different cryo-techniques is now available for the cryostorage of woody plant germplasm, allowing the safe long-term conservation in liquid nitrogen of different organs and tissues, coming from tissue culture or directly collected in the field, such as:

shoot tips and nodal segments, obtained *in vitro* by axillary or apical buds and used naked or incapsulated in Ca-alginate beads. They are the most used explants with broad-leaf trees, provided that optimized protocols of micropropagation have been achieved;

embryogenic cell masses, largely used with conifer species for which efficient micropropagation procedures from mature stock plants are rarely available;

dormant buds, directly collected from the field, which are cryo-stored after the application of a simple protocol, based on bud dessication and slow cooling. After thawing and rehydration, the buds are chip-grafted onto rootstocks;

seeds and embryonic axes, useful material for the long-term preservation of seed-propagated species;

pollen, a particularly precious material in fruit plant breeding.

At the CNR-IVALSA of Florence, the safe duplication in cryobank of ancient Italian germplasm of apple and citrus is in progress using two different approaches, viz., by preserving dormant (winter) buds and polyembryonic seeds, respectively. Using dormant buds, an effective cryopreservation technique has been developed, allowing up to 100% of successfully-grafted apple plants, after bud samples are dessiccated, slow-cooled, stored at -196°C, thawed, re-hydrated and chip-budded onto seed rootstocks. As for citrus, the duplication in cryobank of ancient germplasm is in progress, with the aim to store in liquid nitrogen samples from a collection initiated by Cosimo I° de' Medici in the 16th century and located in a historical garden in the outskirts of Florence. Here, the citrus accessions are maintained in large pots of terracotta and run the constant risk of being damaged by late frosts, diseases or vandalism. The cryopreservation of dehydrated polyembrionic seeds was the selected technique, as this material is excellent for clonal cryostoring, provided that nucellar embryos are favourite in the post-cryopreservation development.

Keywords: *apple, citrus, dormant buds, cryobanking, cryopreservation, seeds, vitrification*

INTIMACIES OF FLORAL SCENT

Alexander Vainstein
The Robert H. Smith Institute of Plant Sciences and Genetics in Agriculture
Faculty of Agriculture, Food and Environment
The Hebrew University of Jerusalem, Rehovot, Israel,
e-mail: *alexander.vainstein@mail.huji.ac.il*

The ability of flowering plants to prosper throughout evolution is strongly dependent on their ability to attract pollinators. Odor plays a prominent role in the location and selection of flowers by insects. The importance of scent-guided insect pollination of plants to human societies cannot be overestimated, as efficient pollination is a critical step in the successful production of farmed foods as well as in maintenance of ecological systems. Scent is also extremely important in the food and floriculture industries in terms of commercial appeal.

Flower fragrance is a composite character determined by secondary metabolites of diverse biosynthetic origins. To enable the exploration of metabolic fluxes and the identification of genes that perform key functions in the production of phenylpropanoids and terpenoids—representing two major metabolic pathways—we employed tobacco rattle virus (TRV)-based gene silencing approach. The lack of studies applying viral vectors to scent research is probably due to the fact that the character is invisible, dynamic, and consists of numerous low-molecular-weight compounds that are detrimentally affected by background noise from nonsilenced cells/tissues. We used anthocyanin pathway suppression as a reporter allowing easily visible identification of silenced flowers/tissues. Using this virus-induced gene silencing (VIGS) and virus-aided gene expression (VAGE) approaches for large-scale identification of floral scent genes, we identified and then isolated and characterized several flower-specific regulatory genes named *EMISSION OF BENZENOIDS* (*EOB*s). Their involvement in the biosynthetic cascade leading to the production/emission of unique floral scent bouquetswas detailed. Integrating knowledge of the structural and regulatory genes involved in floral scent production and of the mechanism regulating metabolic flow with the ability to modify genome sequences enabled us to rationally manipulatethe pathway toward enhanced production of floral scent compounds and/or pigmentation. Olfactory assay revealed that bees and humans could discriminate between the floral scents of genetically enhanced and control flowers.

Keywords: *scent, virus-induced gene silencing, virus-aided gene expression*

СЕКЦИЯ 1.
SESSION 1.

ИЗУЧЕНИЕ БИОРАЗНООБРАЗИЯ РАСТЕНИЙ *IN VITRO, IN SITU* И *EX SITU* И НОРМАТИВНО-ПРАВОВАЯ БАЗА СОХРАНЕНИЯ БИОРАЗНООБРАЗИЯ

INVESTIGATIONS OF PLANT BIODIVERSITY *IN VITRO, IN SITU* AND *EX SITU* AND NORMATIVE-LEGAL BASE OF PLANT WORLD BIODIVERSITY CONSERVATION

ЭМБРИОКУЛЬТУРА КАК СПОСОБ ИЗУЧЕНИЯ МОРФОГЕНЕЗА И РЕГЕНЕРАЦИИ РАСТЕНИЙ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ПШЕНИЦЫ И ИХ МЕЖВИДОВЫХ ГИБРИДОВ

Н.А. Алтаева, А.Б. Искакова
РГП «Институт биологии и биотехнологии растений» КН МОН РК, г. Алматы, Казахстан, e-mail: *daizy-c@mail.ru*

Актуальной современной проблемой является как создание чистолинейных сортов, изогенных, гибридных, моносомных, аллоплазматических, беккроссированных линий, ЦМС-линий, так и сохранение биоразнообразия видов и родов растений, ботанических и генетических коллекций, которые в будущем составят основной генофонд сельскохозяйственных растений Казахстана (Хайленко, 2010). Сложной задачей при отдаленной гибридизации является преодоление барьеров нескрещиваемости видов, стерильности новых форм, препятствующих созданию новых сортиментов растений. Гибель зародыша или эндосперма на ранних стадиях развития семени – второй после нескрещиваемости барьер при создании новых форм. В настоящее время культура таких недоразвитых зародышей на искусственных питательных средах позволила успешно преодолеть этот барьер (Хайленко, 2008).

Цель данного исследования: изучение способности роста и развития незрелых зародышей различных видов пшеницы и их гибридов *in vitro*.

Объекты исследований: виды пшеницы *Triticum kiharae* (A^tA^tGGDD) *T. dicoccum* (A^uA^uBB), *T. macha* L. (A^uA^uBBDD), *T. aestivum* L. (A^uA^uBBDD) (сорт Женис) и их гибриды.

В культуру *in vitro* были введены незрелые 15 – 18- суточные зародыши. Результаты исследований показали высокий процент каллусогенеза у сорта Женис – 73,6% и вида *T. dicoccum* – 62,1%. Однако через 3-4 недели у сорта Женис нарастание каллусной биомассы прекращалось. Самый низкий показатель каллусогенеза отмечен у вида *T. macha* – 29,3%. У вида *T. kiharae* каллусогенез отсутствовал. Предположено наличие в генотипе вида *T. kiharae* генов, блокирующих рост и развитие каллусов *in vitro*, либо генов, отрицательно реагирующих на фитогормоны, добавляемые в питательные среды. По сравнению с родительскими формами у гибридных комбинаций частота каллусогенеза была высокой. У комбинации *T. aestivum* (Женис) × *T. kiharae* каллусогенез составил 100%, у комбинаций *T. macha* × *T. aestivum* (Женис) – 86,2% и *T. aestivum* (Женис) × *T. dicoccum* – 77,8%. Низкий процент каллусогенеза отмечен у комбинации *T. aestivum* (Женис) × *T. macha* – 37,3%.

Родительские формы показали низкий процент образования растений-регенерантов: вид *T. macha* – 7,3%, сорт Женис – 4,4%, а у видов *T. kiharae* и *T. dicoccum* регенерация не наблюдалось. У гибридных комбинаций процент регенерации был выше: *T. aestivum* (Женис) × *T. kiharae* – 22,5%, *T. macha* × *T. aestivum* (Женис) – 17,2%, *T. aestivum* (Женис) × *T. dicoccum* – 12,7%, *T. aestivum* (Женис) × *T. macha* – 3,9%.

Через 4-6 недель, при пассировании на аналогичную питательную среду, часть каллусов снова дала зеленые ростки. Особенно интенсивно этот процесс проходил у гибридных комбинаций *T. macha* × *T .aestivum* (Женис), *T. aestivum* (Женис) × *T. kiharae*, *T. aestivum* (Женис) × *T .dicoccum*. Полученные растения-регенеранты всех родительских форм и гибридных комбинации были пересажены на питательную среду с добавлением ИУК для их дальнейшего роста и развития.

Таким образом, наблюдения за развитием зародышей *in vitro* показали существенные генотипические отличия видов, сортов и гибридных форм по каллусогенезу и по развитию растений-регенерантов.

Ключевые слова: *пшеница, гибридная комбинация, зародиш, каллусогенез, растение-регенерант*

EMBRYOCULTURE AS A WAY OF STUDY PLANT MORPHOGENESIS AND REGENERATION IN VARIOUS WHEAT SPECIES AND THEIR INTERSPECIFIC HYBRIDS

N. Altayeva, A. Iskakova
Institute of Plants Biology and Biotechnology of Committee of Science of Ministry of Education and Science of Republic of Kazakstan, Almaty, Kazakstan,
e-mail: *daizy-c@mail.ru*

Actual problem today is both the creation of pure-line varieties, isogenic, hybrid, monosomic, alloplasmatic, bekkrossirovannyh lines, CMS lines and biodiversity of species and genera of plants, botanical and genetic collections, which in the future will make the basic gene pool of agricultural plants Kazakhstan (Khailenko, 2010). A difficult task during hybridization is to overcome barriers of bad crossability species, sterility of new forms, which prevents the creation of new assortments of plants. The death of the embryo or the endosperm at early stages of development of the seed is the second barrier while creating of new forms after bad crossability. At present, the culture of immature embryos on artificial nutrient media will successfully overcome this barrier (Khailenko, 2008).

The aim of this research: studying capabilities of growth and development of immature embryos of different wheat species and their hybrids in vitro.

The objects of the research: species of wheat *Triticum kiharae* (A^tA^tGGDD) *T. dicoccum* (A^uA^uBB), *T. macha* L. (A^uA^uBBDD), *T .aestivum* L. (A^uA^uBBDD) (sort Jenis) and their hybrids.

The unripe 15-18- daytime embryos were introduced into *in vitro* culture. The results showed a high percentage of callusogenesis in sort Jenis - 73.6% and species *T. dicoccum* - 62,1%. However after 3-4 weeks the growth of callus biomass of sort Jenis ceased. The lowest inex of callusogenesis was observed in species *T. macha* - 29,3%. At the species *T. kiharae*, callusogenesis was absent. It was suggested in the presence of a genotype type genes T.kiharae blocking callus growth and development in vitro, or genes that negatively responsive to phytohormones added to the nutrient medium. In compare with the parental forms in hybrid combinations the frequency callusogenesis was high. In combination *T. aestivum* (Jenis) × *T. kiharae* callusogenesis was 100%, in the combination *T. macha* × *T. aestivum* (Jenis) - 86.2% and *T. aestivum* (Jenis) × *T. dicoccum* - 77,8%. The low percentage callusogenesis was observed in the combination *T. aestivum* (Jenis) × *T. macha* - 37,3%.

The parent forms showed low percentage of formation of plants-regenerant: the species of *T. macha* - 7,3%, the sort Jenis - 4.4%, regeneration in the species *T. kiharae* and *T. dicoccum* was not observed. In hybrid combinations of regeneration percentage was higher: *T. aestivum* (Jenis) × *T. kiharae* - 22,5%, *T. macha* × *T. aestivum* (Jenis) - 17,2%, *T .aestivum* (Jenis) × *T. dicoccum* - 12,7%, *T. aestivum* (Jenis) × *T. macha* - 3,9%.

After 4-6 weeks, with passaging on similar nutrient medium part of calluses once again gave the green shoots. Particularly intense this process took place in hybrid combinations *T. macha* × *T. aestivum* (Jenis), *T. aestivum* (Jenis) × *T. kiharae*, *T. aestivum* (Jenis) × *T. dicoccum*. These regenerated plants all parent forms and hybrid combinations were transplanted to the culture medium supplemented with IAA for their further growth and development.

Thus, monitoring the development of embryos in vitro showed significant genotypic differences of species, varieties and hybrid forms for callus and regenerated plants development.

Keywords: *wheat, a hybrid combination, the embryo, callusogenesi, the plant-regenerant*

НОРМАТИВНО-ПРАВОВАЯ БАЗА СОХРАНЕНИЯ БИОРАЗНООБРАЗИЯ РАСТИТЕЛЬНОГО МИРА В ТАДЖИКИСТАНЕ

Х.И. Бободжанова
Центр биотехнологии Таджикского национального университета, г. Душанбе, Таджикистан, e-mail: *bobojankh_7@mail.ru*

Один из мировых центров происхождения культурных растений включает Таджикистан. Страна обладает богатым генофондом видов, которые представляют потенциальный ресурс для создания высокопроизводительных и стойких культурных сортов, декоративных растений, лекарственного, ароматического и технического сырья. Сбор населением страны лекарственных и пищевых растений, плодов в горных лесах, охота, ловля рыбы способствуют улучшению его благосостояния. Богатство биоразнообразия страны проявляется на генетическом, видовом, популяционном, биоценотическом, экосистемном уровнях. Здесь произрастает много реликтовых и эндемичных видов, и большая часть компонентов биоразнообразия уязвима к воздействию антропогенных факторов. Начало богатому биологическому разнообразию дают различные климатические, геологические и экологические условия.

Биоразнообразие Таджикистана имеет большое значение на глобальном, региональном и национальном уровнях. Основные генетические ресурсы хранятся в лабораториях научно-исследовательских учреждений, живая коллекция генетических ресурсов хранится в Ботанических садах, питомниках, а также на территории заповедников и заказников. Страна располагает значительным генетическим фондом местных сельскохозяйственных культур. Общее количество коллекции сортов, гибридов и различных форм хлопчатника, зерновых, зернобобовых, масленичных, плодовых, овощных, субтропических и цитрусовых культур составляет более 32 тысяч местных и завезенных образцов. В условиях Таджикистана биоразнообразие в последние годы стало одним из основных факторов повышения социально-экономического положения населения страны.

Учитывая важность биоразнообразия для эколого-экономического развития страны, политика Правительства Таджикистана направлена на сохранение и устойчивое использование биологических ресурсов. Таджикистан в 1997 году ратифицировал Конвенцию по биоразнообразию. В настоящее время для реализации стратегических целей по устойчивому сохранению и использованию биоразнообразия, Правительством приняты решения по приданию особого приоритета проблемам сохранения и рационального использования биоразнообразия. На современном этапе в Таджикистане создана относительно развитая национальная природоохранная законодательная база. Ключевое место в области регулирования природопользования и защиты окружающей среды занимает Закон РТ «Об охране окружающей среды», принятый в 2011 г.

Законы РТ «Об охране и использовании растительного мира», «Об особых охраняемых природных территориях», «О биологической безопасности», «О пастбищах», «О генетических ресурсах растений» определяют базовое значение в вопросах регулирования сохранения и использования биоразнообразия.

Национальная стратегия Таджикистана и План действий по сохранению и устойчивому использованию биоразнообразия была принята Постановлением Правительства РТ от 1 сентября 2003 г. Документ сосредоточен на 5 стратегических целях: экономическая и социальная оценка национальных биологических ресурсов; регенерация и сохранение генетического фонда растений и животных; ex-situ и in-situ сохранение биоразнообразия; обеспечение биологической безопасности для страны и устойчивое использование биологических ресурсов в целях сокращения бедности и улучшения качества жизни человека. Правительство страны обеспечивает регулирование правовых отношений природопользователей.

Ключевые слова: *биоразнообразие, генетические ресурсы, Таджикистан*

REGULATORY BASE FOR SAVING BIODIVERSITY FLORA IN TAJIKISTAN

Kh. I. Bobodzhanova
Center of Biotechnology of Tajik National University, Dushanbe, Tajikistan,
e-mail: *bobojankh_7@mail.ru*

One of the world's centers of cultivated plants origin is Tajikistan. The country has a rich gene pool of varieties that represent a potential resource for the creation of high and persistent cultivars, ornamental plants, herbal, aromatic and industrial raw materials. Origin of the rich biological diversity is variety of climatic, geological and environmental conditions.

Biodiversity of Tajikistan is of great importance at the global, regional and national levels. The country has a significant gene pool of local crops. Total collection of varieties, hybrids and various forms of cotton, cereals, legumes, oilseed, fruit and vegetables, citrus and subtropical crops consist of more than 32 thousand local and imported samples. Recent years, biodiversity of Tajikistan has become a major factor in improving the socio-economic situation of the country's population.

Considering the importance of biodiversity for the environmental and economic development of the country, the policy of the Government of Tajikistan aimed at the conservation and sustainable use of biological resources. Tajikistan has ratified the Convention on Biodiversity in 1997. At the present time government decided on giving special priority to the problems of conservation and sustainable use of biodiversity for the implementation of strategic objectives for sustainable conservation and use of biodiversity. At the present stage has been established a relatively developed national environmental legislation in Tajikistan. The "On Environmental Protection" of Tajikistan, adopted in 2011, plays a key role in the field of natural resources and protection of the environment.

Laws of the Republic of Tajikistan "On protection and use of flora", "On Specially Protected Natural Areas", "On Biological Safety", "On pastures", "On Plant Genetic Resources" define base value in matters of regulation of conservation and use of biodiversity.

The National Strategy for Tajikistan and the Action Plan for the Conservation and Sustainable Use of Biodiversity adopted a Resolution of the Government of Tajikistan on September 1, 2003. The document focuses on five strategic objectives: economic and social assessment of national biological resources; the generation and conservation of the genetic stock of plants and animals; ex-situ and in-situ conservation of biodiversity; ensuring environmental security for the country and the sustainable use of biological resources in order to reduce poverty and improve the quality of human life. The government provides regulation of legal relations.

Keywords: *biodiversity, genetic resources, Tajikistan*

ФОРМИРОВАНИЕ И СОХРАНЕНИЕ КОЛЛЕКЦИОННОГО ФОНДА ЯРОВЫХ ФОРМ *TRITICUM AESTIVUM* L. ДЛЯ ПОГОДНО-КЛИМАТИЧЕСКИХ И ПОЧВЕННЫХ УСЛОВИЙ ТЮМЕНСКОЙ ОБЛАСТИ

Н.А. Боме[1], А.Я. Боме[2], Е.И. Рипбергер[1]
[1]Тюменский государственный университет, г. Тюмень. Россия, e-mail: *bomena@mail.ru*
[2]Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), г. Санкт-Петербург, Россия, e-mail: *genbank.d@gmail.com*

В решении продовольственной и биоресурсной безопасности страны актуально изучение биологического разнообразия и структурно-функционального состояния *Triticum aestivum* L. В сельскохозяйственной зоне Тюменской области, характеризующейся сложными, нередко экстремальными почвенно-климатическими условиями, одной из важнейших задач остается расширение генетического полиморфизма растений.

Главным источником доноров и генов для отечественной и мировой селекции являются коллекции Всероссийского института генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), насчитывающие более 325660 тыс. образцов культурных растений и их диких родичей. Поддерживаются и изучаются генетические ресурсы рода *Triticum* L., включающие более 54000 диких видов, разновидностей, форм и культивируемых сортов из 70 стран.

Неоспоримая роль в изучении и сохранении растительных ресурсов принадлежит опытным станциям, филиалам и опорным пунктам ВИР, расположенным в различных эколого-географических зонах России, в том числе и Тюменскому опорному пункту ВИР, действующему на базе Института биологии Тюменского государственного университета с 2005 года. В изучаемых нами коллекциях значительная часть материала представлена культурными злаками (яровые и озимые формы пшеницы, ячменя, овса), а также образцами гороха, сои, лекарственных растений (всего около 2000 образцов из 60 стран мира и 33 субъектов Российской Федерации, расположенных во всех Федеральных округах). Эксперименты в естественных полевых условиях и климатических камерах с заданными параметрами позволяют отбирать растения, устойчивые к воздействию неблагоприятных факторов (пониженные температуры, дефицит влаги, засоление почв). Изучение механизмов устойчивости растений к болезням, в том числе и вредоносным, проводится на инфекционном искусственном фоне с использованием чистых культур фитопатогенных грибов.

На основании многолетних исследований (2006-2015 гг.) около 450 коллекционных образцов яровой мягкой пшеницы выделены источники селекционно-ценных признаков. Большие резервы генетической изменчивости мировой коллекции ВИР подтверждены нами использованием образцов яровой мягкой пшеницы в качестве компонентов скрещиваний и исходного материала при обработке семян химическим мутагеном фосфемидом. Использование рекомбинационной и мутационной изменчивости, индуцированной мутагеном фосфемидом (концентрация 0,01%), на сортах Сага и Скэнт 3 из мировой коллекции Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР) и их гибрида F_4, позволило расширить спектр и частоту мутаций 12 морфологических признаков и биологических свойств.

Подтверждена эффективность расширенного экологического испытания в контрастных почвенно-климатических условиях для выявления селекционно-ценных форм с высокой адаптивной способностью. Выделена гибридная комбинация Сага х Лютесценс, характеризовавшаяся относительно высоким коэффициентом адаптации и низкой восприимчивостью к фитопатогенным грибам в географических пунктах Германии (Земля Баден-Вюртемберг, экспериментальный участок Вальдорфской школы и Земля Нижняя Саксония, опытная станция «Waldhof») и России (Тюменская область, Нижнетавдинский район, биостанция «Озеро Кучак»). Коллекционный фонд яровой мягкой пшеницы при условии надежного сохранения и рационального использования способствует развитию приоритетных направлений, ориентированных на повышение продуктивности северных агроценозов.

Ключевые слова: *гибрид, неблагоприятные факторы, фитопатогенные грибы, химический мутаген.*

FORMING AND PRESERVATION THE COLLECTION FUND OF SPRING FORMS *TRITICUM AESTIVUM* L. FOR CLIMATIC AND SOIL CONDITIONS OF THE TYUMEN REGION

N.A. Bome[1], A.Y. Bome[2], E.I. Ripberger[1]
[1]Tyumen State university, Tyumen, Russia, e-mail: *bomena@mail.ru*
[2]N.I.Vavilov Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St-Petersburg, Russia,
e-mail: *genbank.d@gmail.com*

For food and bio-resource security countries is overdue study of biological diversity and the structural and functional state of *Triticum aestivum* L. In the agricultural area of the Tyumen region, characterized by a complex and often extreme soil and climatic conditions, one of the most important tasks is the expansion of the genetic polymorphism of crops.

The main source of donors and genes for domestic and world breeding presented by collections of the N.I.Vavilov Institute of Plant Genetic Resources (VIR) with more than 325,660 specimens of cultivated plants and their wild relatives. Among this amount support and explore the genetic resources of the genus *Triticum* L., comprising more than 54000 wild species, varieties, forms, and cultivated varieties from 70 countries.

The undeniable role in the study and preservation of plant resources is owned by science stations, and VIR affiliates, located in different ecological and geographical areas of Russia, including Tyumen VIR control point, acting on the basis of the Institute of biology of the Tyumen State University since the year 2005. The studied material of the collections of the Tyumen VIR control point is represented by cultural cereals (spring and winter forms of wheat, barley, oats), as well as samples of pea, soya, medicinal plants (about 2000 samples from 60 countries of the world and 33 constituent entities of the Russian Federation, located in all federal districts). Science experiments in open field conditions and climate chambers with preset parameters allow selecting plants resistant to adverse factors (low temperature, moisture deficit, and salinization). Study on mechanisms of plant resistance to disease, including malware, infection induced background using pure cultures of pathogenic fungi.

Based upon years of research (2006-2015), allocated about 450 collection samples of spring soft wheat breeding sources with valuable traits.

Large reserves of genetic variability of the VIR world`s collection confirmed by us using spring soft wheat samples as components of crossings and source material for seed processing by chemical mutagen Phosphemidum. Use of recombinational, and mutational variability induced by mutagen Phosphemidum (concentration 0.01%), on varieties Skent 3, and Cara from world collections N.I.Vavilov Institute of Plant Genetic Resources (VIR) and their hybrids F_4, has expanded the range and frequency of mutations of 12 morphological features and biological properties.

Our researches confirmed the effectiveness of expanded ecological test in contrasting soil-climatic conditions to identify breeding valuable forms with high adaptive capacity. Selected a hybrid combination Cara x Lutescens, with relatively high adoption rate and low susceptibility to phytopathogenic fungi on the geographical locations of Germany (Baden-Württemberg, experimental station Waldorf School and Lower Saxony, the experimental station "Waldhof") and Russia (Tyumen area, Nizhnetavdinsky district, the Bio-station “Lake Kuchak”).

The collection fund of spring soft wheat provided reliable preservation and rational use contributes to the development of priorities aimed at enhancing the productivity of Northern agro-ecosystem.

Keywords: *hybrid, negative factors, phytopathogenic fungi, chemical mutagen*

МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИ ВАЖНОГО ДЛЯ ЛЕСОВ ГРУЗИИ ВИДА *ARBUTUS ANDRACHNE* L.

Н.В. Гогинашвили[1], Н.В. Мемиадзе[2], М.Ш. Ахалкатси[3], З.К. Манвелидзе[2], Д.Д. Сурманидзе[4]
[1]Научно-Исследовательский Центр Аграрной Науки, Тбилиси, Грузия,
e-mail: *nana.goginashvili.srca@gmail.com*
[2]Ботанический Сад Батуми, г. Батуми, Грузия
[3]Институт Ботаники - Илия Государственный Университет, г. Тбилиси, Грузия
[4]Батумский Государственный Университет им.Шота Руставели, г. Батуми, Грузия

Леса Грузии богаты генетически важными редкими видами. Особенно важны в этом плане колхидские леса Аджарии, где растет множество эндемичных и реликтовых видов.

Из рода *Arbutus* на Кавказе встречается один вид Земляничник мелкоплодный *Arbutus andrachne* L., который в Грузии распространен только в Абхазии и в Аджарии. Земляничник мелкоплодный типичный гемиксерофильный элемент флоры Средиземноморья, который попал в Колхиду еще в третичном периоде. Ближайшие районы его реликтового ареала в Крыму и в Малой Азии. В Аджарии он растет только в единственном месте.

Целью Исследования было детальное описание ареала *Arbutus andrachne* L. в Аджарии, внесение в базу данных редких видов, подготовка карты в GIS, изучение фенологии. С целью консервации вида - сборка, обработка и сохранение семян, разработка технологии клонального микроразмножения.

Arbutus andrachne L. растет в ущелье реки Ачарисцкали в горном районе Шуахеви, на южных и южно-западных каменно-песочных склонах села Горханаули, в дубовом лесу на высоте 450-600 м над уровнем моря. Естественное распространение земляничника в ущелье реки Ачарисцкали объясняется климатическими особенностями этого ущелья. Ущелье своим флористическим составом, соответствующим сухому климату, отличается от других ущелий южной части Колхиды и считается отдельной ботанико-географической единицей. Здесь представлены дуб чорохский (*Quercus dschorochensis* C. Koch), засухоустойчивые элементы флоры побережья Средиземного моря и Малой Азии: ладанник шалфеелистный (*Cistus salviifolius* L.*)*, можжевельник рыжий (*Juniperus rufescens* Link.*)*, боярышник согнутостолбиковый (*Crataegus kyrtostyla* Fing.*)*, мушмула германская (*Mespilus germanica* L.*)*, амаракус круглолистный (*Amaracus rotundifolius* Briq.*)* и другие, вместе с которыми растет и земляничник.

Arbutus andrachne L. представлен единичными кустами или деревьями, высотой 5-6 м. Кора красноватого цвета, тонкая, гладкая, отходит от древесины. Исследования показали, что возобновление вида ослаблено. Размножение идет за счет корневых отростков, а не семенами. Поэтому количество индивидов популяции постепенно уменьшается.

Разработана технология размножения *Arbutus andrachne* L. в системе *in vitro*, семена сохранены в семенном банке.

Ключевые слова: *Arbutus andrachne L., in vitro размножение, банк семян*

MATERIALS FOR STUDY OF GENETICALLY IMPORTANT SPECIES OF GEORGIAN FORESTS *ARBUTUS ANDRACHNE* L.

N. Goginashvili[1], N. Memiadze[2], M. Akhalkatsi[3], Z. Manvelidze[2], D. Surmanidze[4]
[1]Scienctific-Research Center of Agriculture, Tbilisi, Georgia,
e-mail: *nana.goginashvili.srca@gmail.com*
[2]Batumi Botanical Garden, Batumi, Georgia
[3]Institute of Botany, Ilia State University, Tbilisi, Georgia
[4]Shota Rustaveli State University, Batumi, Georgia

The forests of Georgia are rich in genetically important species. The Atcharian Colchic forests are especially interesting in this aspect, because many endemic and relict species are spread there.

The genus *Arbutus* is presented by the only one species - Greek strawberry tree *Arbutus andrachne* L. It is distributed only in Atchara and Abkhazia. Greek strawberry tree is a typical hemixerophytic element of the Mediterranean flora that reached Colchis in the Tertiary period. Crimea and Asia Minor are the nearest regions of its relict area. There is its single location in Atchara.

The purpose of our study was a detailed description of *Arbutus andrachne* L.area in Atchara, its introduction in the database of rare species, preparation of map (GIS), and phenology studies. With the aim of the species conservation collecting of seed, their processing and keeping, so as development of *in vitro* reproduction technology were made.

Arbutus andrachne L. grows in mountainous areas of the gorge of Atcharistskali River, on southern and south-western rocky and sandy slopes of the village Gorkhanauli, in the oak forest, on the altitude 450-600 m above sea level. Natural distribution of Greek strawberry tree in the gorge of Atcharistskali Riveris explained by the climatic peculiarities of the gorge. In particular, this gorge is distinguished among the other gorges of the southern part of Colchis by respective floristic composition of dry climate, and it is considered as the separate botanical-geographical unit. There are presented Chorokhi oak - *Quercus dschorochensis* C. Koch, xerophilous elements of Mediterranean and Asia Minor regions: sage-leaved rock-rose - *Cistus salviifolius* L., juniper - *Juniperus rufescens* Link, hawthorn - *Crataegus kyrtostyla* Fing., medlar - *Mespilus germanica* L., amaracus- *Amaracus rotundifolius* Briq. and others; Greek strawberry tree grows together with them.

Arbutus andrachne L. is presented as individual bushes or trees of 5-6 m height. Its bark is of reddish color, thin, smooth, and exfoliates from timber. The studies have shown that reproduction of the species proceeds slowly. It is reproduced on the expense of sprouts from roots and not by seeds; therefore the numbers of individuals of the population gradually reduces.

The protocols of microreproduction (in vitro) of Greek strawberry tree have been developed and specified; seed has been kept in the Seed bank.

Keywords: *Arbutus andrachne L., in vitro reproduction, Seed Bank*

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

Е.В. Грошева[1], М.В. Маслова[2]
[1]ФГБОУ ВО Мичуринский ГАУ, г. Мичуринск, Россия, e-mail: *ekaterina2687@mail.ru*, *marinamaslova2009@mail.ru*

Представители рода *Lilium L.* относятся к числу популярных цветочных луковичных культур, которые широко используются в садовом дизайне в летний период и для выгонки в зимнее время. Успешное размножение сортов лилии с низким коэффициентом вегетативного размножения возможно с применением биотехнологических методов, позволяющих оздоровить материал и значительно сократить сроки получения посадочного материала ценных сортов.

В последнее время наблюдается ухудшение фитосанитарной обстановки насаждений цветочных культур и усиление болезней, вызываемых некротрофными грибами. Наиболее вредоносной болезнью лилии является фузариоз, развитие которого снижает декоративные признаки растений и нередко приводит к их гибели. Распространение данной болезни вызвало необходимость поиска устойчивых генотипов среди существующего сортимента, перспективных для использования в озеленении.

Цель данной работы – проведение скрининга сортов лилии по признаку устойчивости с применением специальных лабораторных приемов моделирования биотической нагрузки на растительные ткани в контролируемых условиях с использованием токсических метаболитов патогенов. Материалом для исследования являлись модельные сорта лилии *Manitoba Morning (Martagon hybrids)* и *Cavalese (LA hybrids)*, культивируемые в условиях *in vitro* на питательной среде по прописи Мурасиге и Скуга (MS) с добавлением 45 г/л сахарозы, 0,1 мг/л α-нафтилуксусной кислоты (НУК) и растворов токсических метаболитов патогенного гриба в различной концентрации (0%; 5,0%; 10,0 %; 15,0 %; 20,0%). Культивирование растений осуществляли в специально оборудованной культуральной комнате при 16-часовом световом дне с освещенностью 1800-2000 люкс, температуре воздуха 26 ± 2^0C и влажности воздуха 50-60%.

Из пораженных луковиц лилий путем посева чешуй после поверхностной стерилизации на твердую питательную среду Чапека был выделен патогенный гриб *Fusarium oxysporum* (Schlecht.) Sned. et Hans. Для накопления токсических метаболитов гриб выращивали на жидкой среде Чапека в течение месяца при температуре воздуха 23 ± 2^0C, после чего стерилизовали фильтрованием (“Millipore” 0,22 μm, France). Оценку поражения листьев и побегов лилии проводили по пятибалльной шкале.

Культивирование микролуковиц лилии на средах с токсинами показало, что в вариантах с содержанием фильтрата культуральной жидкости в среде 15% и 20% значительно снижается средняя длина листьев (на 1,0 см и 0,9 см соответственно) по сравнению с контролем. Отмечается наличие признаков хлорозности и некрозности листьев (до 1,1 балла). Выявлена различная реакция сортов на интоксикацию. Сорт *Cavalese* оказался более устойчив к действию токсинов по сравнению с сортом *Manitoba Morning,* листья которого уже при концентрации токсических метаболитов гриба 5% снижали скорость роста и имели признаки хлорозности и некрозности. У сорта *Cavalese* эти симптомы отмечались лишь на среде с 15% содержанием токсина.

Таким образом, использование данного метода позволяет проводить скрининг сортов лилии и ранжировать их по степени устойчивости к патогенам.

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

IN VITRO SCREENING METHOD FOR SELECTION OF RESISTANT LILIES' CULTIVARS AGAINST *FUSARIUM OXYSPORUM F. SP. LILII*

E.V. Grosheva[1], M.V. Maslova[2]
[1]Michurinsk State Agrarian University, e-mail: *ekaterina2687@mail.ru*, *marinamaslova2009@mail.ru*

Lilium L. is a genus of herbaceous flowering plants growing from bulbs. Lilies are widely distributed across the urban and rural landscape in summer and commonly tend to be forced out of season.

Fusarium oxysporum f. sp. lilii, soil-borne plant pathogen is the causal agent of Fusarium wilt, most serious disease to all lilies' cultivars, especially infecting bulbs and flowers and often could kills a plant.

In a due to wide spread of this disease, it has become increasingly important to develop resistant genotypes of lily plants for promising uses in gardening.

In this study, *in vitro*-grown plants of *Manitoba Morning* (Martagon hybrids) and *Cavalese* (LA hybrids) cultured on a Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 45 g/l sucrose, 0,1 mg/l α- naphthaleneacetic acid (NAA) and different consecrations of toxin produced by pathogen.

It has been noticed that the lilies' cultivars react to intoxication variously. Cultivar *Cavalese* proved more resistant to the action of toxins compared to a *Manitoba Morning*.

Therefore, in vitro screening method demonstrates the possibility of distinguishing resistant and non-resistant lilies' cultivars and ranges them in susceptibility.

Key words: *Lilium L., in vitro, screening, metabolites pathogenic fungus, Fusarium*

ПОЛУЧЕНИЕ УДВОЕННЫХ ГАПЛОИДОВ В КУЛЬТУРЕ НЕОПЫЛЕННЫХ СЕМЯПОЧЕК КАБАЧКА (*CUCURBITA PEPO* L.)

Е.А.Домблидес, Н.А. Шмыкова, Т.В. Заячковская, Г.А. Химич, И.Б. Коротцева, Л.Ю. Кан, А.С. Домблидес
ФГБНУ ВНИИ селекции и семеноводства овощных культур (ВНИИССОК),
п. ВНИИССОК, Одинцовский, р-н, Московская обл., Россия,
e-mail: *edomblides@mail.ru*

Получение удвоенных гаплоидов (doubled haploids DHs- растения) через культуру неопыленных семяпочек *in vitro* - один из биотехнологических методов ускоренного создания гомозиготных линий для гетерозисной селекции. Создание гомозиготной родительской линии кабачка (*Cucurbita pepo* L.) методами традиционной селекции занимает от 6 до 8 лет, а при использовании гиногенеза возможно получить такую линию в течение одного года. Было установлено, что на образование DH-растений большое влияниеоказывает генотип донорного растения. Только семь из 22 селекционных образцов кабачка оказались отзывчивыми в культуре неопыленных семяпочек *in vitro*. Наибольшее число эмбриоидов и нормально развитых растений было получено в опытах, когда завязи на стадии до распускания бутонов изолировали и помещали для температурной предобработки при 4°С на 1-2 суток. Выделенные семяпочки культивировали на питательной среде с минеральной основой МС с добавлением аминокислот (100 мг/л пролина, 100 мг/л серина и 800 мг/л глутамина) и витаминов прописи среды NLN, 30 г/л сахарозы и 7 г/л агара. Особенно эффективным оказалось добавление в питательную среду 200 мг/л ампициллина. Генотипы различались по частоте индукции гиногенеза в зависимости от вариантов используемых регуляторов роста. У всех семи отозвавшихся генотипов индукция гиногенеза происходила на среде с 2 мг/л 2,4-Д и/или с 2 мг/л 2,4-Д и 0,0001 μМ эпибрассинолида. Для трех генотипов удалось получить эмбриоиды также на средах с 0,2 мг/л тидиазурона и с 0,2 мг/л тидиазурона и 0,0001 μМ эпибрассинолида. Причем только для одного образца индукция на среде с тидиазуроном была в 2 раза выше по сравнению с использованием 2,4-Д. Первые эмбриоиды появлялись через 5 недель культивирования. Нормально развитые эмбриоиды переносили на безгормональную среду МС с 2% сахарозой 3 г/л фитогеля. Плохо развивающиеся эмбриоподобные структуры переносились на 3 недели на среду МС с 2% сахарозой, 3 г/л фитогеля, 0,2 мг/л НУК и 0,2 мг/л БАП, что стимулировало образование точек роста и формирование в дальнейшем полноценных растений с хорошо развитой корневой системой. Через 15 недель от начала культивирования первые растения–регенеранты были высажены в почву. Всего было получено 337 растений-регенерантов. Период адаптации к условиям *in vivo* составил 2 недели. Потери на этом этапе составили 17%. Проведенный цитологический анализ на кончиках корня с использованием световой микроскопии показал, что у большинства растений был диплоидный набор хромосом, однако встречались растения и с гаплоидным набором.

Ключевые слова: *удвоенные гаплоиды, культура неопыленных семяпочек in vitro, кабачок (Cucurbita pepo* L.*), амплификация*

DOUBLED HAPLOID PLANT PRODUCTION FROM *IN VITRO* CULTURE OF UNPOLLINATED OVULES OF SUMMER SQUASH (*CUCURBITA PEPO* L.)

Elena A. Domblides, Natalia A. Shmykova, Tatyana V. Zayachkovskaya, Galina A. Khimich, Irina B. Korotseva, Ludmila Y. Kan and Arthur S. Domblides
Laboratory of biotechnology, All-Russian Research Institute of Vegetable Breeding and Seed Production (VNIISSOK), Russia, e-mail: *edomblides@mail.ru*

Doubled haploids (DHs) production through *in vitro* culture of unpollinated ovules is a biotechnological method used to obtain homozygous lines for breeding programmes. In summer squash (*Cucurbita pepo* L.) the development of homozygous lines following self-pollination requires from six to eight years, while through *in vitro* cultivation of unpollinated ovules such lines can be obtained in just one year. The genotype of donor plants is shown to be one of the main factors in DH plant production. In our study only seven out of the 22 genotypes assessed were responsive to in vitro culture. The best yield of embryoids and well-formed plants was obtained with ovaries which were isolated at the stage of unopened flower buds being exposed to cold (4°C) for 1-2 days. Extracted ovules were cultivated on the medium with mineral base of MSM with addition of amino acids (100 mg/L of proline, 100 mg/L of serine and 800 mg/L of glutamine), vitamins according to NLN medium, 30 g/L of sucrose and 7 g/L of agar. Improved results were also obtained with addition of 200 mg/L of ampilicillin. All the genotypes showed different yield of gynogenic structure formation depending on the combination of hormones used. Seven genotypes that gave the best yield of gynogenic structures were cultivated on the medium with 2 mg/L of 2,4-D or/and 2 mg/L of 2,4-D together with 0,0001 µM of epibrassinolid. Three genotypes also gave embryoids on both media supplemented with 0,2 mg/L of TDZ and 0,2 mg/L of TDZ together with 0,0001 µM of epibrassinolid. Only one genotype produced twice as many gynogenic structures on the medium with TDZ than on the medium with 2,4-D. First embryoids appeared after 5 weeks of in vitro cultivation. Well-developed embryoids were transfered on the MS medium without hormones supplemented with 2% of sucrose (w/v) and 3 g/L of Phytogel. While malformed embryoid-like structures were placed on MSM culture medium with 2% of sucrose (w/v), 3 g/L of Phytogel, 0,2 mg/L of NAA and 0,2 mg/L of BA for three weeks, where sprouting began and plantlets with well-developed root system formed. After 15 weeks of cultivation first plants were planted into the soil. In total, 337 plant regenerants were obtained. The period of adaptation to in vivo condition lasted for 2 weeks. Losses of regenerated plants reached up to 17%. Cytological analysis of root tips revealed the diploid set of chromosomes in most of plants produced; however, there are a few ones with haploid set of chromosomes.

Keywords: *doubled haploids (DHs), in vitro culture of unpollinated ovules, summer squash (Cucurbita pepo* L.*), ampilicillin*

ЗЕЛЕНАЯ МИКРОВОДОРОСЛЬ РОДА *CHLOROSARCINOPSIS* HERNDON (CHLOROPHYTA) ИЗ ЗАБАЙКАЛЬСКОГО КРАЯ (РОССИЯ)

И.Н. Егорова, Е.В. Минчева[1], О.Н. Болдина[2]
Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск, Россия,
e-mail: *egorova@sifibr.irk.ru*
[1]Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск, Россия,
e-mail: *elenakuznetsova01@gmail.com*
[2]Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, г. Санкт-Петербург, Россия;
e-mail: *olgab1999@mail.ru*

В ходе исследований наземных водорослей в Сохондинском государственном биосферном заповеднике (Забайкальский край, Россия) выявлена зеленая микроводоросль с 1 пристенным хлоропластом, пиреноидом и ядром, формирующая одиночные клетки и клеточные комплексы, неподвижные и подвижные репродуктивные клетки, размножающаяся бесполым и половым путем. Водоросль обнаружена в накопительной культуре из пробы эпифитных мхов, развивавшихся на стволе тополя. Получена альгологически чистая культура, которая депонирована в коллекцию культур водорослей СИФИБР СО РАН – IRK–A. Проведены исследования методами световой и трансмиссионной электронной микроскопии и молекулярной филогении. Подробно полученные результаты рассмотрены в докладе. Установлена принадлежность изучаемого объекта роду *Chlorosarcinopsis* Herndon (Chlorophyta, Chlorophyceae). Вместе с тем, не выявлено соответствия ни одному известному виду рода.

Ключевые слова: *зеленые микроводоросли, Chlorosarcinopsis, световая микроскопия, ТЭМ, молекулярная филогения*

GREEN MICROALGAE OF THE GENUS *CHLOROSARCINOPSIS* HERNDON (CHLOROPHYTA) FROM ZABAIKALSKIY REGION (RUSSIA)

I.N. Egorova, E.V. Mincheva[1], O.N. Boldina[2]
Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, e-mail: *egorova@sifibr.irk.ru*
[1]Limnological Institute Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, e-mail: *elenakuznetsova01@gmail.com*
[2]Komarov Botanical Institute of the Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia, e-mail: *olgab1999@mail.ru*

We studied green microalgae, forming single cells and cells packages of irregular shape with single parietal chloroplast and pyrenoid; uninucleate; reproduce asexually and sexually. This alga appeared in enrichment culture from samples of epiphytic mosses, developed on the trunk of a poplar. The territory, where research samples were collected, is a part of the Sokhondinskiy state biosphere nature reserve (Zabaikalskiy region). Isolate of studied alga is deposited in the culture collection of algae SIFIBR SB RAS (Irkutsk, Russia) – IRK–A. Analysis of the morphology and molecular phylogeny allows us to attribute it to the genus *Chlorosarcinopsis* Herndon (Chlorophyta, Chlorophyceae). At the same time, available data do not confirm its identity to any known species of the genus.

Keywords: *green microalgae, Chlorosarcinopsis, light microscopy, TEM, molecular phylogeny.*

РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗУЧЕНИЯ БИОРАЗНООБРАЗИЯ ВИДОВ РОДА *ROSA* L. КОЛЛЕКЦИИ НИКИТСКОГО БОТАНИЧЕСКОГО САДА

З.К. Клименко, В.К. Зыкова
ФГБУН «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН», г. Ялта, Россия, e-mail: *zykova_vera@mail.ua*

Сбор, поддержание и изучение биоразнообразия видов и форм рода *Rosa* L. было начато в Никитском ботаническом саду еще в год его основания, в 1812 г. На протяжении 200 лет здесь было интродуцировано около 200 видов и форм из разных эколого-географических районов Азии, Европы, Северной Африки и Северной Америки. Было проведено их тщательное изучение, выявление и отбор ценных видов и форм с целью использования их в озеленении в качестве подвоев для садовых роз при культивировании их в условиях как открытого, так и защищенного грунта, а также в качестве доноров важных признаков и свойств в селекции с целью создания оригинальных высокодекоративых толерантных жаро- и засухоустойчивых сортов с длительным ремонтантным цветением. В результате проведенных исследований было отобрано 44 вида и формы адаптированные к условиям Южного берега Крыма.

Для использования в качестве подвоя для садовых роз в условиях Южного берега и Присивашья Крыма было отобрано 4 вида и формы (3 формы *Rosa canina* L.: *R.c.* 'Chongar', *R. c. kirghisorum* Tkaczenko и *R. marginata* Waller. для открытого грунта и *R. indica* Lindley для условий защищенного грунта).

Для селекции в качестве доноров комплексной устойчивости к грибным заболеваниям - мучнистой росе (*Sphaerotheca pannosa* Lev. var. *rosae* Woronich.) и ржавчине (*Phragmidium disciflorum* James) отобрано 17 видов и форм: *R. alabukensis* Tkacz. sp. nova., *R. beggeriana* Schrenk., *R. bella* Rehd. et Wills., *R. corymbulosa* Robfe, *R. iberica* Stev., *R. omeiensis pteracantha* (Franchet) Rehd. et Wills., *R. pendulina* L., *R. pisocarpa* A. Gray, *R. rubiginosa* L., *R. roxburghii* Tratt., *R. rugosa* Thunb., *R. spinosissima altaica* (Wild.) Thory ex Rehd., *R. sp. inermis* DC , *R. sp. hispida* (Sims) Boom , *R. sp. pimpinellifolia* (L.) Hooker, *R. sveginzowii* Koechne, *R. tomentosa* Smith.

Рекомендованы для использования в селекции и озеленении 23 наиболее декоративных вида и формы: *R. banksiae* Aiton 'Alba', *R. banksiae* Aiton 'Lutea', *R. bengalensis* Persoon, *R. bracteata* Wendl., *R. centifolia* L., *R. chinensis minima* (Sims) Voss., *R. damascena trigintipetala* Dieck., *R. fedtschenkoana* Rgl., *R. foetida* Herrm., *R. foetida bicolor* (Jacq.) Willm., *R. foetida persiana* Rehd., *R. fortuneana* Lem., *R. hugonis* Hemsl., *R. moschata* Herrmann, *R. moyesii* Hemsley et Wilson, *R. multiflora* Thunb., *R. roxburghii* Tratt., *R. rugosa* Thunb., *R. sempervirens* L., *R. spinosissima altaica* (Wild.) Thory ex Rehd., *R. sp. inermis* DC , *R. sp. hispida* (Sims) Koechne, *R. wichura* Crep.

Установлено, что большинство наиболее адаптированных к условиям Южнобережья Крыма видов происходит из районов Древнего Средиземья, из флор близких по происхождению с Южным берегом Крыма.

Ключевые слова: *вид, род Rosa* L.*, коллекция, интродукция, селекция.*

Исследования выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 14-50-00079.

STUDY RESULTS OF SPECIES BIODIVERSITY OF *ROSA* L. GENUS FROM NIKITA BOTANICAL GARDENS COLLECTION

Z.K. Klymenko, V.K. Zykova
Nikita Botanical Gardens - National Scientific Centre, Yalta, Russia,
e-mail: *zykova_vera@mail.ua*

Collection, treatment and investigation of species and form biodiversity of *Rosa* L. genus was initiated in Nikita Botanical Gardens (NBG) in 1812, the year of establishment foundation. About 200 cultivars and forms from different ecological and geographical regions of Asia, Europe, North Africa and North America had been introduced here for 200 years. Thorough examination, revealing and sampling of valuable cultivars and forms were carried out to use them in landscaping as stocks for garden roses if cultivation in open and protected ground, and as a donor of important characters and properties to breed original highly ornamental, tolerant, heat- and drought-resistant sorts with prolonged remontant blooming period. As a study result there are 44 cultivars and forms adapted to conditions of South coast of the Crimea.

As a stock for garden roses being cultivated on South Coast of the Crimea and in Prisivashye of the Crimea the following forms and cultivars were sampled: 3 forms of *Rosa canina* L.: *R. c.* 'Chongar' , *R. c. kirghisorum* Tkaczenko and *R. marginata* Waller for open ground and *R. indica* Lindley was chosen for cultivation in protected ground.

As a donor of complex resistance to fungal diseases – mildew (Sphaerotheca pannosa Lev. Var. rosae Woronich.) and rust (Phragmidium disciflorum James) - 17 cultivars and forms were sorted out for selection.

23 the most ornamental cultivars and forms were recommended for breeding and landscaping

It was found out that majority of the most adaptive to conditions of South coast of the Crimea cultivars came from regions of Ancient Mediterranean, floras close to South Coast of the Crimea by origin.

Keywords: *cultivar, Rosa* L. *genus, collection, introduction, breeding*

Aknowlegment
This study was funded by research grant N 14-50-00079 of the Russian Science Foundation.

РАЗМНОЖЕНИЕ ЗИМОСТОЙКИХ ВИДОВ СЕМЕЙСТВА ORCHIDACEAE JUSS. АСИМБИОТИЧЕСКИМ МЕТОДОМ *IN VITRO*

Т.Ю. Коновалова, Н.А. Шевырева
Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина Российской академии наук (ГБС РАН),
г. Москва, Россия, e-mail: *konovtat@mail.ru*

Разработка методов размножения и культивирования орхидей, которые практически все относятся к охраняемым растениям, имеет решающее значение для сохранения биоразнообразия. Программа работы, начатой в 2000 г., включает испытание способов и режимов предпосевной обработки семян для разных видов орхидей, выявление оптимальных сред для асимбиотического проращивания их *in vitro*, подращивания сеянцев и пересадки их в грунт, изучение температурного режима содержания посевов. Основная цель работы – разработка надежных методов семенного размножения орхидей умеренного климата в условиях культуры, которые можно было бы рекомендовать для их разведения и сохранения, как в коллекциях ботанических учреждений, так и в цветоводстве.

Зрелые, а в некоторых случаях и зеленые семена представителей 30 родов орхидей были высеяны на питательные среды разного состава. Для зрелых семян опробовано несколько вариантов предпосевной обработки. Успешно удалось прорастить семена представителей родов *Cephalanthera, Coeloglossum, Cremastra, Cypripedium, Dactylorhiza, Epipactis, Goodyera, Gymnadenia, Habenaria, Herminium, Leucorchis, Liparis, Listera, Malaxis, Neottianthe, Nigritella, Orchis, Oreorchis. Platanthera, Spiranthes* (всего 43 вида). Но лишь небольшая часть их адаптировалась при высадке в открытый грунт, в том числе *Dactylorhiza baltica, D. fuchsii, D. maculata, D. praetermissa, Gymnadenia conopsea* и *Oreorchis patens* достигли генеративной стадии. Создана интродукционная популяция из сеянцев *D. fuchsii*, подрощенных до стадии цветения.

Предпосевную обработку зрелых семян в течение 10 мин. 1,5% серной кислотой, а затем 15 мин. 25% «Белизной» можно считать довольно универсальной для разных родов.

Среда Harvais с картофелем достаточно универсальна для проращивания и роста всходов. Кинетин более эффективный стимулятор прорастания, чем НУК и 2,4-Д. Представители родов *Cremastra*, *Dactylorhiza*, *Gymnadenia*, *Oreorchis*, *Platanthera*, а также *Cypripedium guttatum* после стратификации всходят без гормонов, иногда даже лучше, чем с ними.

Наиболее удачными для всех видов оказались высадки в грунт в начале лета, кроме *Cremastra variabilis* и *Oreorchis patens*, которые лучше высаживать в августе.

Применение асимбиотического посева позволяет ускорить вступление растений в фазу генеративного развития.

Ключевые слова: *асимбиотический, посев, Orchidaceae, in vitro*

ASYMBIOTIC SEED PROPAGATION OF SOME HARDY SPECIAS OF ORCHIDACEAE JUSS. *IN VITRO*

T.Yu. Konovalova, N.A. Shevyryeva
Main Botanical Garden named after N.V. Tsitsin of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, e-mail: *konovtat@mail.ru*

All hardy orchids are endangered and protected plants, so further development of propagation and cultivation methods are very important aspects of biodiversity conservation. The programe of studdies started in 2000 includes testing methods and modes of seed bleaching, optimal media for asymbiotic seed germination, proper stages for deflasking and adaptation under natural conditions.

Mature and in some cases immature seeds of some species belonging to the 30 genera of Orchidaceae were sown in different media. Several methods of seed bleaching and some modifications of Harvais, Chu and Mudge, Norstog, Malmgren were tested.

A lot of seedling of some species of *Cephalanthera*, *Coeloglossum*, *Cremastra*, *Cypripedium*, *Dactylorhiza*, *Epipactis*, *Goodyera*, *Gymnadenia*, *Habenaria*, *Herminium*, *Leucorchis*, *Liparis*, *Listera*, *Malaxis*, *Neottianthe*, *Nigritella*, *Orchis*, *Oreorchis*, *Platanthera*, *Spiranthes* were obtained (overall 43 species) *in vitro*. But only a small part of this plants survived under natural conditions in open grounds and reached flowering stage, among these *Dactylorhiza baltica*, *D. fuchsii*, *D. maculata*, *D. praetermissa*, *Gymnadenia conopsea* and *Oreorchis patens*. Introduction population of *D. fuchsii* was created in the Main Botanical Garden.

Presowing treatment with 1.5% sulfuric acid during 10 minutes and than 25% “Belizna” 15 minutes is efficient for different species. Harvais medium with potato works well for different genera. Kinetin is more effective for orchid seed germination than NAA и 2,4-D. *Cremastra*, *Dactylorhiza*, *Gymnadenia*, *Oreorchis*, *Platanthera* and also *Cypripedium guttatum* after cool treatment germinate without kinetin, in some cases even better than with it.

Early summer was turned to be the best time for placing seedling out on unsterile substratum in open ground for most of species in Moscow region. *Cremastra variabilis* and *Oreorchis patens* do best when planting out in august.

Asymbiotic pripagation of hardy orchids reduces time needed for getting flowering stage.

Keywords: *asymbiotic, sowing, Orchidaceae, in vitro*

К ВОПРОСУ ТЕХНОЛОГИЧНОСТИ МЕТОДА *IN VITRO* ДЛЯ МАССОВОГО ПРОИЗВОДСТВА РАСТЕНИЙ НЕКОТОРЫХ КОСТОЧКОВЫХ ПЛОДОВЫХ КУЛЬТУР

С.А. Корнацкий
Российский университет дружбы народов, г. Москва, Россия,
e-mail: *vitrolab@rambler.ru*

Метод *in vitro* давно и обоснованно позиционируется в научном мире как наиболее эффективный способ вегетативного размножения растений. Однако практическая значимость его в сфере производства посадочного материала, а, именно, плодовых культур, не столь очевидна, хотя элементы метода достаточно основательно отрабатывались, как отечественными, так и зарубежными учеными, применительно к таким породам как слива, вишня, черешня. Несмотря на успешность начальных этапов, при переходе к массовому производству существует проблема низкой воспроизводимости результатов исследований на этапах укоренения микрочеренков, адаптации микрорастений. Очень часто в научной литературе недостаточно освещены вопросы последующего доращивания микрорастений, которые при адаптации, достигая высоты 2-5 см, останавливаются в росте, после чего требуется весьма длительный период для возобновления ростовых процессов. Основной предлагаемый выход из ситуации - их зимовка в естественных условиях, что затягивает период доращивания растений, как минимум, до 2 лет.

Поэтому новые подходы к решению данной проблемы весьма актуальны, прежде всего, в плане большей управляемости и лучшей предсказуемости конечного результата и это явилось целью настоящих исследований.

Культивирование начинали традиционно, с использованием питательной среды Murashige и Skoog (1962). Пролиферацию культур проводили при концентрации 6-бензиламинопурина (6-БАП) 1,0 мг/л, элонгацию – при 0,05-0,1 мг/л. Для элонгации использовали колбы объемом 250 мл с 80-90 мл питательной среды, которые после посадки материала накрывали ватно-марлевыми (косметическими) дисками для обеспечения нормального воздушно-газового обмена. Для изучения особенностей корнеобразования микрочеренки подразделяли на ростовые группы – 1) 2-3 см и 2) 4-5 см. Режим культуральной комнаты был следующим: интенсивность освещения 5,0–5,5 клк, 16 часовой фотопериод и температура 24±1ºС.

Микрорастения высаживали на адаптацию в теплицу в начале мая, а после остановки роста в середине июня (через 1,5 мес.) их перемещали в холодильную камеру с температурой 5-7°С для прохождения периода покоя на срок 2,5 мес. Следующий (2-ой) цикл вегетации обеспечивался с начала сентября до середины октября. После покоя длительностью 2,5 мес., 3-й цикл роста с использованием досвечивания интенсивностью 5-6 клк проводили в период 1 января – 15 февраля. Третий период покоя (2,5 мес.) предшествовал высадке растений в конце апреля в открытый грунт.

В результате, из каждой колбы под ватно-марлевым диском удалось получить в среднем от 20 до 30 микрочеренков черешни и вишни высотой 4-5 см, укореняемость которых составила 75-90%, что превышало укоренямость микрочеренков высотой 2-3 см на 30-40%. Циклическая схема доращивания адаптированных микрорастений растений косточковых культур (с периодом покоя 2-2,5 мес.) на основе кратного моделирования периода покоя в искусственных условиях в течение календарного года оказалась эффективной. При чередовании 2-3 ростовых цикла с 2-3 периодами покоя за год можно выращивать растения высотой более 80 см, что позволяет пересаживать их в открытый грунт. Для реализации данной схемы требуется комплекс «холодильная камера-теплица».

Ключевые слова: *клональное микроразмножение, микрочеренки, укоренение, микрорастения, период роста, период покоя.*

TO THE QUESTION OF *IN VITRO* METHOD FOR SOME STONE FRUIT PLANTS MASS PRODUCTION PROCESSABILITY

S.A. Kornatskiy
Russian University of Peoples' Friendship, Moscow, Russia, e-mail: *vitrolab@rambler.ru*

In the scientific world *in vitro* method for a long time and reasonably positioned as the most effective way of plant vegetative propagation. However, its practical significance in the production of planting material, and, namely, fruit crops, is not so obvious, although the method of elements quite thoroughly worked out, both domestic and foreign scientists, in relation to such species as plum, cherry, cherries. Despite the success of the initial steps in the transition to mass production there is a problem of low reproducibility of the research results on the stages of micrografts rooting and microplants adaptation. Very often in the scientific literature insufficiently covered issues subsequent rearing microplants that during adaptation, reaching a height of 2-5 cm, stunted, and then requires a very long period for the resumption of growth. The main proposed a way out of the situation - they are wintering in the wild, which delays the period of rearing plants until at least 2 years.

Therefore, new approaches to solving this problem are very relevant, especially in terms of the greater manageability and better predictability of the final result and this was the purpose of the present study.

Cultivation was started conventionally, using Murashige and Skoog medium. Proliferation cultures were performed at concentrations of 6-benzylaminopurine (6-BAP) 1.0 mg/l, elongation - at 0.05-0.1 mg/l. For elongation using a 250 ml flask with 80-90 ml of culture medium, which after planting material covered with cotton-gauze (cosmetic) discs to ensure proper air-gas exchange. To study the characteristics of micrografts rooting subdivided into growth group - 1) 2-3 cm 2) 4-5 cm culture room conditions were as follows: illumination intensity 5.0-5.5 klux, 16 hour photoperiod and a temperature of 24±1°C.

Microplants planted for adaptation to the greenhouse in early May, and after growth arrest in mid-June (after 1.5 months.) They moved into the cooling chamber with a temperature of 5-7°C to undergo a period of rest for a period of 2.5 months. Next (2nd) cycle of vegetation was ensured since the beginning of September to mid-October. After a rest duration of 2.5 months, the third growth cycle with supplementary lighting intensity of 5-6 klx carried out in the period 1 January - 15 February. The third period of rest (2.5 months.) preceded the landing of plants in late April in the open ground.

As a result, from each flask under cotton-gauze disc was able to get an average of 20 to 30 sweet cherry and sour cherry micrografts 4-5 cm height, rooting which was 75-90%, which exceeded micrografts rooting 2-3 cm in height 30-40%. Cyclic scheme rearing adapted microplants plant stone fruits (with a rest period of 2-2.5 months.) on the base of multiple modeling dormancy period in artificial conditions during a calendar year has been effective. When the alternation of growth cycle of 2-3 with 2-3 periods of rest for the year can grow plants taller than 80 cm, which allows you to go with them in the open field without any problems. Required complex "cooling chamber-greenhouse" to implement this scheme.

Keywords: *clonal micropropagation, micrograftings, rooting microplants, growth period, dormancy period.*

ПОДГОТОВКА СЕМЯН РЯДА РЕДКИХ РАСТЕНИЙ УДМУРТИИ К ВВОДУ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO*

Е.Н. Кузнецова[1], О.Г. Баранова[2]
Удмуртский государственный университет, г. Ижевск, Россия
[1]e-mail: *pteris-2008@mail.ru*
[2]e-mail: *ob@uni.udm.ru*

Применение клонального микроразмножения как одного из методов сохранения редких видов растений требует учёта особенностей не только биологии исчезающего вида, но и самого метода. Введение растительного эксплантa в культуру *in vitro* является начальным этапом микроразмножения и одним из самых трудоемких. Решающую роль в успешности данного этапа и, как следствие, всех последующих, является применение стерилизующих агентов, незначительно снижающих жизнеспособность эксплантa. В качестве растительного эксплантa можно использовать различные части растения, но для сохранения редких видов наиболее актуальным является применение семян.

Цель данной работы - поиск стерилизующих агентов, оказывающих наименьшее влияние как на всхожесть семян, так и на дальнейшее развитие полученных проростков редких видов *Pulsatilla flavescens* (Zämelis) Tzvelev и *Aster amellus L.*, занесенных в Красную книгу Удмуртской Республики (2012).

В ходе исследования эксперимент проводился в два этапа: на первом этапе осуществлялась оценка лабораторной всхожести в нестерильных условиях, на втором производился ввод семян изученных видов в культуру *in vitro*. Опыты осуществлялись по общепринятым методикам проращивания семян и клонального микроразмножения (Бутенко, 1999; Международные правила анализа семян, 1984 и др.).

Эксперименты показали, что семена данных видов имеют морфологический тип покоя, что позволяет не применять предпосевную подготовку. Наилучшие показатели всхожести наблюдаются при проращивании семян исследованных видов при температуре 25°C и наличии освещения (всхожесть семян *Aster amellus* составила 60,0±5,8%; всхожесть семян *Pulsatilla uralensis* - 83,3±3,3% - 93,3±3,3%).

Стерилизация сочетанием 70%-ного этилового спирта и 1%-ного нитрата серебра незначительно снижает всхожесть семян *Aster amellus* и оказывает малое влияние на развитие проростков, т.е. данный вариант стерилизации является самым щадящим среди выбранных стерилизующих агентов (показатель всхожести составил 52,5±7,5%). Для семян *Pulsatilla uralensis* самым щадящим вариантом стерилизации оказалось сочетание 70%-ного этилового спирта и 15%-ной перекиси водорода (всхожесть составила 90,0±5,8%).

Однако применение стерилизующих агентов в обоих случаях привело к растянутому прорастанию и увеличению длительности начальных этапов онтогенеза, при этом отмечено наличие ряда аномалий в развитии проростков.

Ключевые слова: *редкие растения, прорастание семян, развитие растений in vitro, Aster amellus, Pulsatilla uralensis*

SOME UDMURTIA'S RARE SPECIES SEEDS PREPARATION TO *IN VITRO* CULTURE INTRODUCTION

E.N. Kuznetsova[1], O.G. Baranova[2]
Udmurt state university, Izhevsk, Russia
[1] e-mail: pteris-2008@mail.ru
[2] e-mail: ob@uni.udm.ru

The use of clonal micropropagation as one of the methods of rare plant species conservation of requires accounting the features not only biology for rare species, but the method itself. The input of plant explants *in vitro* is the initial stage of clonal micropropagation and it is one of the most laborious. The crucial role in success of this stage and all the next stages is the use of sterilizing agents, that slightly reduce the vitality of explants. Different parts of plant can be used as explant, but for conservation of rare species the most relevant explants are seeds.

The main goal of present research is the search of sterilizing agents with minimal influence not only on seed germination but also on further development of obtained seedlings of rare species *Pulsatilla flavescens* (Zämelis) Tzvelev and *Aster amellus* L., that are listed in the Red book of Udmurt Republic (2012).

The experiment was conducted in two stages: the first stage was an estimation of laboratory germination in unsterile conditions, the second stage was input of seeds to *in vitro* culture. The experiments were carried out by standard techniques of seed germination and clonal micropropagation (Butenko, 1999; International rules of seed analysis, 1984, etc.).

The experiments demonstrated that the seeds of these species have morphological type of dormancy that allows us not to use a presowing treatment. The best results of germination were observed under the temperature of 25°C and lighting (germination capacity of *Aster amellus* was 60.0±5.8%; germination capacity of *Pulsatilla utralensis* was 83.3±3.3% to 93.3±3.3%).

Sterilization by combination of 70% ethyl alcohol and 1% silver nitrate slightly reduces the germination capacity of *Aster amellus* and has little influence on the development of seedlings, i.e. this sterilization option is the most gentle among the selected sterilizing agents (germination ability was 52.5±7.5%). For *Pulsatilla uralensis* seeds the most gentle sterilization option was combination of 70% ethyl alcohol and 15% hydrogen peroxide (germination ability amounted 90.0±5.8%).

Use of sterilizing agents in both cases led to long-drawn germinating and increased the duration of the initial stages of ontogeny, at the same time a number of anomalies were noticed in seedlings development.

Keywords: *rare plants, seed's germination, development of plants in vitro, Aster amellus, Pulsatilla uralensis*

ФОРМЫ ОТБОРА, ВОССОЗДАНИЕ И СОХРАНЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ В ЖИЗНЕННОМ ЦИКЛЕ *PINUS SYLVESTRIS*

Н.Ф. Кузнецова
ФГБУ «ВНИИЛГИСбиотех» (Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии), г. Воронеж, Россия,
e-mail: *ekogenlab@gmail.ru*

Развитие саморегулирующихся систем, к числу которых относятся лесные экосистемы, базируется на трех принципах сохранения – сохранение генетического разнообразия, нормы вида и устойчивости. Цель работы с позиции нормы изучить закономерности формирования популяционного генофонда *Pinus sylvestris* L. Показано, что его развитие идет в направлении от генетического разнообразия к устойчивости; от минимальной к максимальной генотип-средовой связи. Ведущая роль принадлежит отбору, формы которого действуют на предэмбриональном, эмбриональном и постэмбриональном этапах и во время их смены. Каждое поколение леса начинает свое развитие с воссоздания генетического разнообразия. Избыточное размножение и рекомбинационная изменчивость ведут к возникновению огромного числа генетически неидентичных мужских и женских гамет. По данным Т.М. Некрасовой (1977) обилие пыльцы в сосновых лесах составляет 200-250 пыльцевых зерен на 1 мм^2. Их спектр существенно шире, чем таковой у исходной популяции: на вариационной кривой количество редких генотипов увеличивается, нормообразующая зона становится шире, а связь с прежней средой ослабевает. На предэмбриональном этапе вектор отбора направлен на удаление из первоначального спектра гамет генетически нарушенных, энергетически слабых, инбредных и неадаптированных генотипов. Анализ пустых семенных капсул показал, что отбор при переходе на эмбриональный этап меняет по отношению к лидерам предыдущего этапа свое направление. Удаление их из репродуктивного процесса, по-видимому, связано с требованиями, которые предъявляет оплодотворение к состоянию генетического материала гамет. Слияние гетерогенных гамет дает начало новым комбинациям генов, расширяя генотипическую изменчивость зигот. Во время эмбриогенеза зародыши вступают в конкурентные отношения, в ходе которых выживает лидирующий зародыш, а остальные погибают. Их развитие протекает внутри шишек в относительно нормализированных условиях. Поэтому семена преадаптированы к региональным условиям, но тесно не сцеплены с ними, что необходимо для освоения различных мест обитания. При анализе качества семян по фракциям (крупные: средние: мелкие) установлено, что семенное потомство крупных семян характеризуется пониженной жизнеспособностью; большая часть из них погибает при прорастании или в течение 1-го вегетационного сезона. Т.е., если расширение фенотипической изменчивости происходит в основном на базе семян средней и крупной фракции, то в генофонде сеянцев преобладающими являются генотипы нормообразующей зоны. Семена, покидая материнское растение, попадают в разные условия и новая среда селектирует потомство на совместимость с собой по принципу взаимодействия «генотип-среда». Интенсивность отбора по ходу онтогенеза очень высокая – 1:100 (Семериков и др., 1996). Селективное преимущество имеют деревья приближенные к генотипической и фенотипической норме вида, что подтверждено экспериментально. Так, на территории Русской равнины межпопуляционная изменчивость сосны по морфологическим, цитогенетическим и молекулярно-генетическим признакам составляет 1-6% (Мамаев, 1973; Романовский, 1994; Санников и др., 1997, 2002, 2003; Буторина и др., 2001; и др.). Генотип-средовая связь со своим местообитанием достигает максимума, что во многом обеспечивает устойчивость и жизнеспособность сосновых лесов в постоянно колеблющейся среде.

Ключевые слова: *сосна обыкновенная, генотип, генофонд, генетическое разнообразие, генотип-средовая связь*

SELECTION FORMS, RESTITUTION AND CONSERVATION OF GENETIC DIVERSITY IN *PINUS SYLVESTRIS* LIFE CYCLE

N.F. Kuznetsova
FGBI "All-rusRIFGBB" (All-Russian Research Institute of Forest Genetics, Breeding and Biotechnology), Voronezh, Russia, e-mail: *ecogenlab@gmail.ru*

Development of self-regulating systems, which include the forest ecosystems, is based on three principles of conservation – conservation of genetic diversity, species norm and stability. The purpose of this work is a study from the norm position the particularity of the population gene pool formation of *Pinus sylvestris* L. It is shown that its development proceeds in the direction from a genetic diversity to stability; from a minimum to maximum genotype-environment connection. The leading role belongs to the stabilizing selection, forms of which act on the pro-embryonic, embryonic and post-embryonic stages and during their change. Each generation of forest begins its development with the genetic diversity restitution. Superfluous reproduction and recombination variability lead to the emergence of a huge number of genetically non-identical male and female gametes. According to the T.P. Nekrasova data (1977) the pollen abundance in a pine forests amounts to 200-250 pollen grains per 1 mm^2. Their spectrum is significantly wider than that of the initial population: the number of rare genotypes on a variation curve is increased, the zone of species norm becomes wider, and the genotype-environment connection with the previous environment weakens. On the pro-embryonic stage a vector of selection directs at removing from the initial spectrum of gametes a genetically broken, energetically weak, inbred and non-adapted genotypes. Analysis of empty seed capsules showed that during the transition to the embryonic stage a selection towards the leaders of previous stage changes its direction. Deleting them from reproductive process, apparently, connected with the demands, which makes the fertilization for genetic material state of gametes. Syngamy of heterogeneous gametes gives rise to a great number of gene combinations, expanding a genotypic variability of zygotes. During embryogenesis, the embryos come into a competitive relationship, in which the leading embryo survives, and the rest die. Their development occurs inside the cones in relatively normalized conditions. Therefore a seeds pre adapted to regional conditions, but are not closely linked with them, which is necessary for the development in different habitats. Analyzing the seed quality by fractions (large: middle: small), we found that the seed progeny of large seeds is characterized by lowered viability; a main part of it dies at germination, or during 1st vegetation season. I.e., if the extension of phenotypic variability occurs mainly on the basis of seeds of the middle and large fractions, the genotypes of the norm zone seedling gene are the predominant. Seeds, leaving the parent tree, catch in different conditions and new environment selects the seed progeny for compatibility with it by the principle of "genotype-environment" interaction. During ontogenesis the intensity of selection is very high – 1:100 (Semerikov et al., 1996). Selective advantages have the trees closest to the genotypic and phenotypic species norm that is experimentally confirmed. On the Russian plain territory the interpopulation variability of Scots pine on morphological, cytogenetic and molecular-genetic traits is 1-6% (Mamaev, 1973; Romanovsky, 1994; Sannikov et al., 1997, 2002, 2003; Butorina et al., 2001; etc.). Genotype-environment relationship with their habitat reaches a maximum, which largely provides the stability and viability of pine forests in the constantly fluctuating environment.

Keywords: *Scots pine, genotype, gene pool, genotypic and phenotypic diversity, genotype-environment connection*

СОХРАНЕНИЕ РАСТЕНИЙ *IN SITU* И *EX SITU* В ИНДУСТРИАЛЬНО РАЗВИТЫХ РЕГИОНАХ (НА ПРИМЕРЕ КЕМЕРОВСКОЙ ОБЛАСТИ)

А.Н. Куприянов
Кузбасский ботанический сад ФИЦ УУХ СО РАН, г. Кемерово, Россия,
e-mail: *kupr-42@yandex.ru*

Кемеровская область расположена в юго-восточной части Западно-Сибирской низменности, в пределах бассейна реки Томь и занимает площадь 95,7 тыс. км^2 (0,6% территории РФ).Главной особенностью области является неравномерное распределение населения и промышленных предприятий по территории. В пределах Кузнецкой котловины, занимающей площадь около 30%, проживает 70% населения и сосредоточено наибольшее количество промышленных предприятий.

Основной угрозой биологическому разнообразию является добыча угляоткрытым и закрытым способом. В Кузнецкой котловине расположено порядка 150 предприятий по добыче угля, а площадь нарушенных земель составляет не менее 100 тыс. га. В районах с интенсивной добычей угля наблюдается нарушение растительного покрова на 80–95%, высокая степень загрязнения атмосферы выбросами, поверхностнымистоками. Другой особенностью региона является наличие незаселенных горных территорий Горной Шории, Кузнецкого Алатау, Салаирского кряжа.

Флора области насчитывает 1671 видов, из которых 1397 видов – апекофиты (растения местной флоры). В Красную книгу Кемеровской области (Том «Растения и грибы») вошло 165 видов, в том числе 26 видов, включенных Красную книгу Российской Федерации.Большинство видов (100) найдено в 1–5 местонахождениях, 33 вида обнаружены в 5–10 местонахождениях, 29 видов обнаружены в десяти и более местонахождениях, для двух видов (исчезнувших с территории области: *Paeonia hybrid* Pall., *Trapa natans* L.) местонахождения не установлены. Недостаточно информации о состоянии популяций у 148 видов. Прямой угрозе уничтожения подвержено 24 вида (*Allium vodopjanovae* Friesen, *Trinia ramosissima* Ledeb., *Hedysarum turczaninovii* Peschkova, *Phlox sibirica* L. и др.). Потенциальные косвенные угрозы, связанные с хозяйственным освоением территории, существуют для 92 видов. Для 46 редких и редчайших видов прямой антропогенной угрозы уничтожения пока не выявлено. *In situ* изучено состояние популяций 45 видов (*Asarrum europaenum* L., *Corallorhiza trífida* Chatel., *Cypripedium calceolus* L., *C. Macranthon* Sw., *Epipactis helleborine* (L.) Grantz, *E. palustris* (L.) Crantz.. *Mitella nud*a L., *Nuphar pumila* (Timm) DC., *Pyrola media* Sw., *Stipa pennata* L., *S. Zalesskii* Wilenski, *Ziziphora clinopodioides* Lam.), *ex situ* в коллекциях ботанического сада изучено 27 видов (*Leibnitzia anandria* (L.) Turcz., *Linum perenne* L., *Aquilegia sibirica* Lam., *Aconitum pascoi* Worosch., *Gypsophila patrinii* Bieb. и др.). За двумя видами (*Tilia sibirica* Bayer, *Erythronium sibiricum* (Fisch. et C.A. Mey.) Kryl.), проводится постоянный мониторинг популяций *in situ.* При проектировании размещения новых угольных разрезов и шахт, в случаях выявления растений, внесенных в Красные книги, разрабатываются мероприятия по переносу популяции в аналогичные местообитания вне горного отвода, либо в условия ботанического сада с последующей реинтродукцией.

Ключевые слова: *охрана растений, ex situ, in situ, Красная книга, интродукция*

CONSERVATON OF PLANTS *IN SITU* AND *EX SITU* IN THE INDUSTRIAL REGIONS (THE CASE OF KEMEROVO REGION)

A.N. Kuprijanov
Kuzbass Botanical Garden, SBRAS, Kemerovo, Russia, e-mail: *kupr-42@yandex.ru*

Kemerovo Region is located in the south-eastern part of the West-Siberian plain within the Tom river basin and occupies the area of 95.7 thousand km^2 (0.6% of the area of Russian Federation). The main peculiarity of the region is uneven distribution of the population and industrial enterprises in the area. Within the Kuznetskaya basin the area of which is about 30% of the region 70% of population live and most industrial enterprises are located.

The main threat to the biodiversity is open-pit and underground coal mining. There are about 150 coal-producing enterprises in the Kuznetskaya basin, and the area of disturbed lands is more than 100 thousands ha. The site swith intensive coalmining display 80 – 95% of vegetation cover distortion, a high degree of air pollution with emissions and surface discharges. Another characteristic of the region is unpopulated mountain areas of the Mountain Shoriya, Kuznetsky Alatau and Salairsky ridge.

The flora of the region consists of 1671 species including 1397 species that grow only in this region. The Red Book of the Kemerovo Region (the volume "Plants and mushrooms") includes 165 species, 26 species are included into the Red Book of Russian Federation. Mostspecies (100) arefoundin 1–5 locations, 33 species–in 5–10 locations, 29 species are found in 10 or more locations; the locations of two species (extinct in the region: *Paeonia hybrida* Pall., *Trapa natans* L.) are not found. There is lack of information about the conditions of populations for 148 species. 24 species are under the threat of extinction (*Allium vodopjanovae* Friesen, *Trinia ramosissima* Ledeb., *Hedysarum turczaninovii* Peschkova, *Phlox sibirica* L. etc.). There are potential threats to 92 species, caused by the development in the region. The man-induced threat of extinction for 46 rare species has not been found yet. The conditions of the populations of 45 species have been studied *in situ* (*Asarrum europaenum* L., *Corallorhiza trífida* Chatel.,*Cypripedium calceolus* L., *C. macranthon* Sw., *Epipactis helleborine* (L.) Grantz, *E. palustris* (L.) Crantz.. *Mitella nud*a L., *Nuphar pumila* (Timm) DC., *Pyrola media* Sw., *Stipa pennata* L., *S. Zalesskii* Wilenski, *Ziziphora clinopodioides* Lam.); *ex situ,* in the collections of the botanical garden, 27 species have been studied (*Leibnitzia anandria* (L.) Turcz., *Linum perenne* L. *Aquilegia sibirica* Lam., *Aconitum pascoi* Worosch., *Gypsophila patrinii* Bieb. etc.). The populations of two species (*Tilia sibirica* Bayer, *Erythronium sibiricum* (Fisch. et C.A. Mey.) Kryl.) are monitored *in situ.* When new coalmines are planned, in case rare plants included into the Red Book are found in the area, the measures are developed to transfer the population to similar locations or the botanical garden for further reintroduction.

Keywords: *plant protection, ex situ, in situ, Red Book, introduction*

РОССИЙСКАЯ ПРАКТИКА СОХРАНЕНИЯ БИОРАЗНООБРАЗИЯ ПРИ ДОБЫЧЕ УГЛЯ

Ю.А. Манаков
Кузбасский ботанический сад ФИЦ УУХ СО РАН, г. Кемерово, Россия,
e-mail: *kem401@gmail.com*

Угольные компании оказывают как прямое, так и косвенное воздействие на биологическое разнообразие. Строительство объектов по основному виду деятельности приводит к коренному разрушению природных ландшафтов. Естественное восстановление ландшафтных компонентов растягивается на сотни лет.

На уровне ООН сохранение биоразнообразия поставлено в ряд главных глобальных проблем. Руководящим документом являетсяКонвенция о биологическом разнообразии принятая главами правительств 150 стран в 1992 году на саммите в Рио-де-Жанейро. За два десятилетия усилия мирового сообщества позволили сформировать комплексный подход к управлению сохранением биоразнообразия, который предлагает производственным компаниям решения, ориентирующих бизнес на новые возможности по приобретению выгод и/или снижение корпоративных рисков (TEEB «The Economics of Ecosystems and Biodiversity», Программа «Бизнес и биоразнообразие: механизмы компенсации», IAIA «the International Association for Impact Assessment», Кодекс Bettercoal для угольной промышленности и другие документы).

В России среди горнодобывающих компаний вопросы сохранения биоразнообразия пока еще не имеют широко распространения. Тем не менее, в Кемеровской области в последнее время внедряются методы, основанные на принципах предотвращения, сокращения техногенного воздействия, восстановление и компенсация ущерба биоразнообразию (БР). Основные направления работы включают: комплексную экологическую оценку с применением ГИС-технологий, экологический мониторинг, разработка технологий восстановления биоразнообразия на нарушенных территориях, компенсационные мероприятия и создание оффсетов, совершенствование регионального законодательства.

Данная работа проводится Проектом ПРООН-ГЭФ/Минприроды России «Задачи сохранения биоразнообразия в политике и программах развития энергетического сектора России" при содействии Администрации Кемеровской области и Управления Росприроднадзора по Кемеровской области. Всего реализуется 15 проектов, которые должны обеспечить региональные власти и угольные компании современными технологиями и методами сохранения биоразнообразия при угледобыче. Условием цивилизованной работы угольных предприятий является проведение научных исследований для определения фактической экологической ситуации в районе работ на стадии разработки раздела проектной документации «Оценка воздействия на окружающую среду». На основе материалов полевых работ можно определить размещение ценных типов экосистем, редких и исчезающих видов животных и растений, представить план компенсационных мероприятий для сохранения БР, разработать программу производственного экологического мониторинга для оценки степени влияния производства за пределами земельного отвода.

В связи с уничтожением степных ландшафтов в Кузбассе, в настоящее время особую актуальность приобрела технология реставрации экосистем, уничтоженных в процессе добычи угля. Получены результаты первых экспериментов восстановления лугово-степных сообществ на отвалах, что открывает перспективу для восстановления нарушенных территорий в промышленных масштабах. Важным этапом является создание оффсетов, классическим примером которых является создание особо охраняемых территорий (ООПТ) за пределами земельных отводов предприятий. Впервые в практике российских угольных компаний в Кузбассе создано две региональных ООПТ для сохранения степных ландшафтов.

В 2015 году вышел «Сборник инновационных решений по сохранению биоразнообразия для угледобывающего сектора», в котором представлены материалы полноценного безнес-кейса по управлению сохранением биоразнообразием для угольных компаний России.

Ключевые слова: *биоразнообразие, угольная промышленность, минимизация техногенного воздействия*

RUSSIAN EXPERIENCE OF BIODIVERSITY PROTECTION WHILE COAL MINING

Yu.A. Manakov
Kuzbass Botanical Garden,SBRAS, Kemerovo, Russia, e-mail: *kem401@gmail.com*

Coal-mining companies have direct and indirect influence on the biodiversity. Construction of basic activity works results in devastation of natural landscapes. Natural regeneration of landscape components may last as long as hundreds of years. United Nations Organization considers the protection of biodiversity to be one of the global issues. The regulatory document is Biodiversity Convention signed by the heads of the governments of 150 countries at the summit in Rio de Janeiro in 1992. Duringatwo-decadeperiodtheworldcommunitymade great efforts to form a complex approach to managing biodiversity conservation, which offers to the companies the solutions giving new possibilities to get profit and/or minimize the risks (TEEB «The Economics of Ecosystems and Biodiversity», Program «Business and biodiversity: compensation mechanisms», IAIA «the International Association for Impact Assessment», BettercoalCode for coal-mining industry, etc.).

In Russia the issues of biodiversity protection are not popular with coal-mining companies yet. Nevertheless, the methods based on the principles of man-induced impact prevention and biodiversity restoration have been implemented recently. The main trends include:complex ecological assessment using GIS technologies, ecological monitoring, development of technologies on biodiversity restoration in disturbed lands, compensation measures and creating offsets, regional legislation improvement.

This work is done within the framework sthe Project “UNDP-GEF”/Ministry of Natural Resources and Environment of the Russian Federation “Main streaming biodiversity conservation into Russia’s energy sector policies and operations" with the assistance of the authorities of the Kemerovo Region and Federal Service for Supervision of Natural Resource Usage in the Kemerovo Region. 15 projects are being implemented; they are to provide the regional authorities and coal-mining companies with modern technologies and methods of biodiversity conservation while coal-mining. The requirement for civilized work of coal-mining enterprises is to carry out research to determine the ecological situation in the work site at the stage of developing the design documentation section «The assessment of the impact on the environment». Based on the field research results it is possible to determine the location of valuable ecosystemt ypes, rare and endangered species of animals and plants, to work out a plan of compensating measures to protect biodiversity and the program of ecological monitoring for assessment of the degree of the impact of the enterprise beyond the site boundaries.

In connection witht he destruction of steppe landscapes in Kuzbass the technology of restoration of ecosystems damaged due to coal mining has become an extremely urgent issue. The obtained results of the first experiments on restoration of meadow-steppe communities on dumping sites display a promising perspective of restoration of disturbed lands on an industrial scale.

An important stage is creating off sets, a typical example of which is a specially protected area beyond the boundaries of an industrial site. For the first time in Russian coal-mining companies’ activity in Kuzbass two specially protected areas have been created to preserve steppe landscapes.

In 2015 «Compendium of innovative solution on biodiversity protection for coal-mining sector» was published; it contains a business-case for management of biodiversity protection for coal-mining companies in Russia.

Keywords: *biodiversity, coal-mining industry, minimization of man-induced impact*

ОТДЕЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ ПРОРАСТАНИЯ СЕМЯН *IN VITRO* НЕКОТОРЫХ ЭНДЕМИЧНЫХ И РЕЛИКТОВЫХ ВИДОВ ФЛОРЫ ГОРНОГО КРЫМА

О.В. Митрофанова, Н.П. Лесникова-Седошенко, Н.Н. Иванова, С.В. Челомбит, И.В. Жданова, А.Р. Никифоров, И.В. Митрофанова
ФГБУН «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН», г. Ялта, Россия, e-mail: *irimitrofanova@yandex.ru*

Проблема сохранения биоразнообразия, особенно дикорастущих эндемичных и реликтовых видов растений, произрастающих в горных районах Крыма, становится все более актуальной. В связи с этим в Никитском ботаническом саду начаты комплексные исследования ботаников и биотехнологов по повышению уровня семенного возобновления у некоторых видов растений.

Объектом исследования служили семена *Heracleum ligusticifolium* M. Bieb., *Sobolewskia sibirica* (Willd.) P.W. Ball, *Lagoseris callicephala* Juz., *Lagoseris purpurea* (Willd.) Boiss., *Scrophularia exilis* Popl., *Silene jailensis* N.I. Rubtzov, *Valerianella falconida* Schvedtsch., *Lamium glaberrimum* (K. Koch) Taliev, введенные в условия in vitro. Разработана система стерилизации семян. Семена стерилизовали 1 мин в 70% этаноле, 10 мин в растворе «Dez Tab» (China), содержащем 0,3-0,4% активного хлора, затем в 1% растворе Thimerosal (Sigma, USA) с добавлением 2-3 капель детергента Tween-20. После каждого реагента экспланты трижды промывали в стерильной дистиллированной воде и помещали в культуральные сосуды на безгормональную питательную среду Монье (Monnier, 1973). При этом жизнеспособность семян у исследуемых видов составила от 12,5 до 95,83% и зависела от генотипа.

Для повышения коэффициента размножения исследуемых растений необходимо было изучить регенерационный потенциал микропобегов и микрочеренков, полученных в условиях *in vitro* проростков. С этой целью в агаризованную питательную среду Мурасиге и Скуга (Murashige, Skoog, 1962) добавляли цитокинин БАП в концентрации 0,25; 0,5 мг/л и ауксин НУК в концентрации 0,15 мг/л. При этих условиях выращивания через 28 сут было получено множественное побегообразование. Коэффициент размножения после третьего субкультивирования достигал от 4 до 48 микропобегов на эксплант в зависимости от генотипа.

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

PARTICULAR FEATURES OF SEED GERMINATION *IN VITRO* IN SOME ENDEMIC AND RELICT SPECIES OF MOUNTAIN CRIMEA FLORA

O.V. Mitrofanova, N.P. Lesnikova-Sedoshenko, N.N. Ivanova, S.V. Chelombit, I.V. Zhdanov, A.R. Nikiforov, I.V. Mitrofanova
Nikita Botanical Gardens - National Scientific Centre, Yalta, Russia,
e-mail: *irimitrofanova@yandex.ru*

The problem of biodiversity conservation, particularly for wild endemic and relict plant species, native to the mountainous areas of the Crimea, is becoming increasingly important. In this regard, Nikita Botanical Garden started complex botanical and biotechnological studies to in order to increase seed reproduction in some species.

The object of the study were the seeds of *Heracleum ligusticifolium* M. Bieb., *Sobolewskia sibirica* (Willd.) P.W. Ball, *Lagoseris callicephala* Juz., *Lagoseris purpurea* (Willd.) Boiss., *Scrophularia exilis* Popl., *Silene jailensis* N.I. Rubtzov, *Valerianella falconida* Schvedtsch., *Lamium glaberrimum* (K. Koch) Taliev under *in vitro* conditions. The system of seed sterilization was developed. Seeds were sterilized for 1 minute in 70% ethanol, 10 min in «Dez Tab» solution (China), containing 0.3-0.4% active chlorine, and then in 1% Thimerosal (Sigma, USA) solution with the addition of 2-3 drops Tween-20 detergent. After each reagent explants were washed three times in sterile distilled water and placed into the culture vessels with hormone free Monier medium (Monnier, 1973). Thus seed viability in studied species ranged from 12.5 to 95.83% and dependent on genotype.

To increase the multiplication rate of the tested plants it was necessary to study the regeneration capacity of microshoots and microcuttings of *in vitro* cultured plantlets. To reach this purpose cytokinin BAP at concentrations 0.25, 0.5 mg/l and auxin NAA at concentration of 0.15 mg/l were added in agarized Murashige and Skoog medium (Murashige, Skoog, 1962). Under those growing conditions multiple shoot formation was obtained after 28 days. Reproduction rate after the third subculture was from 4 to 48 microshoots per explant, depending on the genotype.

Keywords: *rare species, the culture of organ and tissue culture media, regeneration microshoots*

ИЗМЕНЧИВОСТЬ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ *LARIX SIBIRICA* В ГОРОДСКИХ ПОСАДКАХ Г. МОСКВЫ

А.В. Новиков, О.В. Сумарукова
ФГБОУ ВО Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева, г. Москва (РГАУ – МСХА им. К.А. Тимирязева)
Россия, г. Москва, e-mail: *oiiecology@mail.ru*

В условиях городской среды хвойные наиболее подвержены антропогенному воздействию, как следствие происходят изменения на всех структурных уровнях древесных насаждений. Лиственница сибирская является однодомным листопадным деревом и относится к группе мезоксерофитов, олиготрофов, очень светолюбива. С такими требованиями к условиям произрастания ей легче приспособиться к специфике городской среды, чем другим хвойным растениям. Среди хвойных в урбоэкосистемах наибольшей экологической пластичностью обладают лиственницы.

Началом интродукции лиственницы в Москве является посадка царем Петром I *Larix sibirica* в 1706 г. на территории современного ботанического сада МГУ им. Ломоносова. Результатом успешной интродукции являлись как единичные, так и аллельные посадки лиственницы в Москве. Наиболее часто встречаются лиственница европейская, Сукачева и сибирская.

В работе проанализированы морфометрические и весовые характеристики шишек *Larix sibirica*, а также морфоструктура кроны.

Результаты показали, что в экологически неблагоприятных условиях у лиственницы наблюдается изменение морфометрических параметров, снижение высоты стволов и протяженности кроны.

Ряд биологических свойств лиственницы отличают ее от других представителей семейства Pinaceae, таких как ежегодная листопадность, отсутствие органического покоя у генеративных и вегетативных органов в зимний период, что свидетельствует о чрезвычайно высокой пластичности лиственницы, способной адаптироваться к неблагоприятным экологическим условиям.

Ключевые слова: *Larix sibirica, морфоструктура кроны, морфометрические характеристики шишек, мезоксерофиты, олиготрофы*

VARIABILITY OF *LARIX SIBIRICA* MORPHOLOGICAL PARAMETERS IN URBAN PLANTINGS OF MOSCOW

A.V. Novikov, O.V. Sumarukova
Russian State Agrarian University - Timiryazev Moscow Agricultural Academy (RSAU – TMAA or RSAU – MAA named after K.A. Timiryazev)
Russia, Moscow, e-mail: *oiiecology@mail.ru*

Coniferous plants are most exposed to anthropogenic impact in urban environment and as a consequence of this there are changes on all structural levels of tree plantations. *Larix sibirica* is a monoecious deciduous tree belonging to the group of mesoxerophytes, oligotrophic plants and is very light-demanding. Due to such requirements to growth conditions it is much easier for larix to adjust itself to a specific character of urban environment than for other coniferous plants. Larix possesses the highest ecological flexibility among coniferous plants in urban ecological systems.

The introduction of larix in Moscow took place in 1706 when Tsar Peter the Great planted *Larix sibirica* on the territory of modern botanical garden of Lomonosov Moscow State University. The result of successful introduction was planting of single plants and allelic planting of larix in Moscow. Predominant larixes are *Larix decidua*, *Larix sukaczewii* and *Larix sibirica*.

In this study morphometric and weight characteristics of cones as well as characteristics of morphological structure of crown of *Larix sibirica* were analyzed.

The results showed that due to environmentally unfriendly conditions larix demonstrates the change of morphometric characteristics, loss of trunks height and crown length.

There is a number of biological properties of larix that distinguish it from other representatives of Pinaceae family, such as annual defoliation, lack of biological rest of generative and vegetative organs in winter, reflecting the extremely high flexibility of larix that can adopt to adverse environmental conditions.

Keywords: *Larix sibirica, morphological structure of crown, morphometric characteristics of cones, mesoxerophytes, oligotrophic plants*

СОЗДАНИЕ *IN VITRO* НОВЫХ, УСТОЙЧИВЫХ К БОЛЕЗНЯМ СОРТОВ ЛЬНА – ОДИН ИЗ СПОСОБОВ ПОВЫШЕНИЯ БИОРАЗНООБРАЗИЯ КУЛЬТУРЫ

Н.В. Пролётова, Л.П. Кудрявцева
ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт льна», г. Торжок,
e-mail: *nataljaprljotva@rambler.ru*

Биоразнообразие выполняет регулирующую функцию в осуществлении всех биогеохимических, климатических и других процессов на Земле. Каждый вид, существующий на планете, вносит свой вклад в обеспечение устойчивости не только локальной экосистемы, но и Биосферы в целом.

Лён – ценнейшая техническая культура с расширенным ареалом произрастания. Однако почвенная патогенная микрофлора создаёт барьеры для выращивания льна с высококачественными параметрами льнопродукции. Методами классической селекции создаются новые сорта, устойчивые к ряду заболеваний (фузариозное увядание, ржавчина). В то же время, ежегодные изменения в ценозе болезней льна, создают новые, оптимальные условия для их проявления, причём с различной степенью патогенности. В биосистемах растений льна важную роль в регулировании устойчивости к фитопатогенам играют биотехнологические приёмы создания *in vitro* новых, устойчивых генотипов.

В результате исследований нами созданы эффективные селективные системы «лён - фузариевая кислота» и «лён – культуральный фильтрат гриба *Colletotrichum lini* Maans et Bolley», позволяющие повышать биоразнообразие культуры льна и получать новые формы, устойчивые к фузариозному увяданию или антракнозу.

Для создания генотипов льна, устойчивых к фузариозному увяданию, необходимо в питательную среду Sh-2 вносить фузариевую кислоту в концентрации 0,1 мг/л и инкубировать пыльники льна, находящиеся на стадии одноядерной вакуолизированной микроспоры, до формирования морфогенного каллуса. Каллус следует переносить на среду Sh-2, содержащую 10 мг/л фузариевой кислоты, и пассировать до формирования очагов с ярко выраженными признаками морфогенеза, которые, в свою очередь, необходимо переносить в неселективные условия и культивировать в течение 3 – 4 пассажей до образования адвентивных почек, побегов и растений-регенерантов.

С целью создания новых форм льна, устойчивых к антракнозу, 8 – 9 суточные незрелые зародыши следует культивировать на среде Sh-2, содержащей 36 мл/л 40-ка суточного культурального фильтрата возбудителя антракноза *Colletotrichum lini*. Сформированный в эмбриокультуре морфогенный каллус рекомендуется переносить на среду Sh-2, содержащую 40 мл/л фильтрата патогена, а через пассаж, отобранные морфогенные очаги – на среду Sh-2, содержащую 60 мл/л фильтрата. Дальнейшее культивирование каллуса осуществляют на неселективной среде до формирования побегов и растений-регенерантов.

Полученные в условиях *in vitro* генотипы, при необходимости, оценивают на устойчивость к вышеназванным болезням на искусственных инфекционно-провокационных фонах. Провокационные условия создают путём внесения в почву чистой культуры патогена.

Таким образом, новые генотипы льна, созданные с использованием биотехнологических методов, повышают биоразнообразие льна культурного (*Linum usitatissimum*) и, при этом, создаются условия для расширения ареала распространения культуры, независимо от присутствия в почве патогенных объектов.

Ключевые слова: *устойчивые генотипы льна, биотехнологические методы*

CREATION *IN VITRO* OF NEW DISEASE-RESISTANT VARIETIES OF FLAX IS ONE OF THE WAYS TO ENHANCE CULTURE BIODIVERSITY

N.V. Proletova, L.P. Kudryavtseva
FGBNU "All-Russian Research Institute of Flax", Torzhok,
e-mail: *nataljaprljotva@rambler.ru*

Biodiversity performs a regulatory function in the implementation of all biogeochemical, climatic and other processes on Earth. Each species existing on the planet, makes its contribution to the stability not only of the local ecosystem, but also to the biosphere as a whole.

Flax is a very valuable technical culture with the advanced halo of growth. However, soil pathogenic microflora creates barriers for growing flax with high quality parameters. Classical breeding methods create new varieties resistant to several diseases (Fusarium wilt, rust). At the same time the annual change in cenosis of flax diseases, create new, optimal conditions for their manifestation with varying degrees of pathogenicity. In the plant flax biosystems biotechnological techniques of new, resistant genotypes creation in vitro plays the important role in the regulation of resistance to phytopathogens.

As a result of research we have created an effective selective system "Flax - fusaric acid" and "Flax - the culture filtrate of the fungus *Colletotrichum lini* Maans et Bolley», allowing to increase the biodiversity of flax culture and get new forms resistant to Fusarium wilt and anthracnose.

To create flax genotypes resistant to Fusarium wilt it is necessary to add fusaric acid at a concentration of 0.1 mg/l to the nutrient medium Sh-2 and incubate anthers flax being on the stage of vacuolated uninucleate microspore up to morphogenic callus formation. Callus should be transferred on a medium Sh-2 containing 10 mg/l of fusaric acid, and passaged until the formation of foci with pronounced signs of morphogenesis, which, in turn, must be transferred to non-selective conditions and cultured for 3 - 4 passages to form adventitious buds, shoots and regenerated plants.

In order to create new resistant to anthracnose forms of flax, 8 - 9 day immature embryos should be cultured on the Sh-2 medium containing 36 ml/l of 40-daily culture filtrate anthracnose pathogen Colletotrichum lini. Formed in embryo morphogenic callus is recommended to transfer to Sh-2 medium containing 40 mg/l of filtrate of the pathogen, and selected morphogenic pockets by passage - to Sh-2 medium containing 60 mg/l filtrate. Further cultivation of the callus is carried out on non-selective medium till the formation of shoots and regenerated plants.

Obtained in vitro conditions genotypes, if necessary, were evaluated for resistance to the above-mentioned diseases on infectious artificial provocative backgrounds. Provocative conditions are created by soil application of a pathogen pure culture.

Thus, the new genotypes of flax grown by using biotechnological methods, increase the biodiversity of cultural flax (*Linum usitatissimum*) and at the same time create conditions for the culture range distribution expansion regardless of pathogens presence in soil objects.

Keywords: *resistant flax genotypes, biotechnological methods*

ИЗУЧЕНИЕ БИОТИПОВ ГРЕЦКОГО ОРЕХА (*JUGLANS REGIA* L.) В ЕСТЕСТВЕННЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ МОЛДАВСКИХ ПОМОЛОГИЧЕСКИХ ЗОНАХ

М.А. Пынтя[1], Р.В. Козмик[1], Н.И. Сакалы[1], Сержио Мапелли[2], Моника Маттана[2]
Научно-Практический Институт Садоводства Виноградарства и Пищевых Технологий[1], г. Кишинэу, Респ. Молдова. e-mail: *mariapintea@yandex.ru*
Институт Сельскохозяйственной Биологии и Биотехнологии[2 г.] Милано, Италия, e-mail: *mapelli@ibba.cnr.it*

Республика Молдова является страной с древними традициями возделывания грецкого ореха. На протяжении многих веков он интенсивно распространялся путем семенного размножения. Большинство отселектированных и использованных для создания садов местных биотипов (так же происходящих из семян) обычно характеризовались качественными орехами и высоким потенциалом продуктивности. В настоящее время востребованы сорта, которые могут произрастать в специфических агро-экологических условиях, при этом соответствуя потребностям современного рынка. Наши исследования были сфокусированы на выявление местных перспективных генотипов, отселектированных из разных природных популяций местных помологических зон (северная, северо-западная, центральная и южная) при сравнении с местными и интродуцированными, зарегистрированными для размножения в республике Молдова сортами. Учеты и анализы проводились согласно апробированным дескрипторам и сенсорным характеристикам, включая форму орехов, массу плода, его структуру (в том числе: индекс формы верхушки, общий вес ядра, индекс отношения ядро/эндокарп, структура ядра, цвет кожицы, аромат, консистенция ядра, специфические вкусовые качества, и т.д.). Форма орехов наиболее ценных биотипов в основном от широко яйцевидной до яйцевидной. В северной зоне выделившиеся биотипы обладали более светлым цветом ядра орехов и более высоким индексом ядро/эндокарп: 45-59% выполненности ядер было отмечено у 13 биотипов. Большинство биотипов обладали средней степенью выполненности ядра и гладкости скорлупы. Наиболее высокий балл приятного аромата, орехового вкуса и интенсивности сладкого привкуса отмечен в центральной помологической зоне (1Cmd, 2Cmd, 3Cmd, 17Cmd). В целом вяжущий вкус, сморщиваемость поверхности и сладковатость вкуса ядра очень сильно варьируют между местными сортами и биотипами. Соотношение выравненности поверхности орехов биотипов во всех зонах было одинаковым. Таким образом, на основании полученных данных мы предполагаем существование важных с генетической точки зрения деревьев (генотипов) во всех исследованных зонах республики Молдова. Мы считаем необходимым осуществить *in-situ* и *on-farm* инвентаризацию для определения дальнейшего использования отмеченного выше генофонда грецкого ореха.

Ключевые слова: *грецкий орех, пре селекция, семенные популяции, местные биотипы, характеристики орехов*

EVALUATION OF WALNUT (*JUGLANS REGIA* L.) BIOTYPES FROM NATURAL POPULATIONS OF MOLDOVAN POMOLOGICAL ZONES

Maria A. Pintea[1], Radu V. Cozmic[1], Natalia I. Sacali[1], Sergio Mapelli[2], Monica Mattana[2]
Research and Practical Institute for Horticulture and Alimentary Technologies. Chisinau, Rep. Moldova[1], e-mail: *mariapintea@yandex.ru*
Research Institute of Agricultural Biology and Biotechnology, Milano, Italy,
e-mail: *mapelli@ibba.cnr.it*

Republic of Moldova is a country with ancient walnut culture tradition. During the lot of centuries there are intensively outspreaded by seed multiplication. Main selected and used for establish orchard biotypes was local bearing trees (also originated from seed) has good qualities and high productive potential. Actually it is indispensable to grow adequate varieties in concordance with the specific arpo-ecological conditions and especially for modern market demands. Our studies were focused on evaluation of perspective local walnut biotypes, selected from different natural populations of local pomological zones (north, north-vest, central and south) comparatively to autochthonous and some introduced registered for multiplication in the Republic of Moldova varieties. The assessment enclosed walnut main descriptors, and sensory attributes including nut form, weight, structure (including index of shape form, total kernel weight, index of kernel/endocarp relation), kernel structure, color, flavor, texture, specific eating qualities, etc. The nut shape of the biotypes, selected as important ones was mainly rated oblate to ovate. Biotypes of north zone were recorded to have the whitest shell color and high index of kernel/endocarp relation: 45-59% of kernel were noticed at 13 biotypes. Most of the biotypes had a moderate kernel fill and shriveling score. The highest score of aroma, flavor and sweetness intensity was noted in central pomological zone (1Cmd, 2Cmd, 3Cmd, 17Cmd). In general bitterness, puckeriness and sweetness assessments greatly changing among local varieties and biotypes. Crispness rating of the biotypes was almost the same in all zones. Thus, on the basis of obtained data we suppose the existence of genetically important native trees (genotypes) all around the Moldovan studied areas. We are considering that there is necessary to conduct *in-situ* and *on-farm* inventories also for assessment and future utilization of the mentioned walnut gene fond.

Keywords: *walnut, pre breeding, seed populations, local biotypes, fruits charracteristics*

ПРЕДЕЛЫ ИЗМЕНЧИВОСТИ ПРИЗНАКОВ В ПОПУЛЯЦИЯХ РАСТЕНИЙ-РЕГЕНЕРАНТОВ И СЕМЕННЫХ ПОТОМСТВ ЛЮЦЕРНЫ

О.А. Рожанская
Сибирский научно-исследовательский институт кормов, г. Новосибирск, Россия,
e-mail: *olgarozhanska@yandex.ru*

Люцерна (*Medicago* L.) принадлежит к семейству бобовых (*Fabaceae*). Культурные многолетние виды люцерны (*M. varia* Mart., *M. sativa* L., *M. falcata* L.) – облигатные перекрёстники энтомофильного типа, ценные кормовые травы. Дикорастущие представители этих видов распространены на территории Евразии. В лесостепной зоне Сибири, по мнению Р.Я. Пленник, находится естественный ареал люцерны изменчивой (*M. varia*). Цель исследований – разработка методов использования сомаклональной изменчивости для селекции новых сортов люцерны. Растения-регенеранты получены в культуре семядольных узлов асептических проростков сортообразцов, принадлежащих к виду *M. varia*. Изучение сомаклонов (растений-регенерантов R_0, высаженных в поле, и семенных потомств первого и второго поколений) проводилось в 2001-2012 гг. в питомниках Сибирского НИИ кормов (г. Новосибирск) и Института биологических проблем криолитозоны (г. Якутск).

У сомаклонов выявлено значительное увеличение разнообразия за счет основных дифференцирующих морфологических признаков люцерны посевной (*M. sativa*) и серповидной (*M. falcata*). Так, форма куста варьировала от прямостоячей (*M. sativa*) до распластанной (*M. falcata*), форма плода от прямой, встречающейся лишь у *M. falcata*, до спирально закрученной в 5 оборотов, что свойственно *M. sativa*. Если у исходного сортообразца венчики цветков имели сиреневую окраску разной степени насыщенности и только 0,2% растений – вариегатную - с кремовой окраской, то более трети сомаклонов отличались светло-желтой, розоватой, белой или вариегатной окраской венчиков с жёлтыми и зелёными лепестками. Таким образом, частота встречаемости окраски венчика, отличной от исходной, увеличилась у сомаклонов почти в 200 раз. В Якутии успешно возделывались и зимовали в течение ряда лет сомаклоны люцерны «сативного» типа с прямостоячими стеблями, фиолетовыми цветками и спирально закрученными бобами. Между тем в условиях криолитозоны произрастает в диком виде и введена в культуру только морозоустойчивая *M. falcata* с распластанной формой куста, ярко-жёлтыми цветками и серповидными бобами.

Итак, у сомаклонов *M. varia* нами обнаружены таксономические и экологические признаки других видов. Известно, что современная систематика рода *Medicago* остается дискуссионной. Анализ спектра сомаклональных вариаций говорит в пользу точки зрения C. F. Quiros & G. R. Bauchan о существовании одного большого полиморфного вида *M. sativa,* включающего *M. varia* и *M. falcata* в ранге подвидов. Виды легко скрещиваются между собой, различия между ними представляют собой результат преобладания тех или иных аллелей в генофонде популяции в связи с экологической адаптацией и географической изоляцией.

Сомаклональная изменчивость позволяет раскрыть внутривидовое разнообразие в полном объёме. Наши исследования подтверждают правоту Н.И. Вавилова и других сторонников концепции линнеевского вида *sensu latu* как системы, дифференцированной на географические и экологические типы и состоящей из множества разновидностей. Метод сомаклональной изменчивости мог бы найти применение в деле воссоздания утраченных «промежуточных звеньев» между таксонами.

Ключевые слова: *люцерна, регенерант, сомаклональная изменчивость, систематика, виды*

THE LIMITS OF SOME FEATURES VARIABILITY IN POPULATIONS OF ALAFALFA REGENERATED PLANTS AND SEED PROGENY

O.A. Rozhanskaya
Siberian Research Institute of Fodder, Novosibirsk, Russia,
e-mail: *olgarozhanska@yandex.ru*

Alfalfa (*Medicago* L.) belong to the legume family (*Fabaceae*). Cultural perennial species of alfalfa (*M. varia* Mart., *M. sativa* L., *M. falcata* L.) is an obligate entomophilous cross-pollinated plants, a valuable fodder grass. Wild individuals of these species are widespread in Eurasia. The forest-steppe zone of Siberia, according to R. J. Plennik, is the natural habitat of *M. varia*. A purpose of researches is development of methods of using somaclonal variations for breeding new varieties of alfalfa. Regenerated plants obtained in the culture of cotyledonary nodes of aseptic seedlings belonging to the species *M. varia*. The study of somaclones (plants-regenerants R_0, planted in field, and seed progenies of the first and second generations) was carried out in 2001-2012 in the fields of Siberian research Institute of fodder (Novosibirsk) and the Institute for biological problems of cryolithozone (Yakutsk).

Somaclones revealed a significant increase in diversity due to the appearance of the main differentiating morphological features of *M. sativa* and *M. falcata*. So, the bush form varied from erect (*M. sativa*) to spread (*M. falcata*), the shape of the fruit from direct, found only in *M. falcata*, to spirally twisted in 5 turns, which is characteristic of *M. sativa*. If the corolla of the initial variety had a lilac color of different degree of saturation and only 0.2% of the plants – mixed color with a cream, more than a third of somaclones differed pale yellow, pinkish, white or mixed color of the corolla with yellow and green petals. Thus, the frequency of occurrence of coloring of the corolla, distinct from the initial is increased of somaclonal almost 200 times. The alfalfa "sativa" type somaclones with erect stems, purple flowers and spirally twisted beans in Yakutia was successfully cultivated and wintered for several years. Meanwhile only frost-resistant *M. falcata* with spread form of a bush, bright yellow flowers and sickle shaped beans grows in the wild and introduced into cultivation in permafrost.

So, we found taxonomic and ecological characteristics of other species in somaclones of *M. varia*. It is known that modern systematic of the genus *Medicago* is debatable. The study of the spectrum of somaclonal variations speaks in favor of the perspective of S. F. Quiros & Bauchan G. R. on the existence of a large polymorphic species *M. sativa*, including *M. varia* and *M. falcata* in the rank of subspecies. The species easily hybridize with each other, the differences between them are the result of the predominance of certain alleles in the gene pool of a population due to environmental adaptation and geographical isolation.

Somaclonal variation can reveal intraspecific diversity in full. Our research has confirmed the rightness of N. I. Vavilov and other supporters of the concept of the Linnaean species *sensu latu* as systems, differentiated on geographical and ecological types and comprising multiple varieties. Somaclonal variability could find application in recreating the missing "intermediate links" between taxa.

Keywords: *alfalfa, regenerant, somaclonal variation, taxonomy, species*

РОЛЬ ЭНДОФИТНЫХ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS* В РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСКРИПЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ ГЕНОВ PR-БЕЛКОВ В РАСТЕНИЯХ ПШЕНИЦЫ ИНФИЦИРОВАННЫХ ЗЛАКОВОЙ ТЛЕЙ *SCHIZAPHIS GRAMINUM*

С.Д. Румянцев, Г.Ф. Бурханова, С.В. Веселова, И.В. Максимов
ФГБУН Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, г. Уфа, Россия, e-mail: *rumyantsev-serg@mail.ru*

В настоящее время появляется все больше резистентных форм вредных организмов, как следствие применения химических средств защиты растений, что делает использование биопрепаратов на основе стимулирующих рост растений бактерий (СРРБ) (от plant growth promoting bacteria - PGPB) перспективным в защите растений от вредителей. Как фитофаги, так и СРРБ изменяют метаболизм растений. Обыкновенная злаковая тля (*Schizaphis graminum*), воздействуя на растение секретами своей слюны, уменьшает оксидативный стресс, изменяя активность окислительно-восстановительных ферментов, осуществляет детоксикацию фенольных соединений и предотвращает накопление каллозы, подавляет защитный путь, индуцируемый салициловой кислотой (СК) и увеличивает перекисное окисление липидов, что часто приводит к торможению ростовых процессов. В свою очередь, СРРБ обладают ростостимулирующим эффектом и индуцируют системную устойчивость к широкому спектру вредителей и патогенов, характеризующуюся синтезом PR-белков. К сожалению роль СРРБ в развитии устойчивости растений к вредителям изучена недостаточно.

Наши исследования показали, что в инфицированных злаковой тлей растениях предпосевная обработка бактериями *Bacillus subtilis* 26Д (Bs26D), *B. thuringiensis*-6066 (Bt6066) и *B. thuringiensis*-5689 (Bt5689) в отдельности и в смеси (MIX) увеличивала накопление мРНК изученных генов, кодирующих PR-белки: пероксидазу (PR-9), ингибиторы протеиназ (PR-6), липоксигеназу (LOX) и фенилаланинаммоний-лиазу (PAL). В необработанных бактериями инфицированных тлей растениях пшеницы, также как в инфицированных растениях обработанных штаммами Bt5689 и Bt6066, было обнаружено накопление мРНК только двух генов - *PR-6* и *LOX*, являющихся «маркерными» генами сигнального пути жасмоновой кислоты и показателями разрушения клеточных мембран в ответ на механическое поранение насекомыми-вредителями. В растениях пшеницы обработанных Bs26D и инфицированных тлей было обнаружено накопление транскриптов *PR-9* и *PAL*. Эти гены являются «маркерами» в сигнальном пути СК, а соответствующие белки участвуют в синтезе фенольных соединений и монолигнолов, необходимых для обезвреживания злаковых тлей. В растениях пшеницы обработанных смесью штаммов MIX и инфицированных тлей было обнаружено накопление транскриптов всех изученных генов, что может предполагать активацию как салицилатного, так и жасмонатного сигнальных путей в инфицированных растениях.

Таким образом, обработка растений пшеницы смесью бактериальных штаммов способствует активизации различных сигнальных путей защиты, связанных с повышением транскрипционной активности генов PR-белков, что, скорее всего, будет приводить к более эффективной защите растений от вредителей.

Ключевые слова: *стимулирующие рост растений бактерии, PR-гены, системная устойчивость, злаковая тля*

INVOLEMENT OF ENDOPHYTIC BACTERIA OF THE GENUS *BACILLUS* IN THE CONTROL OF GENES EXPRESSION OF PATHOGENESIS RELATED PROTEINS IN WHEAT PLANTS INFECTED WITH CEREAL APHIDS *SCHIZAPHIS GRAMINUM*

S.D. Rumyantsev, G.F. Burkhanova, S.V. Veselova, I.V. Maksimov
Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Centre, Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia, e-mail: *rumyantsev-serg@mail.ru*

Presently, number of resistant pests forms increases as a result of crop protection chemicals use. Accordingly, the use of biological products based on plant growth promoting bacteria (PGPB) is a promising direction in the field of plants resistance against pests and pathogens. The phytophages able to change of plant metabolism as well as PGPB. Cereal aphids (*Schizaphis graninum*) using the secrets its saliva decreases oxidative stress by altering the activity of redox enzymes, provides detoxification of phenolic compounds and prevents the accumulation of callose, suppresses the signaling pathway induced by salicylic acid (SA) and increased lipid peroxidation. This often leads to the inhibition of growth processes. In return, PGPB have a growth stimulating effect and induces systemic resistance to a broad spectrum of pests and pathogen, which is characterized by PR-protein synthesis. Unfortunately, PGPB role in the development of plant resistance to pests studied poorly.

Our research showed that in infected plants by aphids pre-sowing treatment with *Bacillus subtilis* 26D (Bs26D), *B. thuringiensis*-6066 (Bt 6066) and *B. thuringiensis*-5689 (Bt5689) bacteria either alone or in the mixture (MIX) increased the accumulation of mRNA in studied genes, which encode PR-proteins like peroxidase (PR-9), proteinase inhibitors (PR-6), lipoxygenase (LOX) and phenilalaninammony lyase (PAL). The transcripts accumulation only two genes - *PR-6* and *LOX* were detected in wheat plants infected with aphids and untreated bacteria, as well as in infected plants treated strains Bt5689 and Bt6066. These genes are “markers” of jasmonic acid signaling pathway and indicators of cell membrane destruction in response to mechanical damage by pests. The accumulation of mRNA *PR-9* and *PAL* were found in wheat plants treated with Bs26D and infected aphids. These genes are SA signal pathway “markers”. The corresponding proteins are involved in the synthesis of phenolic compounds and monolignols, which are necessary for neutralization of cereal aphids. The transcripts accumulation of all studied genes were found in wheat plants treated with mixture of strains MIX and infected aphids, that can be assumed activation of salicylate and jasmonate signal pathways in infected plants.

Thus, treatment of wheat plants with a mixture of bacterial strains facilitates activation of various signaling pathways protection associated with increased transcriptional activity of genes PR-proteins. Hence, this treatment will lead to a more effective protection of plants from pests.

Keywords: *plant growth promoting bacteria, PR-genes, systemic resistance, cereal aphids*

СЕКРЕТОРНЫЕ ПРОЦЕССЫ ПРИ РАЗРЫХЛЕНИИ ПРОЭМБРИОНАЛЬНЫХ КЛЕТОЧНЫХ КОМПЛЕКСОВ ГРЕЧИХИ ТАТАРСКОЙ

Н.И. Румянцева[1], А.Н. Акулов[1,2], В.В. Сальников[1,2], В.Г. Евтюгин[2], Ю.А. Костюкова[1], Е.А. Гумерова[1], А.В. Лайков[2], М.Н. Логачёва[3], Ю.Н. Осин[2]
[1]ФГБУН Казанский институт биохимии и биофизики КНЦ РАН, Казань, Россия, e-mail: *nat_rumyantseva@mail.ru*
[2]ФГАОУ ВПО Казанский федеральный университет, г. Казань, Россия, e-mail: *akulov_anton@mail.ru*
[3] ФГАОУ ВПО Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, г. Москва, Россия, e-mail: *maria.log@gmail.com*

Белки, секретируемые в апопласт, участвуют в различных биологических процессах и формируют первую линию защиты, внося вклад в конститутивную и индуцированную устойчивость растений и обуславливая их взаимодействие с окружающей средой. Несмотря на то, что в последнее время интерес к секретому растений значительно вырос, он по-прежнему остается не изученным для большинства видов. Использование культивируемых клеток растений – один из наиболее удобных подходов, позволяющих исследовать секретом, поскольку уровень его контаминации внутриклеточными белками по сравнению с исследованиями *in planta* незначителен; клетки *in vitro* выращиваются в строго контролируемых условиях, в них отсутствует грибная и микробная инвазия. Установлено, что от 40 до 70% экзоцитируемых белков растений представлены белками, не имеющими лидерной последовательности, что позволяет предполагать существование механизмов неклассической секреции в растениях – посредством микровезикул - экзосом или эктосом.

Эмбриогенные линии каллусных или суспензионных культур высших растений наиболее часто используют как в фундаментальных исследованиях, так и в биотехнологических разработках, поскольку для них характерна высокая частота регенерационной активности. Как правило, высокоэмбриогенные линии имеют «нодулярный» фенотип, который характеризуется наличием проэмбриональных клеточных комплексов (ПЭКК), или проэмбриогенных масс (ПЭМ). Поддержание нодулярногоморфотипа сопровождается процессами разрыхления предсуществующих ПЭКК и последующего формирования из отдельных клеток новых ПЭКК. При изучении динамики экстраклеточных полимеров (полисахаридов и белков), полученных из среды культивирования эмбриогенного каллуса гречихи татарской, было установлено, что в ходе разрыхления его клетки выделяют значительно больше полисахаридов, чем белков, с максимумом на 2-4 сутки культивирования. На уровне электронной микроскопии выявлено, что индуцируемоеразделениеи растяжение клеток ПЭКК сопровождается усилением образования парамуральных тел, формируемых посредством везикуляции плазматической мембраны. Установлена локализация парамуральных тел в периплазматическом пространстве, в разрыхленных клеточных стенках,в межклетниках и на поверхности клеток. Сделан вывод о выделении растительными клетками микровезикул- аналогов эктосом, образуемыхживотными клетками.

Установлено, что во фракции экстраклеточныхмикровезикул, полученной из среды культивирования суспензионной культуры гречихи татарской, 42% белков составляют неклассически секретируемые белки и только 5% классически секретируемые белки. Значительная часть идентифицированных белков (25%) выполняет защитные функции.

Ключевые слова: *гречиха татарская, эмбриогенный каллус, суспензионная культура, ПЭКК, разделение клеток, растяжение клеток, экзоцитоз, микровезикулы, защитные белки*

SECRETORY PROCESSES IN LOOSENING PROEMBRYONAL CELL COMPLEXES OF TARTARY BUCKWHEAT

N.I. Rumyantseva[1,2], A.N. Akulov[1,2], V.V. Salnikov[1,2], V.G. Evtyugin[2], Yu.A. Kostyukova[1], E.A. Gumerova[1], A.V. Laikov[2], M.N. Logacheva[3], Yu.N. Osin[2]
[1]Kazan Institute of biophysics and biochemistry, RAS, Kazan, Russia,
e-mail: *nat_rumyantseva@mail.ru*
[2]Kazan Federal University, Kazan, Russia, e-mail: *akulov_anton@mail.ru*
[3]Moscow State University, Russia, e-mail: *maria.log@gmail.com*

Proteins excreted into the apoplast, are involved in various biological processes and form the first line of defense, contributing to constitutive and induced plant resistance and causing their interaction with the environment. Despite the interest to plantsecretome has grown significantly in recent years, it still remains not studied for most species. The use of cultured plant cells is one of the most convenient ways to explore the secretome, because the level of contamination of intracellular proteins in comparison with situation *in planta* studies is minor; plant cells *in vitro* are grown in strictly controlled conditions, they have no fungal and microbial infestation.It was found that from 40 to 70% of secreted proteins in plants are proteins that do not have leader sequences (leaderless proteins), suggesting the existence of mechanisms of non-classical secretion in plants via microvesicles- exosomes or ectosomes.Embryogeniccalli or suspension cultures of higher plants are the most commonly used in basic research and biotechnologies, because they have a high frequency of regeneration activity. As a rule, high-embryogeniclines have a "nodular" phenotype, which is characterized by the presence ofproembryonal cell complexes (PECCs), or proembryonic mass (PEMs). The maintenance of nodular morphotype is accompanied by processes of loosening the preexisting PECCs and subsequent formation from their single cells of new PECCs. When studying the dynamics of extracellular polymers (polysaccharides and proteins) isolated from culture medium of embryogenictartary buckwheat callus, it was found that during loosening its cells secrete significantly more polysaccharides than proteins, with maximum at 2-4 days of culture. At the level of electron microscopy we revealed that induced separation and extension of PECC cells are accompanied by increasedformation of paramural bodies, generated by plasma membrane vesiculation. The localisationof paramural bodies was detected in the periplasmic space, in the loosened cell walls, in the intercellular spaces and on the surface of cells. The conclusion was drawn by this observation that plant cells release the microvesicles, which are the analogues of ectosomesgenerated by animal cells. It was established that in the fraction of extracellularmicrovesicles isolatedfrom medium of embryogenicsuspension cultures of tartary buckwheat, 42% of the proteins are non-classicalysecreted proteins and only 5% are classically secreted proteins. A significant part of identified proteins (25%) performs a protective function.

Key words: *tartary buckwheat, embryogeni ccallus, suspension culture, PECCs, cell sepration, cell extension, exocytosis, microvesicles, defense proteins*

КОМПЛЕКСНЫЙ ПОДХОД К СОХРАНЕНИЮ РЕДКИХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ В ТАМБОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Е.В. Скрипникова, М.К. Скрипникова
Мичуринский государственный аграрный университет, г. Мичуринск, Россия, e-mail: *elena.sk@mail.ru*, *skr.m@mail.ru*

Сохранение видового разнообразия природной флоры, в том числе редких и исчезающих видов, – важнейшая задача природопользования. Под руководством начальника Управления по охране окружающей среды и природопользованию Н.П. Петровой в Тамбовской области ведётся планомерная работа по охране и приумножению растительных богатств. Изучение флоры проводится силами научных коллективов области: ФГБУ Государственный природный заповедник «Воронинский», ФГБОУ ВПО Тамбовский государственный университет им. Г.Р. Державина, ФГБОУ ВО Мичуринский ГАУ с привлечением учителей и обучающихся школ области. Это позволило оценить видовое разнообразие растений во всех районах области, подробно описать флору ООПТ, которых на 1.01.2016 года в области 114, которые занимают 198 тыс. км^2, т.е. 5,7% территории.

В результате мониторинга флоры составлен кадастр всех видов растений, встречающихся на территории области, утверждены списки редких и исчезающих видов, близится к завершению работа по второму изданию Красной книги растений и грибов.

Мониторинг редких видов осуществляется по общепринятой методике. Однако для сохранения и увеличения численности популяций редких видов этого явно недостаточно. Особенно это касается декоративно- или лекарственно-ценных видов, которые, несмотря на запреты, активно собираются с целью хозяйственного использования. Поэтому наряду с контролем состояния популяций редких видов *in sito*, приходится выращивать некоторые виды в искусственных насаждениях. Это даёт возможность не только сохранить вид, но и изучать физиологические особенности его роста, развития, размножения, устойчивости к болезням и вредителям более детально, моделируя эдафические факторы таким образом, чтобы они в наибольшей степени были похожи на естественные. На агробиостанции Мичуринского ГАУ уже много лет ведутся подобные исследования. Это позволило изучить особенности семенного размножения некоторых редких видов, выявить факторы, влияющие на скорость разрастания популяции в результате вегетативного размножения. Положительные результаты получены при выращивании *ex sito* Прострела раскрытого *(Pulsatilla patens)*, Можжевельника обыкновенного *(Juniperus communis)*, Рябчика русского *(Fritillaria ruthenica)*, Рябчика шахматовидного *(Fritillaria meleagroides)*, Шпажника тонкого *(Gladiolus tenuis)*.

Однако не все виды в искуственных условиях имеют высокий коэффициент размножения. Для них эффективно размножение *in vitro*. Использование метода размножения *in vitro* и подбор индивидуальной технологии для каждого вида позволяет исключить риск исчезновения редких генотипов, даёт возможность быстро повысить их численность. Успешно отработана технология для размножения Гиацинтика беловатого (*Hyacinthella leucophaea*).

Наряду с научно-исследовательской деятельностью по сохранению и приумножению редких видов растений очень важно информировать население о недопустимости сбора редких растений, о возможности их приобретения на участках искусственного выращивания.

Опыт Тамбовской области показывает, что только комплексный подход к изучению редких видов растений позволяет не только охранять их, но и преумножать их численность, как в искусственных фитоценозах, так и в естественных местах обитания.

Ключевые слова: *редкие виды, размножение in vitro, сохранение и увеличение численности популяций редких видов*

AN INTEGRATED APPROACH TO THE PRESERVATION OF RARE PLANT SPECIES IN TAMBOV REGION

E.V. Skripnikova, M.K. Skripnikova
Michurinsk State Agrarian University, e-mail: *elena.sk@mail.ru*, *skr.m@mail.ru*

Preservation of species diversity of the natural flora including rare and endangered species is the major problem of natural resource management. The systematic work on the protection and enhancement of plant resources is carried out in the Tambov region under the leadership of N.P. Petrova, the Head of the Environmental Protection and Natural Resource Management Department. The study of the flora is carried out by researchers from State Nature Reserve "Voroninsky", Tambov State University named after G.R. Derzhavin, Michurinsk State Agrarian University with the assistance of teachers and students of schools of the region. It helped to estimate species diversity of districts of the region, describe in details the flora of 114 protected areas which occupy 198 000 km^2 (on 01.01.2016), i.e. 5.7% of the territory.

As a result of flora monitoring a cadastre of all plant species found in the region has been completed, the lists of rare and endangered species have been approved; the work on the second edition of the Red Book of plants and mushrooms has been nearly finished.

Monitoring of rare species is carried out by the usual method. However, it is not enough for maintaining and increasing the number of rare species' populations. This is especially true of decorative or drug-valuable species that, despite bans, are picked for household use. Therefore, it is necessary to control rare species' population in sito and grow some species in artificial plantations. This makes it possible not only to preserve the species, but also to study the physiological characteristics of growth, development, reproduction, resistance to diseases and pests in more details, modeling edaphic factors that are most similar to natural. We have been working on such studies for many years on the territory of Agrobiological station of Michurinsk State Agrarian University. It helped to study the characteristics of seed breeding of some rare species, to identify the factors that influence on the rate of proliferation of the population as a result of vegetative propagation. Positive results were obtained in the cultivation *ex sito* of *Pulsatílla pátens*, *Juníperus commúnis*, *Fritillária ruthénica*, *Fritillária meleagroídes*, *Gladíolus ténuis*.

However, not all species in artificial conditions have a high reproduction factor. The most effective way of reproduction for them is *in vitro*. The use of reproduction method in vitro and the selection of individual technologies for each species eliminate the risk of extinction of rare genotypes. It also allows improving their numbers quickly. The new technology for reproduction of *Hyacinthella leucophaea* is well-proven.

In is necessary to carry out research activities for the conservation and enhancement of rare plant species and it is very important to inform the public about the inadmissibility of acquisition of rare plants, the possibility of purchasing them in the areas of artificial cultivation.

The experience of Tambov region shows that only an integrated approach to the study of rare plant species can not only protect them but also to multiply their number in the artificial phytocenosis and the natural habitats.

Keywords: *rare species, reproduction in vitro, maintaining and increasing the number of rare species' populations*

БИОМОРФОЛОГИЧЕСКАЯ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *ADONIS* L.

О.О.Тимина[1], Н.С. Чавдарь[1,2], А.Д.Рущук[1] , О.Ю.Тимин[3]
[1]Приднестровский государственный университет , г.Тирасполь, Приднестровье, Молдова, e-mail: *otimina@mail.ru*; *ruschuk@mail.ru*
[2] Республиканский Ботанический сад, г. Тирасполь, Приднестровье, Молдова, e-mail: *chavdar1957@mail.ru*
[3] Республиканский НИИ экологии и растительных ресурсов, г.Бендеры, Приднестровье, Молдова, e-mail: *otimin@mail.ru*

Изучались демографические показатели ценопопуляций эфемероида, занесенного в Красную книгу ПМР, *Adonis vernalis* L. и возможности сохранения представителей рода методом *in vitro*. Исследования проводились как на охраняемой территории (Андрияшевка), так и на не охраняемой, на склонах разных экспозиций. Онтогенез *A. vernalis* исследовался согласно имеющимся ключам, с использованием основных популяционных методов с определением численности, плотности, онтогенетической, пространственной и виталитетной структуры. Для отбора эксплантов *in vitro* были использованы незрелые зиготические зародыши, а также придаточные почки возобновления и обогащения, неокрашенные бутоны и составляющие их элементы. Экспланты выращивали на среде Мурасиге и Скуга с 16-часовым фотопериодом, освещенностью 3000 лк и t=26±2ºС с добавлением регуляторов роста согласно Кутас и др., 2010. Эколого-ценотический анализ показал наличие популяций адониса в посадках робинии лжеакации, а также на известняковых и остепненных склонах в сообществах с эдификаторами *Festuca valesiaca* Gaudin, *Koeleria cristata* (L.) Pers., *Agropyron pectinatum* (Bieb.) Beauv., *Elytrigia intermedia* (Host) Nevski. Возобновление ценопопуляций адониса осуществляется вегетативным и семенным путем, с преимуществом вегетативного. Онтогенез особей адониса простой, неполный и представлен 5 онтогенетическими состояниями. Ценопопуляции классифицируются на молодые и зрелые, с различным виталитетом, нормального типа, устойчивые. Высокая задерненность склонов и низкая всхожесть семян препятствуют семенному возобновлению. Изучали регенерационный потенциал эксплантов представителей адонисов *in vitro*. Наиболее отзывчивыми эксплантами оказались почки обогащения на узлах цветоносов и незрелые зиготические зародыши. Однако, в отличие от литературных данных (Носырева и др., 2002) из одной почки обогащения *A vernalis* дифференцировался только один побег. Кроме того, процент укоренения полученных побегов был очень низкий. Поэтому необходима дальнейшая оптимизация сред, как для возможного увеличения коэффициента размножения, так и укоренения. Отмечался дифференцированный морфогенез незрелых зиготические зародышей у *A. vernalis* и *A. aestivalis* на регенерационной среде. Хотя стадия развития изолированных зародышей у обоих представителей была одинаковой (поздняя сердечковидная или ранняя торпедовидная), экспланты различались характером и темпом развития. Из-за недоразвития зародышей *A. vernalis* и наличия у них физиологического механизма торможения прорастания, они медленно увеличивались в объеме и приостанавливали развитие в условиях *in vitro*. Зародыши *A. aestivalis* быстро росли и формировали аномальный проросток без апекса. На семядолях отмечали регенерацию настоящих листьев и побегов, что свидетельствует о перспективности эмбриокультуры как для репродукции генотипов, так и для размножения.

Ключевые слова: *Adonis vernalis, Adonis aestivalis, ценопопуляция, демографическая структура, эмбриокультура*

BIOMORFOLOGICAL AND BIOTECHNOLOGICAL CHARACTERISTICS OF SOME *ADONIS* L. SPECIES

O.O.Timina[1], N.S. Chavdar[1,2], A.D. Ruschuk[1], O.Yu. Timin[3]
[1]Transnistrian State University by name of T.G.Shevchenko, Tiraspol, Transnistria, Moldova, e-mail: *otimina@mail.ru*; *ruschuk@mai.ru*
[2] Republic Botanical Garden, Tiraspol, Transnistria, Moldova, e-mail: *chavdar1957@mail.ru*
[3]Republican Scientific Research Institute of Ecology and the Plant Resources, Bendery, Transnistria, Moldova, e-mail: *otimin@mail.ru*

The demographic analysis of ephemeroida cenopopulation, carried into Transnistria Red Book, *Adonis vernalis* L. and the possibility of conservation of the genus representatives *in vitro* were studied. Studies were conducted both in the reserved area (Andriyashevka) and on that not protected on the slopes of the different exposures. Ontogenesis of the *A. vernalis* was investigated according to the existing keys, with the use of basic population methods with the determination of number, density, ontogenetic, three-dimensional and vitality structure. Immature zygotic embryos, additional buds of renewal and enrichment not colored flower buds and components of their elements were used as explants. Explants were cultivated on Murashige and Skoog media with 16- the hour photoperiod, the illumination 3000 lux and t=26±2ºC with the hormonal additives according to Kutas and others, 2010. Ecological and cenological analysis showed the presence of the adonis populations in plantations of the locust of bastard acacia, and also on the limestone and steppe slopes in the associations with edificators Festuca valesiaca Gaudin, Koeleria cristata (L.) Pers., *Agropyron pectinatum* (Bieb.) Beauv., *Elytrigia intermedia* (Host) Nevski. The reproduction of adonis cenopopulation is achieved by vegetative and seed way, with the advantage of vegetative one. *Adonis* ontogenesis is simple one, incomplete and is represented by 5 ontogenetic states. Cenopopulations are classified to the young and mature being the normal and steady with different vitality state. High turf-covered of slopes and low germination of seeds prevent seed reproduction. The regeneration potential of some explants of adonis representatives were studied *in vitro*. The most responsive explants proved to be the buds of enrichment on the node of flower stalk and the immature embryos. However, in contrast to literature data (Nosyreva and others, 2002) from one enrichment bud of *A. vernalis* was differentiated only one shoot. Furthermore, the rooting percentage of obtained shoots was too low. Therefore it is necessary further optimization of media both for the possible increase in multiplication factor and also in rooting. The differentiated morphogenesis of immature embryos of *A. vernalis* and *A. aestivalis* was noted on the regeneration medium. Although the development phase of the embryos in both representatives was identical (late heart-shaped or early torpedo stage of the embryo), explants were distinguished by nature and rate of the development. Because of the under development of embryo and physiological mechanism of braking in the *A. vernalis* embryos, they slowly increased in the volume and stopped development under the conditions *in vitro*. But *A. aestivalis* embryos not only comparatively rapidly grew up, but also synchronously formed deformed sprout without the apex. The regeneration of natural leaves and buds was noted on the embryonic cotyledons of sprout, which indicates the prospect of embryoculture both for the reproduction of genotype and for the multiplication

Keywords: *Adonis vernalis, Adonis aestivalis, cenopopulation, demographic structure, embryoculture*

СОХРАНЕНИЕ БИОРАЗНООБРАЗИЯ РОДИОЛЫ РОЗОВОЙ (*RHODIOLA ROSEA* L.) МЕТОДАМИ БИОТЕХНОЛОГИИ

О.Н. Хапилина[1], Ж.С. Купешев[1], А.Н. Данилова[2], Р.Н. Календарь[1]
[1]РГП "Национальный центр биотехнологии", г. Астана, Казахстан
[2]РГП "Алтайский ботанический сад", Риддер, г. Астана, e-mail: *oksfur@mail.ru*

Вопросы сохранения и воспроизводства биологического разнообразия являются весьма актуальным направлением исследований. Особенно это важно для видов, которые находятся под угрозой исчезновения. Методы культуры *in vitro* ценных лекарственных растений позволяют получать экологически чистое сырье круглый год, при этом сохраняя естественные популяции в природе. Родиола розовая (*Rhodiola rosea* L., семейство *Crassulaceae*) является ценным лекарственным растением, в последнее время находится под угрозой исчезновения в виду особой популярности данного вида растений в качестве растительного сырья. Использование методов биотехнологии открывает перспективы для массового воспроизводства и сохранения ценного генофонда родиолы с помощью клонального микроразмножения. Разработка стандартизованной технологии клонального микроразмножения позволит сохранить естественный биоценоз родиолы розовой в местах ее произрастания на Юго-Западном и Западном Алтае.

В Казахстане проводятся исследования по разработке технологии клонального микроразмножения родиолы розовой с целью создания промышленных плантаций в местах ее произрастания (Восточно-Казахстанская область).

Проведен сбор материала родиолы розовой из 3 популяций, расположенных в субальпийском и альпийском поясах на территории Казахстанского Алтая (Западный и Южный Алтай). Все генотипы, представляющие популяции, были введены в культуру *in vitro*. Для введения в культуру *in vitro* было отработано несколько протоколов стерилизации и питательных сред для индукции каллусообразования и органогенеза. Клональное микроразмножение родиолы розовой осуществляли путем индукции адвентивного органогенеза из апикальных меристем стерильных проростков. Определены оптимальные концентрации экзогенных регуляторов роста для элонгации микроклоновых побегов родиолы и условия их успешного укоренения в почвогрунте.

Ключевые слова: *родиола розовая, Rhodiola rosea* L.*, биотехнология, культура in vitro, клональное микроразмножение*

BIODIVERSITY CONSERVATION RHODIOLA ROSEA (*RHODIOLA ROSEA L.*) BY BIOTECHNOLOGY

O.N. Khapilina[1], Z.S. Kupeshev[1], A.N. Danilova[2], R.N. Kalendar[1]
[1]RSE "National Center for Biotechnology", Astana, Kazakhstan
[2]RSE " Altai Botanical Garden", Ridder, Kazakhstan, e-mail: *oksfur@mail.ru*

The issues of conservation and reproduction of biological diversity are actual direction of research. This is especially important for species that are under threat of extinction. Methods *in vitro* culture of a valuable medicinal plant allows obtaining environmentally friendly raw materials all year round, while maintaining the natural populations in the wild. *Rhodiola rosea L., Crassulaceae* is a valuable medicinal plant, which is under threat of extinction because of the special popularity among the population. Use of biotechnology methods opens prospects for mass reproduction and preservation of a valuable gene pool of a *Rhodiola rosea L.* by means of micropropagation. Development of the standardized technology of micropropagation technology will preserve the natural biocenosis of *Rhodiola rosea L.* in places of its growth in the South-West and West Altai.

In Kazakhstan we has made a research on development of technologies for micropropagation of *Rhodiola rosea* to create the industrial plantations in the places of its growth (East Kazakhstan region). Material from 3 populations *Rhodiola rosea L.* located in the sub-alpine and Alpine zones on the territory of Kazakhstan Altai (Western and southern Altai) collected. All genotypes of *Rhodiola rosea L.* representing populations introduced into the culture *in vitro*.

Several protocols of sterilization, culture media for induction of callus and organogenesis were developed for introduction to *in vitro* culture. Micropropagation of *Rhodiola rosea L.* carried out by induction of adventitious organogenesis from apical meristems of sterile seedlings. The optimal concentration of exogenous phytohormones for elongation microclonal shoots of Rhodiola and the conditions for their successful rooting in soils defined.

Keywords: *rhodiola rosea, Rhodiola rosea* L.*, biotechnology, culture in vitro, micropropagation*

ВЛИЯНИЯ РАСТЕНИЙ НА ИНТЕНСИВНОСТЬ ОБРАЗОВАНИЯ БИОПЛЕНОК БАКТЕРИАЛЬНЫМИ ПАТОГЕНАМИ РАСТЕНИЙ И МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Т.Н. Шафикова[1,2], Ю.В. Омеличкина[1,2], С.В. Бояркина[1], Ю.С. Букин[2], В.В. Верхотуров[2]
[1]Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск, Россия, e-mail: *t-shafikova@yandex.ru*
[2]Иркутский национальный исследовательский технический университет, г. Иркутск, Россия, e-mail: *t-shafikova@yandex.ru*

Известно, что бактерии в природе существуют не как отдельные клетки, а в составе биопленок, что обеспечивает им защиту в условиях окружающей среды, а также в инфицируемых ими макроорганизмах. В настоящее время экспериментально доказана роль микробных биопленок в этиологии и патогенезе инфекционных болезней у человека. Нельзя исключить также участие биопленок в возникновении и развитии заболеваний у растений. Поэтому, не только теоретический, но практический интерес представляет выявление способности к образованию пленок у фитопатогенных бактерий и определения их роли в развитии заболеваний растении, в том числе и у сельскохозяйственно-значимых культур.

С помощью флуоресцентной микроскопии был визуализирован процесс образования биопленок фитопатогенными бактериями *Clavibacter michiganensis ssp. sepelonicus* (*Cms)* на клеточных конгломератах суспензионных культур клеток исследуемых растений. Используя метод статического культивирования бактерий на полистироловых планшетах, были установлены различия в интенсивности биопленкообразования *Cms* при взаимодействии с культурами клеток растений в зависимости от видовой или сортовой резистентности. Так, при взаимодействии *Cms* с культурами клеток картофеля (хозяин *Cms*) восприимчивых сортов (Удача, Лукъяновский, Жуковский ранний) образование биопленок было значительно выше, чем при взаимодействии *Cms* с устойчивым сортом картофеля (Луговской) и табаком (растение-не хозяин для *Cms*), где образование биопленок было минимальным. Растение табака обладает видовой устойчивостью к *Cms* и отвечает на вторжение патогена реакцией сверхчувствительности (СЧ-реакция), что сопровождается генерацией агрессивных метаболитов - АФК, оксид азота, фитоалексины и т.п. Данные метаболиты губительны не только для клеток растения, но и патогена, и, вероятно, поэтому подавляют образование биопленок. При взаимодействии бактерий *Cms* с культурой клеток табака, трансформированного геном *hsp* 101, образование биопленок оказалось значительно выше, чем при взаимодействии с культурой клеток нормального табака. Предполагается, что сверхэкспрессирующийся белок HSP101 в клетках трансформированной культуры может проявлять противоапоптозные функции и подавлять развитие СЧ-реакции, что, в свою очередь, и определяет повышенное пленкообразование бактерий при взаимодействии с трансгеном. Отметим, что клетки нормального табака реагируют на воздействие бактерий *Cms* развитием СЧ-реакции, что в свою очередь губительно для бактерий и, вероятно, для образования биопленок.

При взаимодействии культур клеток табака и картофеля с бактериальным патогеном человека и животных *Escherichia coli* интенсивность образования биопленок практически не различались. По-видимому, различные по резистентности виды растений влияют на процесс образования биопленок нетипичного для растений патогена практически одинаково, независимо от устойчивости сорта или вида растения. Вероятно, что такой ответ обусловлен отсутствием сопряженных процессов между растением и нетипичным патогеном в ходе эволюции.

Данные, полученные на разных уровнях организации растительного организма - культуре клеток и целом растении - согласуются и подтверждают друг друга, что в дальнейшем позволит использовать культуры клеток растений для исследования тонких молекулярно-генетических механизмов, определяющих процесс образование биопленок при взаимодействии бактерий, возможно, и с другими организмами.

Ключевые слова: *Clavibacter michiganensis ssp. sepelonicus, Escherichia coli, бактериальные биопленки, культура клеток, табак, картофель*

IMPACT OF PLANTS ON BIOFILM FORMATION INTENSITY BY BACTERIAL PATHOGENS OF PLANT AND MAMMALS

T.N. Shafikova[1,2], Yu.V. Omelichkina[1,2], S.V. Boyarkina[1], Yu.S. Bukin[2], V.V. Verkhoturov[2]
[1]Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Irkutsk, Russia,
e-mail: *t-shafikova@yandex.ru*
[2]Irkutsk National Research Technical University, Irkutsk, Russia,
e-mail: *t-shafikova@yandex.ru*

It is known that bacteria in nature do not exist as single cells. Rather, bacteria often form highly organized community of microbial cells attached to the surface or to each other and enclosed in a polymeric matrix, called biofilms. Bacteria in attached condition in biofilm are protected from the environmental damaging factors and effects of host organism during infection. Currently experimentally proved the role of microbial biofilms in the etiology and pathogenesis of human infectious diseases. The participation biofilms in the origin and development of diseases in plants also can not be excluded. Therefore, the identification of the bacterial phytopathogens ability to form biofilms and the role in the development of plant diseases, including agricultural plants, determines not only theoretically, but practical interest.

In this study the process of *Clavibacter michiganensis ssp. sepelonicus* (*Cms)* biofilm formation on the conglomerates of suspension cultures cells of plant visualized by fluorescence microscopy techniques. Differences in *Cms* biofilm formation intensity in the interaction with plant cell cultures depending on the species or the variety of resistance were established by the static method detection biofilm. Thus, *Cms* biofilm formation when bacteria interact with potato suspension-cultured cells (host plant) susceptible varieties (*Udacha, Luk"yanovskii, Zhukovskii rannii*) was significantly higher than in the interaction with resistant sort of potato (*Lugovskoy*) and tobacco (non-host plant) where biofilm formation was minimal. Tobacco plant has a specific resistance to *Cms* and responds to invading pathogen hypersensitivity reaction (HR-response), which is accompanied by the generation of aggressive metabolites - ROS, nitric oxide, phytoalexins, etc. These metabolites are harmful not only for to the plant cells, but also the pathogen, and probably therefore inhibit the biofilm formation. When interacting bacteria *Cms* with culture tobacco cells transformed with *hsp 101* gene, biofilm formation was significantly higher than in interaction with culture cells of normal tobacco. It is assumed that overexpressed protein HSP101 of transformed culture cells may exhibits antiapoptotic function and inhibits the development of HR-reaction, which in turn, determines the increased Cms biofilm formation in the interaction with the transgene. Note that the normal tobacco cells respond to *Cms* by development HR - response, which in turn is detrimental to bacteria, and probable for the form biofilms.

The biofilm formation intensity human and animal bacterial pathogen *Escherichia coli* in the interaction with tobacco and potato cultures cells did not differ. Apparently, different for resistance species of plants almost equally effect on the formation of biofilm by atypical pathogen for plants, regardless of resistant variety or plant species. It is likely that this reaction determined in the absence of conjugation in the evolution process between plant and atypical pathogen.

The data obtained at different levels of the organization of plant organism - culture cells and whole plant - are consistent and support each other, which further allow the use of cell cultures of plants studying thin molecular genetic mechanisms underlying the process of the formation of bacterial biofilms in the interaction, possibly with other organisms.

Keywords: *Clavibacter michiganensis ssp. sepelonicus (Cms), Escherichia coli, bacterial biofilms, culture cells, tobacco, potato*

ПОПОЛНЕНИЕ КОЛЛЕКЦИЙ НИКИТСКОГО БОТАНИЧЕСКОГО САДА ВИДАМИ РАСТЕНИЙ ИЗ ПРИРОДНОЙ ФЛОРЫ АБХАЗИИ

О.М. Шевчук, Н.В. Марко
ФГБУН «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН», г. Ялта, Россия, e-mail: *nataly-marko@rambler.ru*

Изучение фиторазнообразия природных экосистем *in situ*, а также сохранение его *ex situ* – одна из приоритетных задач ботанических садов. Коллекция ароматических и лекарственных растений Никитского ботанического сада начала создаваться с момента его основания в 1812 г. и на данный момент представлена 326 видами и формами из 110 родов и 34 семейств.

В 2015 г. с целью изучения растительности Северного Кавказа и определения видов эфиромасличных, ароматических и лекарственных растений, перспективных для интродукции на Южный берег Крыма, были проведены научные экспедиции в Рицинский реликтовый национальный парк (РРНП) - уникальный природный комплекс с эндемичными сообществами и узкоэндемичными растениями. Парк располагается в горной части Республики Абхазия — на южном склоне Главного Кавказского хребта. В природных фитоценозах парка сосредоточено около 900 видов растений, что составляет около 13% флоры Кавказа. Основными господствующими типами растительности являются мезофильный лесной, субальпийский и альпийский с набором древних элементов флоры.

Участниками экспедиции 29-31 июля 2015 г. был обследован субальпийский луг на вершине г. Безымянная (2 200 м над у.м.). Основу его растительного покрова составляют представители следующих семейств: Cyperaceae (*Carex frigida* Albov, *C. pendula* Huds.) и Poaceae (*Calamagrostis arundinaceae* (L.) Roth., *Dactylis glomerata* L., *Festuca ruprechtii* Krecz. & Bobr., *Phleum alpinum* L., *P. phleoides* (L.) Karst., *Poa iberica* Fisch. & Mey., *Poa pratensis* L.). Из разнотравья представлены виды: *Betonica macrantha* C. Koch., *Polygonum carneum* C. Koch, *Ranunculus acutilobus* Lebed., *Pulsatilla aurea* (Somm. & Lev.) Juz., *Trifolium ambiguum* M. Bieb., *Alchemilla acutiloba* Steven, *Euphorbia macroceras* Fisch. & Mey., *Polygola caucasica* Rupr., *Hypericum perforatum* L., *Astrantia maxima* Pall., *Melampyrum caucasicum* Bunge, *Verbascum pyramidatum* M. Bieb., *Asyneuma campanuloides* L., *Valeriana colchica* Utkin. и др. Много остатков древней флоры, образующих целые реликтовые сообщества, например формации *Lilium kesselringianum* Miscz. – одного из наиболее декоративных и редких представителей субальпийской флоры. На склонах этот вид образует ассоциации с *Rhododendron caucasicum* Pall., на более пологих участках – *Betonica macrantha* и *Polygonum carneum.*

В результате экспедиционного обследования природных фитоценозов лесной и субальпийской растительности РРНП был собран растительный и семенной материал 20 видов ароматических и лекарственных растений для пополнения коллекции НБС-ННЦ. Новыми видами для коллекции являются: *Helleborus caucasicus* A.Br., *Chamerion angustifolium* (L.), *Hedysarum caucasicum* M. Bieb., *Crocus vallicola* Herbert, *Valeriana alliariifolia* Adam, *Geranium robertianum* L., *Salvia nemorosa* L., *Betonica macrantha* C. Koch., *Hypericum montanum* L., *Veartrum lobelianum* Bernh., *Fragaria vesca* L., *Dioscorea caucasica* Lipsky, *Polygonum carneum* C. Koch, *Perilla nankinensis* (Lour.) Decne., *Glaucium flavum* Crantz. Растения прошли карантинный контроль и начато их первичное интродукционное изучение.

Ключевые слова: *фиторазнообразие, субальпийская растительность, ароматические и лекарственные растения, интродукция*

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 14-5000079).

Выражаем благодарность академику Академии наук Абхазии (АНА), профессору, зав. отдела интродукции Института ботаники АНА Бебия Сергею Михайловичу и директору Абхазской научно-исследовательской лесоопытной станции (АбНИЛОС) Лейба Виталию Датиковичу за помощь в организации экспедиции и сборе растительного материала

FILLING UP OF NIKITA BOTANICAL GARDENS COLLECTION WITH PLANT SPECIES NATIVE TO ABKHAZIA FLORA

O.M. Shevchuk, N.V. Marko
Nikita Botanical Gardens - National Scientific Centre, Yalta, Russia,
e-mail: *nataly-marko@rambler.ru*

The research of natural ecosystems phytodiversity *in situ* and their *ex situ* preservation are the priorities of botanical gardens. The collection of aromatic and medicinal plants in Nikita Botanical Gardens has been developing since its foundation in 1812 and now includes 326 species and forms from 110 genera and 34 families.

In 2015, it was organized research expedition to Ritsa relic national park (RRNP), an unique natural complex with endemic communities and local endemic plants, to study the vegetation of the Northern Caucasus and identify promicing essential-oil, aromatic and medicinal species for introduction on the southern coast of the Crimea. The park is located in the highlands of the Republic of Abkhazia on the southern slope of the Greater Caucasus mountain range. Native phytocenoses of this park include about 900 plant species, representing about 13% of flora of the Caucasus. The main dominant types of vegetation are mesophilic forest, sub-alpine and alpine ones with a set of elements of ancient flora.

On July 29-31, 2015 expedition participants explored sub-alpine grassland on the top of the Besymyannaya Mountain (2600 m above the sea level). The basis of its vegetation constitute representatives of the following families: Cyperaceae (*Carex frigida* Albov, *C. pendula* Huds.) и Poaceae (*Calamagrostis arundinaceae* (L.) Roth., *Dactylis glomerata* L., *Festuca ruprechtii* Krecz. & Bobr., *Phleum alpinum* L., *P. phleoides* (L.) Karst., *Poa iberica* Fisch. & Mey., *Poa pratensis* L.). Grass communities are represented by *Betonica macrantha* C. Koch., *Polygonum carneum* C. Koch, *Ranunculus acutilobus* Lebed., *Pulsatilla aurea* (Somm. & Lev.) Juz., *Trifolium ambiguum* M. Bieb., *Alchemilla acutiloba* Steven, *Euphorbia macroceras* Fisch. & Mey., *Polygola caucasica* Rupr., *Hypericum perforatum* L., *Astrantia maxima* Pall., *Melampyrum caucasicum* Bunge, *Verbascum pyramidatum* M. Bieb., *Asyneuma campanuloides* L., *Valeriana colchica* Utkin., etc. There are numerous residues of ancient flora forming the whole remnant communities, such as the formation of *Lilium kesselringianum* Miscz. - one of the most decorative and rare representatives of the subalpine flora. This species forms associations with *Rhododendron caucasicum* Pall on the slopes and associates with *Betonica macrantha* and *Polygonum carneum* in flat areas. As a result of the expedition's survey of natural phytocenoses of forest and subalpine vegetation in RRNP we collected plants and seeds of 20 species of aromatic and medicinal plants to be introduced into the collection of NBS-NSC. New species of the collection are: *Helleborus caucasicus* A.Br., *Chamerion angustifolium* (L.), *Hedysarum caucasicum* M. Bieb., *Crocus vallicola* Herbert, *Valeriana alliariifolia* Adam, *Geranium robertianum* L., *Salvia nemorosa* L., *Betonica macrantha* C. Koch., *Hypericum montanum* L., *Veartrum lobelianum* Bernh., *Fragaria vesca* L., *Dioscorea caucasica* Lipsky, *Polygonum carneum* C. Koch, *Perilla nankinensis* (Lour.) Decne., *Glaucium flavum* Crantz. Plants were subjected to quarantine inspection and their initial introduction study is underway.

Keywords: *phytodiversity, subalpine vegetation, aromatic and medicinal plants, introduction*

Aknowlegments

This study was funded by research grant N 14-50-00079 of the Russian Science Foundation.

We are grateful to Academician of the Academy of Sciences of Abkhazia (ANA), Professor, Head of Introduction Department of ANA Botany Institute Sergei Mikhailovich Bebia and also to the Director of the Abkhaz Research Forest Experimental Station (AbNILOS) Vitaly Datikovich Leiba for their assistance in organizing expeditions and collecting plant material.

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ C_4 ВИДОВ СЕМЕЙСТВА CHENOPODIACEAE

Е.В. Шуйская
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва, Россия,
e-mail: *evshuya@mail.ru*

Центром видообразования и наибольшего разнообразия видов семейства маревых с C_4 типом фотосинтеза является Центральная Азия. Данные виды доминируют в различных растительных сообществах от галофильных (на сильно засоленных почвах) до псаммофильных (на пресных песках) и интенсивно используются как пастбищные и кормовые виды. Исследование уровня генетического разнообразия у 16 пустынных и полупустынных видов C_4 маревых показало значительные различия между видами в зависимости от жизненной формой, экотипа и широты экологической ниши. Параметры генетической изменчивости (процент полиморфных локусов (P), наблюдаемая (H_o) и ожидаемая (H_e) гетерозиготность) колебались от 0 до 77% (P), 29% (H_o) и 26% (H_e). В среднем, генетический полиморфизм у однолетних видов был в 2-4 раза ниже, чем у многолетних. Наиболее низким уровнем разнообразия характеризовались псаммофильные однолетние C_4 виды (P = 9%, H_e = 2.6%). У однолетних галофитов уровень генетического полиморфизма был выше, но наблюдался наибольший, среди всех изученных видов, дефицит гетерозигот (96%). Среди пустынных многолетних C_4 маревых, виды с узкой экологической нишей (облигатные псаммофиты) характеризовались меньшим уровнем гетерозиготности (H_o = 5.6%, H_e = 8.2%) по сравнению с более пластичными и широко распространенными видами (H_o = 8%, H_e = 11.5%). Наибольшее разнообразие среди как однолетников, так и многолетников наблюдалось у полупустынных видов (P = 36%, H_e = 10.2% и P = 77%, H_e = 25.6% соответственно). Значительная генетическая дифференциация популяций (особенно у однолетников) и отсутствие корреляции между генетическими дистанциями и географическими расстояниями между популяциями свидетельствуют об ограниченном потоке генов у данных видов.

Ключевые слова: *генетический полиморфизм, поток генов, пустыня, засоление*

GENETIC DIVERSITY OF C_4 SPECIES OF CHENOPODIACEAE

E.V. Shuyskaya
Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Moscow,Russia,
e-mail: *evshuya@mail.ru*

Center of origins and diversity for species with C_4 type of photosynthesis of Chenopodiaceae family is Central Asia. They dominate in different plant communities from halophilic (on strongly saline soils) to psammophilic (on non saline sand) and extensively used as pasture and forage species. Studies of the genetic diversity in 16 desert and semi-desert C_4 species of Chenopodiaceae showed significant differences between species depending on their life form, ecotype and ecological niches. Parameters of genetic variation (percentage of polymorphic loci (P), observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosity) ranged from 0 to 77% (P), 29% (H_o) and 26% (H_e). On average, the genetic polymorphism in annual species was approximately 2-4-fold lower than in perennials. Psammophilic annual C_4 species were characterized by the lowest level of diversity (P = 9%, H_e = 2.6%). In annual halophytes the level of genetic polymorphism was higher, but there was the highest, among all studied species, deficit of heterozygotes (96%). Among the desert perennial C_4 chenopods, species with narrow ecological niche (obligate psammophytes) were characterized by lower level of heterozygosity (H_o = 5.6%, H_e = 8.2%) as compared to the more plastic and widespread species (H_o = 8%, H_e = 11.5%). The greatest diversity (among both annuals and perennials) was observed in semi-desert species (P = 36%, H_e = 10.2% and R = 77%, H_e = 25.6%, respectively). Significant genetic differentiation of populations (especially in annuals) and the lack of correlation between genetic and geographic distances between populations suggest a limited gene flow among these species.

Keywords: *genetic polymorphism, gene flow, desert, salinity*

СЕКЦИЯ 2.
SESSION 2.

КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ РАСТЕНИЙ: ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ

CLONAL MICROPROPAGATION OF PLANTS: THEORETICAL AND APPLIED ASPECTS

ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* ВИНОГРАДА СОРТА ЧИЛЯКИ ЧЕРНЫЙ И КИШМИШ ЧЕРНЫЙ

С.Ф. Абдулалишоева[1], Х.И. Бободжанова[1], Н.В. Кухарчик[2]
[1]Центр биотехнологии Таджикского национального университета, г. Душанбе, Таджикистан, e-mail: *bahor_8888@mai.ru*, *bobojankh_7@bk.ru*
[2]РУП «Институт плодоводства», г. Самохваловичи, Беларусь,
e-mail: *Kychnataly@rambler.ru*

Разработка методов клонального микроразмножения является основой для создания генетических банков *in vitro*, а также одним из перспективных направлений сохранения биоразнообразия в целом. В то же время, для каждого растения разрабатываются свои методы и подходы, в том числе и для винограда. Среди сортов винограда, произрастающих в Таджикистане, имеются те, которые находятся на грани исчезновения. Некоторые местные ценные сорта представлены несколькими кустами на коллекционных виноградниках или приусадебных участках.

Объектами были выбраны сорта винограда Чиляки чёрный и Кишмиш чёрный.

Кишмиш чёрный - древний сорт винограда Местом его возникновения и широкого распространения является Средняя Азия. Вкусовые качества очень высокие. Урожайность высокая. Сорт сильно поражается оидиумом, антракнозом и гроздевой листоверткой. Виноград используется для потребления в свежем виде и для производства сушеной продукции высокого качества.

Чиляки чёрный **- с**толовый сорт винограда очень раннего периода созревания. Период от начала распускания почек до полной зрелости ягод в окрестностях Душанбе 105— 110 дней при сумме активных температур 2400°С. Вызревание побегов хорошее. Урожайность 112—128 ц/га. Сорт повреждается оидиумом, побеги и ягоды — антракнозом.

В качестве эксплантов использовали меристему, боковые почки и щитки активно растущих побегов. Все исследования проводили по общепринятым в биотехнологии методикам. Экспланты высаживали на питательную среду Мурасиге и Скуга, дополненную НУК-0,09 мг/л.

Начало роста введенных *in vitro* эксплантов было отмечено через 20-25 суток.

Выход жизнеспособных эксплантов, введенных в культуру *in vitro* из боковой почки и щитка, составил для сорта Чиляки черный 86% и 54 соответственно. Для сорта Кишмиш черный – 62,5 и 87,5 соответственно. Из апикальной меристемы для сорта Чиляки черный получено 63% жиснеспособных эксплантов, и 50% - для Кишмиш черный. В среднем по типам эксплантов, оба сорта характеризуются практически одинаковой регенерационной способностью (67,6 и 66,6 соответственно).

Отмечено, что у винограда сорта Кишмиш черный щиток обладает высокой жизнеспособностью (87,5). Для сорта Чиляки черный из боковой почки образуется максимальное количество эксплантов, способных к регенерации.

Таким образом, при введении исследуемых сортов винограда в культуру *in vitro* отмечается разная регенерационная способность, которая зависит от типа экспланта и генотипа.

Ключевые слова: *виноград, культура in vitro, микроразмножение*

INTRODUCTION TO *IN VITRO* CULTURE GRAPE VARIETIES CHILJAKI BLACK AND BLACK RAISINS

S.F. Abdulalishoeva[1], Kh.I. Bobodzhanova[1], N.V. Kukharchik[2]
[1]Center of biotechnology of Tajik National University, Dushanbe, Tajikistan,
e-mail: *bahor_8888@mai.ru*, *bobojankh_7@bk.ru*
[2]Institute for Fruit Growing, Samokhvalovichi, Belarussia, e-mail: *Kychnataly@rambler.ru*

Development of microclonal reproduction techniques is the basis for the creation of *in vitro* gene banks, as well as one of the promising areas for biodiversity conservation in general. At the same time, for each plant being developed their own methods and approaches, including grapes. Among the grape varieties grown in Tajikistan, there are those who are on the verge of extinction. Some local valuable varieties are represented by several bushes on collection vineyards or homestead lands.

For the research objects were selected grape varieties Chiljaki black and Black Raisins.

Black raisins - an ancient grape variety, the place of its origin and wide distribution is Central Asia. Flavoring qualities and productivity of it are very high. Sort is greatly affected by oidium, anthracnose. Grapes used for fresh consumption and for the production of high quality dried products.

Chiljaki black - table grape very early ripening period. The period from bud burst to full ripeness of the berries in the vicinity of Dushanbe 105-110 days at the total sum of active temperatures 2400°C. Ripening of sprigs are good. Productivity is 112-128 quintal/hectare. Sort is affected by oidium, sprigs and berries - anthracnose.

The explants were used as meristem, lateral buds and pads of actively growing sprigs. All studies were conducted according to generally accepted methods in biotechnology. The explants were planted onto nutrient MS medium supplemented with 0.09 mg/l NAA.

Start growth of in vitro explants was observed after 20-25 days.

Obtained viable explants of entered in an in vitro culture of lateral buds and pads made for a Chiljaki black variety 86% and 54%, corespondantly. For Black raisins variety - 62.5% and 87.5% respectively. On the apical meristem of the variety Chiljaki black received 63% of viable explants, and 50% for Black raising. The average for the explants types, both varieties are characterized by almost the same regenerative ability (67.6% and 66.6% respectively).

It is noted that the Black raisins variety is characterized by high viability shield (87.5%). For Chiljaki black variety maximum number of regenerated explants observed in the lateral buds.

Thus, when introduced to *in vitro* culture different regenerative capacity is observed, which depends on the variety and type of explants grape accessories.

Keywords: *grapes, culture in vitro, microclonal reproduction*

УСЛОВИЯ АДАПТАЦИИ *IN VITRO* РАСТЕНИЙ ЛЕСНЫХ КУЛЬТУР ДЛЯ ЗАКЛАДКИ ЛЕСНЫХ ПЛАНТАЦИЙ

А.Б. Азарова, В.Г. Лебедев, К.А.Шестибратов
Филиал ФГБУН Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, г. Пущино, Россия, e-mail: *anytkaa1987@mail.ru*

Для закладки лесных плантаций проведено изучение элементов технологии широкомасштабного получения посадочного материала элитных линий осины, березы и ивы методом клонального микроразмножения. В экспериментах использовали 8 генотипов осины (*Populus tremula*), 12 генотипов березы (*Betula pubescens*, *B.pendula*, *B.pendula* var. *carelica*) и 11 видов и гибридов ивы (*Salix* spp.). Высадка растений в теплицу для адаптации проводилась с начала апреля до начала июля с 3-х недельными интервалами. Для посадки использовались как укорененные *in vitro* растения, так и неукоренные (укоренение *ex vitro*). Высадку производили в кассеты с ячейками объемом 20, 80 и 128 см^3. Через месяц кассеты с растениями переносили из теплицы на открытую площадку. Частота акклиматизации к нестерильным условиям укорененных растений *in vitro* составила в среднем для осины 86%, березы – 81%, ивы – 88%. Выживание растений при укоренении *ex vitro* было ниже в среднем на 20%, но в ряде случаев достоверно не отличалось от укоренения *in vitro*. Растения карельской березы показали низкую жизнеспособность и ослабленный рост по сравнению с другими видами березы. Показано, что оптимальным периодом высадки растений в теплицу является май и начало июня. Выживание растений было высоким и при посадке в конце июня-июле, но при этом растения к концу вегетации отставали в росте. Объем ячейки посадочных кассет не оказал влияние на выживание растений, но увеличение объема способствовало более интенсивному росту растений. Всего к концу вегетационного сезона было выращено около 30 тысяч саженцев. Полученным посадочным материалом осенью 2015 года была заложена первая очередь интенсивной лесной плантации площадью 2 га, вторая очередь площадью 3 га будет заложена весной 2016 года.

Ключевые слова: *культура in vitro, осина, береза, ива, лесные плантации*

Работа выполнена в рамках проекта № 14.607.21.0044 от 22.08.2014 Минобрнауки РФ (уникальный идентификатор RFMEFI60714X0044).

CONDITIONS FOR ADAPTATION OF *IN VITRO*-DERIVED MICROSHOOTS OF FOREST CROP PLANTS FOR ESTABLISHMENT OF FOREST PLANTATIONS

A. Azarova, V. Lebedev, K. Schestibratov
Pushchino Branch of M. M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moskovskaya obl., Russia,
e-mail: *anytkaa1987@mail.ru*

The element of clonal micropropagation method for large scale production of planting material elite clones of aspen, birch and willow for subsequent forest vegetation was studied. Eight aspen genotypes (*Populus tremula*), 12 birch genotypes (*Betula pubescens*, *B.pendula*, *B.pendula* var. *carelica*) and 11 species and hybrids of willow (*Salix* spp.) were used in experiments. Adaptation of microshoots conducted from early April to early July with 3 weeks interval. Both, *in vitro* rooted plants and non-rooted plant (*ex vitro* rooting) was used for planting. Microshoots was planted in plastic trays with cell volume 20, 80 or 128 ml. A month later, trays with adapted microshoots in greenhouse was transferred to open plot. Mean effectiveness of in vitro rooted plants acclimatization to environmental conditions are 86% for aspen, 81% for birch, and 88% for willow. Survival rate of plants, which rooted *ex vitro*, were lower on average by 20%, but in some cases, not significantly differ from *in vitro* rooted plants. Reduced viability and growth rate of birchwood in comparison with other species of birch was shown. Optimal timeframe for microshoots planting was from early May to early June. Survival rate of microshoots planted in late June and July was also high, but height of plants in the end of growing period was reduced. The cell volume in tray did not affect survival rate, but increase of cell volume promote more intensive plants growth. There are about 30,000 seedlings were grown to the end of the growing season. Produced planting material was used for establishment of intensive forest plantation (2 hectares) in the autumn of 2015. In spring of 2016 we will establish another plantation (3 hectares).

Key words: *culture in vitro, aspen, birch, willow, forest plantations*

Aknowlegment
The work under the project № 14.607.21.0044 from 22.08.2014 Ministry of Education and Science of the Russian Federation (unique ID: RFMEFI60714X0044).

ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ПРИ РАЗМНОЖЕНИИ ВИНОГРАДА В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

А.А.Батукаев[1,2], А.Х. Ахмадов[1], М.С. Батукаев[1,2]
Чеченский государственный университет[1], г. Грозный, Россия,
e-mail: *batukaevmalik@mail.ru*
Чеченский научно-исследовательский институт сельского хозяйства[2], г.Грозный, Россия

Современное виноградарство России должно базироваться на производстве сертифицированного посадочного материала. Основная цель исследований заключалась в совершенствовании технологий клонального микроразмножения с использованием регуляторов роста.

Объектом исследований явились комплексно-устойчивые сорта винограда. В качестве исходного материала были взяты интенсивно растущие зеленые побеги винограда, которые разрезали на одноглазковые черенки и далее проводили вычленение меристем в ламинарных боксах. В эксперимент были включены следующие сорта: Августин, Молдова, Восторг, Мускат итальянский, Ранний Магарача, Подарок Магарача, Виорика.

Степень приживаемости апикальных меристем на этапе введения в культуру *in vitro* у группы столовых сортов (Августин, Восторг, Мускат итальянский, Ранний Магарача) находится в среднем на уровне 50%, а у технических сортов (Подарок Магарача, Виорика, Ркацители) - 40-45%. Гибель апикальных меристем в процессе культивирования, по-видимому, наступает за счет повреждения апикальных структур в процессе вычленения.

Прижившиеся апикальные меристемы, через месяц после введения в культуру были пересажены базовую питательную среду. Пересадку производили в биологические пробирки размером 40 х 120 мм, в течение 45...55 суток образовались регенеранты размерами 6...10 см. Далее эти микрорастения были расчеренкованы и получены микроклоны.

В качестве регуляторов роста в питательную среду добавляли ауксины и цитокинины в различных концентрациях и сочетаниях. Из группы ауксинов было изучено влияние индолил-масляной кислоты (ИМК) и индолил-уксусной кислоты (ИУК), из группы цитокининов: 6-бензиламинопурина (6-БАП), 2-изопентил-аденина (2iP), а также гиббереллoвая кислота (ГК).

Проведенные эксперименты показали, что регенерация побегов из изолированных апексов происходила при всех концентрациях 6-БАП, кроме концентрации 5,0 мг/л, при которой верхушки сразу начинали чернеть и гибли. Микропобеги, выращиваемые на среде с концентрацией 0,1 мг/л 6-БАП, развивались очень медленно. Вероятно, это связано с тем, что такие низкие концентрации препарата слабо стимулируют процессы органогенеза растений. Эффективное влияние 6-БАП оказал в диапазоне концентрации 0,5...1,0 мг/л. Тем не менее, следует отметить наибольший прирост микропобегов, который был зафиксирован в варианте с концентрацией 1,0 мг/л. Для ускорения процесса удлинения микропобегов параллельно проводили изучение действия гиббереллoвой кислоты в различных концентрациях в сочетании с 6-БАП. Как показал опыт, при сочетании 0,5 мг/л 6-БАП и 1,0 мг/л ГК был достигнут наилучший результат.

Исследования, проведенные применением индолил-масляной кислоты (ИМК) на укоренение побегов растений винограда *in vitro* при повторном черенковании показали, что через 15 суток после использования, наибольшее число корней образовалось в варианте опыта с 2,0 мг/л ИМК. В дальнейшем корнеобразование продолжалось, и через 30 суток количество корней увеличилось. Параллельно начинался интенсивный рост растений, удлинялись черешки листьев, разрасталась листовая пластинка, вытягивался побег.

Ключевые слова: *питательная среда, регуляторы роста, меристема, эксплант, виноград*

OPTIMIZAZTION OF THE NUTRIENT MEDIUM COMPOSITION AT GRAPES REPRODACTION USING *IN VITRO* METHOD

A.A. Batukaev[1,2], A.Kh. Ahmadov[1], M.S. Batukaev[1,2]
Chechen State University, Grozny, Russia, e-mail: *batukaevmalik@mail.ru*
Chechen Science Research Institute of Agriculture, Grozny, Russia

Modern wine-growing in Russia should be based on the production of certified planting material. The main aim of research was to improve the clonal micropropagation techniques using growth regulators.

The object of research was the complex-resistant varieties of grapes. Rapidly growing green shoots of grapeshad been usedas the starting material and were cut into one-eyed cuttings and further extraction of meristems was performed in laminar boxes The following varieties were included in the experiment: Augustine, Moldova, Delight, Muscat Italian, Early Magarach, Gift of Magarach, Viorica.

The degree of survival of apical meristems on the stage of the introduction of an in vitro culture amonga group of table breeds (Augustine, Delight, Muscat Italian, Early Magarach) is at an average of 50%, and technical breeds (Gift of Magarach, Viorica, Rkatsiteli) - 40-45 %. The death of apical meristem in the culture seems to occur due to damage to apical structures during the process of extraction.

The surviving apical meristems a month after the plantation were transplanted to the nutrient environment containing the same components. Transplantation was carried out into biological test tubes sized 40 x 120 mm, within 45-55 days regenerants formed at a size of 6-10 cm. Further, these microplants wereslit into cuttings andmicroclonesobtained.

As growth regulatorsauxins and cytokineswere added to the nutrient environment in various concentrations and combinations. Out of the auxingroupthe effect of indole butyric acid (IBA) and indole-acetic acid (IAA) was studied; from the cytokinins group: 6-benzylaminopurine (6-BAP), 2-isopentyl adenine (2iP), and gibberellic acid (GA).

The Conducted experiments showed that the regeneration of shoots from the isolated apexes occurred at all concentrations of 6-BAP except for when adding the drugin an amount of 5.0 mg/l, when the tip immediately began to blacken and died. Microshoots grown in an environment with a concentration of 0.1 mg/l of 6-BAP, developed very slowly. This is probably due to the fact that such a low concentration of the drug weakly stimulate the processes of organogenesis of plants. The 6-BAP had an effective impact in a concentration range of 0.5-1.0 mg/l. However, it should be notedthat the greatest augmentation ofmicroshootswas observed in an embodiment with a concentration of 1.0 mg/l. To accelerate the process of elongation of microshootsthe study of gibberellic acid's effect was performed in various concentrations combined with 6-BAP. Experiments showed that when combining 0.5 mg/l of 6-BAP and 1.0 mg/l of GA the best result was achieved.

Studies using indole butyric acid (IBA) for rooting of shoots of grape plants *in vitro* by repeated cuttings showed that 15 days after the application, the greatest number of roots was formed in the embodiment with the IBA concentration of 2.0 mg/l. Further, rooting continued and after 30 daysthe number of rootsincreased. In parallel, an intensive growth of plants began, petioleslengthened, laminagrew, stalks stretched.

Keywords: *nutrient environment, growth regulators, meristem, explant, grapes*

КУЛЬТУРА *IN VITRO* ЛАВАНДЫ УЗКОЛИСТНОЙ (*LAVANDULA ANGUSTIFOLIA* MILL.)

М.М. Белова, М.Ю. Чередниченко
ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, г. Москва, Россия,
e-mail: *belova.pavla2015@yandex.ru*

Лаванда (*Lavandula* L.) – род растений семейства Яснотковые (Lamiaceae, или Labiatae). Лаванда успешно применяется в медицине, в производстве парфюмерно-косметических изделий, широко используется в кулинарии как пряность. В России и странах СНГ преимущественно возделывается лаванда узколистная – *Lavandula angustifolia* Mill. Сорт Munstead – декоративная форма лаванды узколистной с пурпурно-синими цветками (Бочкарёв и др., 2013).

Полезные свойства лаванды определяются содержанием в ней эфирного масла. Эфирные масла относятся ко вторичным метаболитам, разработка технологий производства которых у лекарственных и пряно-ароматических растений приобретает всё большее значение, что позволит получать необходимые вещества круглый год. Для получения необходимых продуктов вторичного метаболизма используется каллусная и суспензионная культура (Бостанова, 2006).

Нами были изучены различные режимы стерилизации при введении семян *L. angustifolia* Mill. сорта Munstead в культуру *in vitro*. Стерилизацию семян проводили 5%-ным раствором гипохлорита натрия (экспозиция 5, 10 и 15 минут) для изучения влияния режима стерилизации на эффективность прорастания семян и роста проростков лаванды узколистной. После стерилизации семена помещали на безгормональную питательную среду Мурасиге и Скуга (МС) на чашки Петри. Контролем служило нестерильное проращивание семян на фильтровальной бумаге в чашках Петри. Проростки, полученные при нестерильном проращивании, обрабатывали раствором гипохлорита натрия той же концентрации, экспозиция 5 и 10 минут, и пересаживали на ту же среду.

Проводилось клональное микроразмножение полученных растений. При достижении растениями высоты 10 см их делили на черенки (узел с сегментом междоузлия). В связи с угнетенным ростом корней черенки были пересажены на питательные среды на основе МС с ауксинами [индолилуксусная кислота (ИУК), нафтилуксусная кислота (НУК), индолилмасляная кислота (ИМК)] в концентрации 1 мг/л.

Было изучено влияние гормонального состава питательной среды Мурасиге и Скуга (МС) на эффективность морфогенеза в культуре изолированных сегментов растительных тканей. Листовые и стеблевые эксплантy от микрорастений длиной 7-10 мм помещали в чашки Петри на среду МС с различными фитогормонами и регуляторами роста: ИУК (1 мг/л), БАП (бензиламинопурин, 3 мг/л) и 3 мг/л БАП + 0,1 мг/л ИУК.

Для введения в культуру *in vitro* семян и нестерильных проростков *L. angustifolia* в качестве экспозиции можно рекомендовать минимальную продолжительность 5 минут. Для клонального микроразмножения можно рекомендовать добавление в питательную среду МС 1 мг/л НУК, что обеспечивает высокую частоту корне- и побегообразования. Варьирование концентраций и соотношений веществ ауксиновой и цитокининовой природы позволяют управлять процессами морфогенеза в культуре *in vitro*.

Ключевые слова: *лаванда узколистная (Lavandula angustifolia* Mill.*), культура in vitro, клональное микроразмножение, каллусогенез, соматический органогенез*

IN VITRO CULTURE OF *LAVANDULA ANGUSTIFOLIA* MILL.

M.M. Belova, M.Yu. Cherednichenko
FSBEI HE Russian Timirjazev State Agrarian University, Moscow, Russia,
e-mail: *belova.pavla2015@yandex.ru*

Lavender (*Lavandula* L.) is a genus of the family Lamiaceae (or Labiatae). Lavender is successfully used in medicine, in manufacture of perfumes and beauty products, it is widely used as a spice in cooking. The variety Munstead is a decorative form of *L. angustifolia* with purple-blue flowers (Bochkarev et al., 2013).

Useful properties of lavender are determined by its content of essential oil. Essential oils belong to secondary metabolites, of which the development of production technologies in medicinal and aromatic plants is of greater importance, which will allow obtaining the necessary material all year round. Callus and suspension culture are used to obtain the required secondary metabolism products (Bostanova, 2006).

We have studied various modes of sterilization at *in vitro* introduction of seeds *L. angustifolia* Mill. var. Munstead. The sterilization of seeds was carried out with a 5% solution of sodium hypochlorite (during 5, 10 and 15 minutes) to explore the influence of sterilization regime on the efficiency of seed germination and growth of seedlings of *Lavandula angustifolia*. The seeds were placed on Murashige and Skoog (MS) medium without hormones in Petri dishes after sterilization. The non-sterile seed germination on filter paper in Petri dishes was used as a control variant. Plants, obtained in non-sterile germination, were treated with sodium hypochlorite solution of the same concentration, duration in 5 and 10 minutes, and transplanted on the same medium.

Clonal micropropagation of plants was produced. After reaching a height of 10 cm plants were divided into cuttings (node with a segment of interstitial). Due to the growth inhibition of roots cuttings were transplanted to growth media based on MS with addition of auxins [indolylacetic acid (IAA), naphthylacetic acid (NAA), indolebutyric acid (IBA)] at a concentration of 1 mg/l.

The effect of the hormonal composition (auxins and/or cytokinins in different proportions) of the Murashige and Skoog (MS) cultural medium on the efficiency of morphogenesis in culture of plant tissue isolated segments also was studied. Leaf and stem explants from microplants in length of 7-10 mm were placed in a Petri dish on MS medium with different phytohormones and growth regulators: IAA (1 mg/l), BAP (benzylaminopurine, 3 mg/l) and 3 mg/l BAP + 0.1 mg/l IAA.

For an introduction at *in vitro* culture of non-sterile seeds and seedlings of *L. angustifolia* we can recommend a minimum duration of 5 minutes as a sterilization mode. For clonal micropropagation we can recommend the addition of 1 mg/l NAA into MS, which provides a high frequency of root and shoot formation. Varying concentrations and ratios of auxin's and cytokinin's substances we can control the morphogenesis processes in *in vitro* culture.

Keywords: *Lavandula angustifolia* Mill., *in vitro culture, clonal micropropagation, callus, somatic organogenesis*

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ СОРТОВ ЭФИРОМАСЛИЧНОЙ РОЗЫ В КУЛЬТУРЕ МЕРИСТЕМ *IN VITRO*

Н.А. Егорова[1,2], И.В. Ставцева[2], И.В. Митрофанова[1]
ФГБУН «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН», г. Ялта, Россия
[2]ФГБУН «НИИ сельского хозяйства Крыма», г. Симферополь, Рссия,
e-mail: *yegorova.na@mail.ru*

Одним из наиболее древних и популярных эфиромасличных растений является роза эфиромасличная, которая возделывается преимущественно в странах Средиземноморья и Ближнего Востока, а в России – в Крыму. Продукты ее переработки (прежде всего, эфирное масло) широко используются в парфюмерно-косметической и пищевой промышленности, а также в медицине при лечении заболеваний сердечно-сосудистой системы, органов дыхания, пищеварения и ряда других. Интенсификация селекции и семеноводства связана с привлечением современных биотехнологических приемов, в том числе методов клонального микроразмножения, позволяющих ускорить размножение ценных генотипов, получить оздоровленный безвирусный посадочный материал для закладки промышленных плантаций высокопродуктивных сортов. Такие методы являются также основой создания коллекций генетической плазмы, что актуально в связи с необходимостью сохранения и расширения генетического разнообразия как культурных, так и дикорастущих видов растений. В задачи данной работы входило исследование морфогенеза меристемных культур пяти сортов розы эфиромасличной на 2-м этапе микроразмножения в зависимости от генотипа, состава питательной среды и цикла размножения *in vitro*. В качестве исходных эксплантов использовали меристемы с 2-3 листовыми примордиями сортов ‘Мичуринка’, ‘Лань’, ‘Радуга’, ‘Лада’, ‘Фестивальная’ (полученных при участии *Rosa damascena* Mill*., R. gallica* L*., R. alba* L.).

Установлено, что уже на этапе введения эксплантов формировались адвентивные почки и микропобеги с укороченными междоузлиями. Лучшее развитие меристем было отмечено у сортов Радуга, Лань и Мичуринка, у которых было максимальным число развивающихся эксплантов (до 97,5%), число побегов (до 2,5 шт. на эксплант) и частота множественного побегообразования (до 92,3%).

При исследовании морфогенеза меристемных культур на 2-м этапе (собственно размножение) была показана эффективность использования для размножения розы двух методов – индукции множественного побегообразования и микрочеренкования побегов с хорошо развитыми междоузлиями, что позволяет повысить коэффициент размножения (КР). Для оптимизации состава питательной среды микропобеги с 1 узлом сортов Радуга и Мичуринка культивировали на 15-ти модификациях питательной среды Мурасиге и Скуга, различающихся по составу и содержанию регуляторов роста и углеводов. Максимальные КР в опыте (до 8,4) были получены при добавлении в состав среды 1,0 мг/л БАП, 0,2 мг/л ИУК, 0,5 мг/л гиббереллoвой кислоты и 2% глюкозы. При анализе развития меристемных культур в течение 9 циклов размножения было показано, что коэффициент размножения к 3-му циклу увеличился, достигнув максимума у сортов Радуга (15,7) и Мичуринка (13,2). При дальнейшем субкультивировании, в 5-9 циклах, КР снижался и незначительно варьировал от 4,6 до 8,2, в зависимости от сорта и пассажа. Обсуждаются особенности влияния генотипа и питательной среды на длительное размножение меристемных культур розы *in vitro*.

Ключевые слова: *роза эфиромасличная, клональное микроразмножение, культура меристем, in vitro.*

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

SOME ASPECTS OF ESSENTIAL OIL ROSE CULTIVARS CLONAL MICROPROPAGATION IN MERISTEM CULTURE *IN VITRO*

N.A. Yegorova[1,2], I.V. Stavtseva[2], I.V. Mitrofanova[1]
[1]Nikita Botanical Gardens - National Scientific Centre, Yalta, Russia
[2]Scientific Research Institute of Agriculture of Crimea, Simferopol, Russia,
e-mail: *yegorova.na@mail.ru*

One of the oldest and most popular essential oil plants is the essential oil rose, which is cultivated mainly in the Mediterranean and the Middle East countries, and in Russia – in the Crimea. The products of its processing (mainly essential oils) are widely used in perfumery and cosmetics and food industries, as well as in medicine for treatment cardiovascular, respiratory, digestive and several others diseases. Intensification of plant breeding and seed growing is associated with the involvement of modern biotechnological methods, including methods of clonal micropropagation, which can accelerate the multiplication of valuable genotypes, obtain healthy virus-free planting material for laying industrial plantations of highly productive cultivars. Such methods are also the basis for creation genetic plasma collections, which is important due to necessity to preserve and expand genetic diversity, both agricultural and wild plants. The purpose of this work was to study the morphogenesis of meristem cultures of the five essential oil rose cultivars on the second stage of micropropagation, depending on the genotype, the composition of the nutrient medium and *in vitro* propagation cycle. As initial explants meristems with 2-3 leaf primordia of cultivars 'Lany', 'Raduga', 'Lada', 'Michurinka', 'Festivalnaya' (obtained with the participation *Rosa damascena* Mill*., R. gallica* L*., R. alba* L.) were used.

It is established that already at the introduction stage of explants the adventitious buds and microshoots with short internodes were emerged. The best development of meristems was observed for 'Raduga', 'Lany' and 'Michurinka' cultivars, which had the maximum number of developing explants (up 97.5%), the number of shoots (up to 2.5 pieces per explant) and the frequency of multiple shoot formation (up 92.3%).

Investigating the meristem culture morphogenesis on the second stage (the stage of propagation actually) the efficiency of using two methods of rose propagation – the induction of multiple shoot formation and microcutting of shoots with well developed internodes, which allows increasing multiplication coefficient was shown. In order to optimize the composition of the nutrient medium the microshoots with one node of 'Raduga' and 'Michurinka' were cultured on 15 modifications of the Murashige and Skoog nutrient medium, differing in composition and content of growth regulators and carbohydrates. Maximum multiplication coefficient in the experiment (up to 8.4) were obtained adding into the medium 1.0 mg/l BAP, 0.2 mg/l IAA, 0.5 mg/l gibberellic acid and 2% glucose. When analyzing the development of meristem cultures during 9 propagation cycles it has been shown that the multiplication coefficient to the third cycle was increased, reaching maximum for cultivars 'Raduga'(15.7) and 'Michurinka' (13.2). At further subcultivation, in 5-9 cycles, multiplication coefficient was decreased and slightly varied from 4.6 to 8.2, depending on cultivar and passage. The peculiarities of genotype and the nutrient medium influence on prolonged propagation of rose meristem cultures *in vitro* are discussed.

Keywords: *rose essential oil, clonal micropropagation, meristem culture in vitro*

Aknowlegment
This study was funded by a research grant № 14-50-00079 of the Russian Science Foundation.

МОРФОГЕННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ФЛОРАЛЬНЫХ ЭКСПЛАНТОВ ВИДОВ РОДА *RHODODENDRON* L. АЗИАТСКОЙ ЧАСТИ РОССИИ

Ю.Г. Зайцева, Т.И. Новикова
ФГБУН Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, г. Новосибирск, Россия,
e-mail: *ulianna_zaitseva@mail.ru*

Ценным генетическим ресурсом для селекции новых форм и сортов рододендронов, произрастающих на юге Западной Сибири, являются *Rhododendron dauricum* L. и *R. sichotense* Pojark. – высоко декоративные морозостойкие кустарники, обладающие полиморфизмом по окраске венчика и срокам цветения. Создание систем регенерации с использованием флоральных эксплантов позволяет проводить отбор форм с уникальной окраской венчика в полевых условиях. Использование флоральных эксплантов имеет ряд преимуществ, главные из которых – низкий уровень контаминации и продолжительный временной интервал для изоляции бутонов. Исследования регенерационного потенциала флоральных эксплантов рододендронов не многочисленны, и в основном касаются вечнозеленых видов и сортов, однако, в силу генотипических различий эти приемы могут быть не эффективны для микроразмножения листопадных или полувечнозеленых видов. Цель представленного исследования – создать системы прямой регенерации побегов из флоральных эксплантов *R. dauricum* и *R. sichotense* с использованием различных регуляторов роста, включая тидиазурон (ТДЗ).

Закрытые бутоны *R. dauricum* и *R. sichotense* изолировали из тепличных растений в феврале, затем стерилизовали, извлекали пестик с цветоножкой и помещали горизонтально на питательные среды Андерсона (АМ), дополненные только ТДЗ (1,0–5,0 мкМ), ТДЗ в сочетании с 2,5 мкМ зеатина или 73,8 мкМ изопентиладанина (2-iP) и 15,0 мкМ индолилмасляной кислотой (ИМК). Время культивирования 11 недель. Для повышения регенерационной способности часть эксплантов предкультивировали на среде без регуляторов роста (АМ0) в течение 4-х суток. Затем экспланты переносили на индукционные среды, содержащие ТДЗ (1,0–5,0 мкМ) и 2,5 мкМ зеатина на 8 недель. Подсчет числа побегов на эксплант и их высоты поводили после 6 недель элонгации на АМ0.

В результате разработан новый двухступенчатый протокол прямой регенерации побегов из флоральных эксплантов *R. dauricum*, включающий предкультивирование в течение 4 суток на АМ0, индукцию морфогенеза при помощи 1,0 мкМ ТДЗ и 2,5 мкМ зеатина с последующей элонгацией побегов на АМ0. Регенерация побегов происходила на цветоножке флоральных эксплантов. Предкультивирование флоральных эксплантов *R. dauricum* позволило почти в два раза увеличить частоту регенерации (с 40 до 87,5%) и стимулировать морфогенный ответ на 3 недели ранее, чем без предкультивирования. Разработанная двухступенчатая система оказалась эффективной и при индукции морфогенеза из флоральных эксплантов *R. sichotense*, регенерационный потенциал которых был выше (100%), чем у *R. dauricum*. Полученные результаты будут служить основой для селекции морозостойких форм с различной окраской венчика.

Ключевые слова: *Rhododendron, флоральные экспланты, прямая регенерация, тидиазурон.*

MORPHOGENIC POTENTIAL OF FLORAL EXPLANTS OF *RHODODENDRON* SPECIES FROM ASIAN RUSSIA

Yu.G. Zaytseva, T.I. Novikova
Central Siberian Botanical Garden, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation, e-mail: *ulianna_zaitseva@mail.ru*

Rhododendron dauricum L. and *R. sichotense* Pojark. are valuable genetic resources for breeding of new rhododendron forms and cultivars growing in Asian Russia. They are ornamental winter-hardy shrubs with polymorphism of corolla color and the term of flowering. The development of regeneration systems using floral explants allows selecting *Rhododendron* forms with a unique corolla color in the field conditions. *Rhododendron* floral explants have advantages the most important of which are low level of contamination and a long period to isolating flower buds. There are only few studies on regenerative potential of floral explants, which are mostly related to evergreen rhododendrons. The aim of the study was to develop direct systems of shoot regeneration from floral explants of *R. dauricum* and *R. sichotense*, using different plant growth regulators (PRG), including thidiazuron (TDZ).

Unopened flower buds were isolated from *R. dauricum* and *R. sichotense* growing in the greenhouse. Then they were sterilized and placed horizontally on the surface of Anderson's medium (AM), supplemented with different PRGs: TDZ (1.0–5.0 μM); TDZ (1.0–5.0 μM) in combination with either 73.8 μM 2-isopentenyladenine (2-iP) and 15.0 μM indole-3-butyric acid (IBA) or 2.5 μM zeatin. The cultivation was for 11 weeks. To improve the regenerative capacity, a part of isolated floral explants was precultivated on PGR-free AM (AM0) for 4 days. Then explants were transferred on AM, supplemented with 2.5 μM zeatin in combination with TDZ (1.0 – 5.0 μM) for 8 weeks. The number of shoots per explant was counted after 6 weeks of elongation on AM0.

As a result, a new two-stage protocol of direct shoot regeneration from *R. dauricum* floral explants, including the preculture on AM0 for 4 days and morphogenesis induction under 1.0 μM TDZ and 2.5 μM zeatin followed by shoot elongation on AM0 has been developed. The regeneration of shoots occurred on pedicle of the floral explants. The preculture of floral explants increased the regeneration frequency twofold (from 40 up to 87.5%) and promoted the morphogenic response 3 weeks earlier than without preculture. The developed two-stage procedure was also effective for morphogenesis induction from *R. sichotense* floral explants, whose regenerative potential was higher (100%) than for *R. dauricum*. The study provides the basis for further breding of Asian rhododendrons in order to obtain frost-hardy cultivars with a unique corolla color.

Keywords: *Rhododendron, floral explants, direct regeneration, thidiazuron*

РАЗМНОЖЕНИЕ ВИДОВ РОДА *IRIS* L. *IN VITRO*

А.А. Зарипова, А.Ш. Ахметова, А.А. Мухаметвафина
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Ботанический сад-институт Уфимского научного центра Российской академии наук, г. Уфа, Башкортостан, Россия, e-mail: *zaripova.al@mail.ru*

Методы культуры изолированных органов, тканей и клеток растений *in vitro* в настоящее время широко используются для решения как теоретических, так и прикладных задач биотехнологии и физиологии растений. Культивируемые клетки представляют собой пластичные системы, обладающие способностью менять процессы дифференциации под воздействием определенных физических и химических факторов. Это свойство дает возможность подобрать условия для максимальной реализации морфогенетического потенциала культивируемого эксплантa, заканчивающейся формированием регенерантов при разработке технологий размножения.

В статье представлены данные по размножению видов рода Касатик *Iris* L. в культуре *in vitro*. Разработан способ размножения видов растений *Iris ensata* Thunb., *I. pumila* L. и *I. domestica* Goldblatt.&Mabb. в культуре *in vitro*. Изучаемые виды включены в Красную книгу Российской Федерации как редкие, являются декоративными и используются в традиционной китайской медицине. Подобраны условия стерилизации, позволяющие достичь максимального числа жизнеспособных эксплантов *I. ensata* – 75,6%; *I. pumila* – 89,3% и *I. domestica* – 91,7% при последовательном выдерживании семян в 70%-ном растворе этанола в течение 1 мин и 0,1%-ном растворе диацида в течение 10 мин. Показано, что способность к индуцированному морфогенезу существенно зависела от гормонального состава питательной среды. Оптимальными для побегообразования изучаемых видов являлись питательные среды Мурасиге и Скуга с добавлением БАП в концентрации 0,2 мг/л совместно с НУК – 0,5 мг/л, а так же ИМК в концентрации 1,0 мг/л совместно с кинетином в концентрации 0,5 мг/л. Наибольшая регенерационная способность отмечена на среде Мурасиге и Скуга, содержащей ИМК в концентрации 1,0 мг/л и кинетин – 0,5 мг/л. Исследуемые виды обладали высокой способностью к множественному побегообразованию и формированию полноценных растений при подобранных условиях культивирования *in vitro*. Коэффициент размножения микропобегов *I. ensata* составил 12,1; *I. pumila* – 9,6 и *I. domestica* – 8,4. Укоренение побегов *I. ensata*, *I. pumila* и *I. domestica* происходило на питательной среде для ихразмножения, поэтому не требовалось дополнительной гормональной стимуляции для образования корней.

Ключевые слова: *Iris ensata; I. pumila; I. domestica; размножение in vitro; редкие виды*

PROPAGATION OF *IRIS* L. SPECIES *IN VITRO*

A.A. Zaripova, A.Sh. Akhmetova, A.A. Mukhametvafina
Botanical Garden-Institute of Ufa Scientific Center, Rus. Acad. Sci, Ufa, Bashkortostan, Russia, e-mail: *zaripova.al@mail.ru*

New days methods of isolated organs, tissues and plant cells *in vitro* culture are widely used to decide both theoretical and applied problems of biotechnology and plant physiology. Cultured cells are plastic systems which have the ability to change the differentiation processes under the influence of certain physical and chemical factors. This feature allows us to choose the conditions for maximum realization of morphogenetic potential cultivated explant, formation of regenerated plants in the development of propagation technologies. The article presents data on the propagation of *Iris* L. species in culture *in vitro*. Method of propagation of *Iris ensata* Thunb., *I. pumila* L. and *I. domestica* Goldblatt. & Mabb. in culture *in vitro* is developed. The studied species are included in the Red Book of the Russian Federation as a rare, decorative and used in traditional Chinese medicine. The conditions of sterilization are selected which maximize the number of viable explants *I. ensata* - 75,6%; *I. pumila* - 89.3% and *I. domestica* - 91.7%. It has been shown that the ability to induced morphogenesis is substantially dependent on hormonal composition of the nutrient medium. Nutrient media of Murasige and Skoog supplemented with BAP 0.2 mg/l together with NAA 0.5 mg/l, as well as IMC 1.0 mg/l together with kinetin 0.5 mg/l were optimal for shoot formation. The greatest regenerative capacity is noted on MS medium containing IBA 1.0 mg/l and kinetin 0.5 mg/l. The investigated species had a high capacity for multiplication and formation of high-grade plant at the chosen culture conditions *in vitro*. Coefficient of shoot multiplication of *I. ensata* is 12.1; *I. pumila* – 9.6 and *I. domestica* – 8.4. Rooting multiplied shoots *I. ensata*, *I. pumila* and *I. domestica* happened on a nutrient medium for their animation, so do not require additional hormone stimulation for rooting.

Keywords: *Iris ensata; I. pumila; I. domestica; propagation in vitro; rare species*

ОСОБЕННОСТИ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ ДЕКОРАТИВНЫХ СОРТОВ БОЯРЫШНИКА КОЛЮЧЕГО «CRIMSON CLOUD» И «PAUL'S SCARLET»

О.А. Землянухина, В.Н. Калаев
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Воронежский государственный университет» (ФГБОУ ВО «ВГУ»), г Воронеж, Россия, e-mail: *oz54@mail.ru*

Род *Craetegus* L. включает приблизительно 250 видов, каждый из которых насчитывает множество сортов, и является одним из самых крупных в семействе *Rosaceae*. В России произрастает около 100 видов боярышника и еще около 50 видов интродуцировано. В декоративном садоводстве наиболее заметными являются два сорта боярышника колючего (или обыкновенного, или сглаженного) *Crataegus laevigata* (Poir.) DC. «Paul's Scarlet» и «Crimson Cloud», хорошо зимующими в 4-ой климатической зоне, куда относится г. Воронеж. Все боярышники черенкуются крайне плохо, размножение декоративных сортов осуществляется только прививкой. Поэтому остро встает задача тирражировать эти сорта с помощью клонального микроразмножения, которое позволяет сохранять генофонд редких, трудноукореняемых и хозяйственно ценных видов и сортов в виде растущих коллекций.

Одним из главных вопросов является выбор первичного эксплантa и оптимизация его регенерации для получения активно пролиферирующей культуры. Выращивание растений осуществляли на основе активизации и мультипликации меристем, уже имеющихся у растений. При начале распускания почек (зеленый конус) были использованы побеги прошлого года с 2-3 спящими пазушными почками. Стерилизацию осуществляли путем погружения растительного материала в раствор, содержащий 4% бытового отбеливателя «Белизна» и 0,01-0,02% мертиолята (орто-этилртутьтиосалицилата натрия). Трижды отмытые в стерильной дистиллированной воде побеги нарезали на части по одной пазушной почке и помещали в питательную среду WPM с половинным набором макросолей и сахарозы, дополненную 0,2 мг/л БАП и 0,1 мг/л $ГК_3$. Развитие пробегов на стеблевых эксплантах протекало на протяжении полугода, в течение которого удлиняющиеся побеги изолировали и помещали на питательную среду того же состава. При получении необходимого количества регенерантов исходные экспланты удаляли, несмотря на то, что они сохраняли способность к микроразмножению. Установлено, что для получения максимального количества регенерантов определяющим фактором является минеральный состав среды: на средах с половинным количеством макросолей и сахарозы число побегов было достоверно больше, чем на средах с полным солевым составом. Способность к регенерации в значительной степени варьировала от сорта боярышника. На черенках «Paul's Scarlet» из пазушной почки в течение двух недель формировалось 3-5 побегов, образуя к концу первого месяца инкубации 12-20 растений, тогда как для «Crimson Cloud» этот показатель был ниже и составил 5-6 растений в оптимальных условиях (среда ½WPM). Укоренение на среде, дополненной 1,5 мг/л ИУК+1,5 мг/ ИМК, или 1,0 мг/ ИУК+1,0 мг/л ИМК, или 1 мг/л ИУК, или 0,5 мг/л ИМК не дало положительных результатов. Образование корней было достигнуто на среде, содержащей 1 мг/л НУК, после выдерживания эксплантов при низких температурах в темноте в течение 14 суток.

Ключевые слова: *боярышник обыкновенный, декоративные сорта, клональное микроразмножение*

ON SOME PECULIARITIES OF *CRATAEGUS LAEVIGATA* (POIR.) DC. ORNAMENTAL VARIETIES «CRIMSON CLOUD» AND «PAUL'S SCARLET» IN THE COURSE OF CLONAL MICROPROPAGATION

O.A. Zemlianuhina, V.N. Kalaev
Federal State Budgetary Educational Institution of High Vocational Training "Voronezh State University" (FGBOU VO VGU), Voronezh, Russia, e-mail: *oz54@mail.ru*

Being the major genus in the *Rosaceae* family, genus *Craetegus* L. consists of about 250 species, each in its turn has multitude sorts. There are 100 species of hawthorn of already growing and 50 species are introduced in Russia. *Crataegus laevigata* (Poir.)DC. two species of which, such as «Paul's Scarlet» and «Crimson Cloud» are the most important for ornamental gardening. In the forth climatic zone, which includes Voronezh, they are wintering well. All hawthorn species are poorly cut and their ornamental varieties are propagated by grafting. The research task was to generate these two species by micropropagation *in vitro* conditions with the aim to preserve rare, hard rooted and economically valuable genus in the form of growing collections.

Primary explant and optimal conditions for its regeneration are the main factors to obtain actively proliferating culture. The plants growth was carried out on the basis of direct meristem activation and multiplication. As a primary explant the previous year lateral shoots with 2-3 leaf axillary buds (green cone) were taken. Plants were treated with a sterilizing solution containing 4% of the «whiteness» supplemented with 0.01-0.02% merthiolate ((ethyl(2-mercaptobenzoato-(2-)-O,S) mercurate(1-) sodium)). Washed three times, one bud shoot explants were inoculated in ½ WPM with 0.2 mg/l of 6-bensylaminopurine (BAP) and 0.1 mg/l of gibberellic acid (GA_3) added to this medium. During half a year period elongating plants were isolated and placed on the same composition medium. The required number of regenerated plants obtained, primary explants were thrown away regardless of the fact they still retained the micropropagation ability.

In order to obtain the maximum number of plantlets medium mineral composition is efficiently significant. It was evident that the number of plantlets on the medim with half ionic strength and sucrose was higher than on the medium with the complete strength of these components. Regeneration ability was dependent on hawthorn species. During two weeks one «Paul's Scarlet» bud gave within 3-5 shoots while to the end of the month 12-20 plantlets were formed. At the same time one «Crimson Cloud» bad gave only 5-6 shoots (½WPM). Rooting on medium with 1.5 mg/l idole-3-acetic acid (IAA) and 1.5 mg/l indole-3-butyric acid (IBA) or 1.0 mg/l IAA and 1.0 mg/l IBA or 1 mg/l IAA or 0.5 mg/l IBA was not successful. Root induction was reached by adding 1 mg/l of naphthalene acetic acid (NAA) after the explants were exposed at low temperatures in the dark during 14 days.

Keywords: *Crataegus laevigata, ornamental varieties, micropropagation*

РАЗЛИЧНЫЕ ПУТИ РЕГЕНЕРАЦИИ РАСТЕНИЙ ХУРМЫ ВОСТОЧНОЙ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Н.Н. Иванова, С.Ю. Хохлов, И.В. Митрофанова
ФГБУН «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН», г. Ялта, Россия, e-mail: *invitro-plant@mail.ru*

Субтропические плодовые культуры являются источником наиболее важных компонентов питания человека. Климатические условия юга России позволяют выращивать различные ценные субтропические культуры, среди которых хурма восточная *Diospyros kaki* Thunb., занимает особое место. Плоды хурмы богаты витаминами и полифенольными веществами, каротиноидами, лейкоантоцианами, а также органическими соединениями калия, кальция, железа и йода. Традиционные методы вегетативного размножения имеют ряд ограничений, особенно когда необходимо за короткий период получить большое количество посадочного материала. Биотехнологические методы в комплексе с вирусологическими позволяют освободить растения от вирусной инфекции, а также решить проблему массового тиражирования ценных видов и сортов для пополнения генофонда и создания медленно растущих коллекций в условиях *in vitro.* Однако до настоящего времени не разработаны способы эффективной регенерации растений *in vitro* большинства сортов хурмы отечественной селекции.

Целью нашего исследования было выявление возможных путей регенерации растений хурмы восточной перспективного сорта Золотистая из вегетативных почек и высечек листа в условиях *in vitro*. В ходе исследования определены сроки отбора эксплантов, способ стерилизации, модифицирован состав питательной среды, подобраны оптимальные концентрации регуляторов роста для индукции морфогенетических процессов. Для прямой регенерации вегетативные почки помещали на питательную среду МС (1/2 N), дополненную 4,9 мкМ БАП и 0,98 мкМ ИМК. Через 4-5 недель культивирования на данной среде средний коэффициент размножения составлял 1,86. Последующие пассажи позволили увеличить коэффициент до 2,4 путем формирования адвентивных микропобегов из базальной части микропобегов, а также из узлов. Применяя микрочеренкование *in vitro* (микропобег разделяли на 3-5 сегментов с узлом) можно было получит 8-кратное увеличение коэффициента через 6-8 недель культивирования. Дальнейшее увеличение концентрации цитокинина в среде способствовало появлению конгломератов адвентивных побегов, которые не удлинялись. Субкультивирование микропобегов на среде с низким содержанием БАП обеспечило их удлинение.

Высечки листьев микропобегов, полученных в культуре *in vitro* культивировали на модифицированной питательной среде МС, дополненной тидиазуроном (ТДЗ) в концентрации 3, 6, 9 и 12 мкМ. Индукцию органогенеза из высечек листа отмечали через 6 недель культивирования на среде МС, дополненной 6 и 9 мкМ ТДЗ. В результате получено 4 типа каллуса: зеленый шаровидный каллус; зеленый каллус с темными зонами; темно-коричневый каллус; светло-серый рыхлый каллус. Адвентивные почки формировались через 4-6 недель только на поверхности зеленого шаровидного, меристемоподобного каллуса в виде бугорков, из которых затем дифференцировались микропобеги. Полученные микропобеги отделяли от каллуса, микрочеренковали и культивировали на среде ½ нормы МС, дополненной БАП и ИМК.

Ключевые слова: *хурма, эксплант, регенерация in vitro, микропобег*

Исследования выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 14-50-00079.

DIFFERENT WAYS OF PERSIMMON PLANTS REGENERATION *IN VITRO*

N.N. Ivanova, S.Y. Khokhlov, I.V. Mitrofanova
Nikita Botanical Gardens - National Scientific Centre, Yalta, Russia,
e-mail: *invitro-plant@mail.ru*

Subtropical fruit crops are the source of the most important components of human nutrition. The climatic conditions of the south of Russia allow growing a variety of valuable subtropical crops, including persimmon *Diospyros kaki* Thunb. Persimmon fruits are rich in polyphenol substances and vitamins, carotenoids, leucoanthocyanins and organic compounds of potassium, calcium, iron and iodine. Fruit pulp contains 13 organic acids and up to 25.9% sugars - glucose and fructose. Traditional methods of vegetative propagation are limiting, especially when it is necessary to obtaine a large number of planting material in a short time. Biotechnological methods combined with virological ones enable to clean plants up of viral infection, as well as to solve the problem of mass propagation of valuable species and varieties for gene pool adjunction and creation of slow-growing collections *in vitro*. However, effective methods of plant regeneration *in vitro* have not been developed for most persimmon varieties of native breeding.

The aim of our study was to identify possible ways of regeneration for promising persimmon cultivar Zolotistaya from vegetative buds and leaf segments *in vitro*. In the present study we identified terms for sampling explants and sterilization method, medium composition was modified and optimal concentration of plant growth regulator morphogenetic processes induction were selected. In order to obtaine direct regeneration vegetative buds were placed on MS (1/2 N) medium, supplemented with 4.9 µM BAP and 0.98 µM IBA. After 4-5 weeks of culture on this medium an average multiplication rate was 1.86. Subsequent passages allowed increasing the rate up to 2.4 by forming adventitious microshoots in the basal part of microshoots, as well as in the nodes. Applying of micrografting *in vitro* (separated microshoots were cut in 3-5 nodal segments) gave us possibility to obtain 8-fold increase of multiplication rate after 6-8 weeks of culture. Further increase of cytokinin concentration in the medium was favourable for clustered microshoots formation, which did not elongate. Subculture of the microshoots on a medium with a low BAP concentration promoted their elongation.

Leaf segments of *in vitro* produced microshoots were cultured on a modified MS medium supplemented with 3, 6, 9, and 12 µM thidiazuron (TDZ). Induction of organogenesis from the leaf segments was noticed after 6 weeks culture on MS medium supplemented with 6 and 9 µM TDZ. The result was 4 types of callus: green globular callus; green callus with dark areas; dark brown callus; light gray friable callus. Adventitious buds were formed in 4-6 weeks only on the surface of green globular, meristem-like callus in the form of protuberances, which differentiated into microshoots. These microshoots were excised from the callus, cut for micrografts and cultured on ½ MS medium, supplemented with BAP and IBA.

Keywords: *persimmon, explant, in vitro regeneration, microshoots*

Aknowlegment
This study was funded by research grant N 14-50-00079 of the Russian Science Foundation.

КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ ИССОПА ЛЕКАРСТВЕННОГО В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Т.Г. Кучина, М.Ю. Чередниченко
Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева, факультет агрономии и биотехнологии, г. Москва, Россия, e-mail: *Kuchina_t.g@mail.ru*

Растения *in vivo* могут накапливать токсичные для человека вещества, тяжелые металлы, а количественное содержание составных компонентов в них подвержено значительным колебаниям, обусловленным средой обитания и экологическими факторами. Клональное микроразмножение растений имеет ряд преимуществ, такие как: получение генетически однородного материала, проведение работ в течение всего года, ускорение роста растений, оздоровление растений от вирусов, высокий коэффициент размножения, а также получение экологически чистого сырья лекарственных растений и др.

Иссоп лекарственный (*Hyssopus officinalis* L.) – многолетнее пряно-лекарственное растение семейства Lamiaceae. Иссоп содержит эфирное масло, которое используют в медицине, косметологии, парфюмерии. Также его масло широко используется для пищевых добавок и напитков (Murakami et al., 1998). Согласно литературным данным, вторичные метаболиты иссопа лекарственного обладают отхаркивающим, спазмолитическим, противоотечным, тонизирующим действием, а некоторые разновидности синтезируют вещества, проявляющие сильное противовирусное действие, особенно против вируса герпеса (Franchomme et al., 1990).

В наших экспериментах мы подбирали оптимальный состав среды для клонального микроразмножения иссопа лекарственного в условиях *in vitro*.

Черенки, полученные из взрослых растений иссопа длиной более 180 мм, помещали на несколько вариантов питательных сред на основе прописи Мурасиге и Скуга (МС) без добавления фитогормонов и регуляторов роста и с добавлением 0,5 мг/л индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) или 1 мг/л индолил-3-масляной кислоты (ИМК). У растений иссопа на питательной среде МС с добавлением 1 мг/л ИМК наблюдали активный рост, они имели максимальное количество развитых корней и наибольшую длину побега, были более жизнеспособными по сравнению с растениями в других вариантах опыта. На среде без добавления фитогормонов и регуляторов роста растения формировали корни менее активно, чем в предыдущем варианте опыта, рост побегов был также менее активным. Растения, помещенные на среду МС с добавлением 0,5 мг/л ИУК, не образовывали корней, имели наименьшую длину побега и погибали.

В опыте с альтернативной минеральной основой питательной среды (по прописи Гамборга) существенных различий в динамике роста в сравнении с питательной средой МС отмечено не было.

Ключевые слова: *Hyssopus officinalis, Lamiaceae, лекарственные растения, клональное микроразмножение*

CLONAL MICROPROPAGATION *IN VITRO* OF *HYSSOPUS OFFICINALIS* L.

T.G. Kuchina, M.Yu. Cherednichenko
Russian Timiryazev State Agrarian University, faculty of agronomy and biotechnology, Moscow, Russia, e-mail: *Kuchina_t.g@mail.ru*

In vivo plants can accumulate toxic substances, heavy metals, and quantitative content of its compounds is a subject to substantial fluctuations due to habitat and environmental factors. Clonal micropropagation of plants has several advantages such as: obtaining genetically uniform material, works the whole year round, accelerating the growth of plants, the recovery of plants from viruses, a high rate of reproduction and obtaining of ecologically pure raw material of medicinal plants, etc.

The officinal hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) is a perennial spicy-medicinal plant of the family Lamiaceae. Hyssop contains an essential oil, which is used in medicine, cosmetics, perfumery. Its oil is widely used for food additives and beverages (Murakami et al., 1998). According to literature data, the officinal hyssop has expectorant, antispasmodic, decongestant, tonic effect, and some of its varieties exhibit strong antiviral activity, particularly against herpes virus (Franchomme et al., 1990).

In our experiments, we chose the optimal composition of the medium for clonal micropropagation of *H. officinalis in vitro.*

Cuttings obtained from mature plants of hyssop in length more than 180 mm were placed on several variants of the nutrient medium on the basis of prescription of Murashige and Skoog medium (MS) without phytohormones and growth regulators and with the addition of 0.5 mg/l indole-3-acetic acid (IAA) or 1 mg/l indole-3-butyric acid (IBA). The plants planted on the MS medium with addition of 1 mg/l IBA showed an active growth, they had developed maximum number of roots and the highest shoots, were more viable compared with plants in other variants of the experiment. On medium without added phytohormones and growth regulators plants formed roots are less active than in the previous variant, the growth of shoots was also less active. Plants placed on MS medium supplemented with 0.5 mg/l IAA not formed roots had the shortest length of shoots and died.

In the experiment with alternative mineral-based nutrient medium (Gamborg medium) significant differences in the dynamics of growth in comparison with a nutrient medium MS were not observed.

Keywords: *Hyssopus officinalis, Lamiaceae, medicinal herbs, clonal micropropagation*

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МХА-СФАГНУМА НА СТАДИИ УКОРЕНЕНИЯ И АДАПТАЦИИ РЕГЕРАНТОВ *EX VITRO*

Е.И. Любимова, Л.Н. Коновалова
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина Российской академии наук, г. Москва, Россия,
e-mail: *molkanova@mail.ru*

Укоренение и адаптация растений - регенерантов к условиям *ex vitro* являются самыми критичными этапами клонального микроразмножения для многих видов растений. При пересадке в почву массовая гибель регенерантов вызвана действием патогенной микрофлоры, стрессом от резкого изменения влажности воздуха.

Разработка технологий объединяющих эти этапы позволит не только сократить сроки получения растений и повысить их качество, но и свести к минимуму потери растений – регенерантов при адаптации к условиям *ex vitro*.

В ходе наших исследований проведен эксперимент по использованию мха сфагнума для укоренения и адаптации, что позволило объединить эти этапы.

Сфа́гнум, или Торфяно́й мох (*Sphagnum* L.) - болотное растение, род мха. Антибактериальные, дезинфицирующие и даже противогрибковые свойства сфагнума обусловлены теми веществами, которые входят в его состав. Сфагнум содержит фенольные и тритерпеновые соединения, гуминовые или сфагновые кислоты, смолы, сахара, пектиновые элементы и другие вещества. Наряду с антибактериальным и обеззараживающим действием обнаружены дезинфицирующие и противогрибковые свойства растения. Мох превосходно пропускает воздух и способен впитывать большое количество жидкости. Культивирование регенерантов на вегетирующем сфагновом мхе с предварительной обработкой побегов раствором ИМК дает возможность обеспечить постепенное понижение относительной влажности воздуха. При высадке такие растения легче адаптируются к условиям теплицы.

В качестве объектов исследования - представители рода *Actinidia, Rosa*, *Rubus, Syringa* и *Clematis.* Проведена серия опытов по укоренению и адаптации растений - регенерантов на мхе сфагнуме. Растения, получаемые с использованием мха-сфагнума для укоренения микропобегов, имеют большую высоту, сырую и сухую массу побегов и корней по сравнению с регенерантами, укореняемыми *in vitro*. При использовании мха сфагнума укореняемость и приживаемость побегов составляет около 100%.

Ключевые слова: *мох-сфагнум, ex vitro, укоренение, адаптация, растения регеранты*

THE USE OF *SPHAGNUM* L. AT THE STAGE OF ROOTING AND ADAPTATION OF REGERANTS *EX VITRO*

E.I. Lyubimova, L.N. Konovalova
Federal State Institution of Science Botanical Garden. named after N.V. Tsitsin of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, e-mail: *molkanova@mail.ru*

Rooting and adaptation of regenerated plants to the conditions *ex vitro* are the most critical stages of clonal micropropagation of many plant species. When transplanting into the soil mass death of regenerants caused by the action of pathogenic organisms, stress from abrupt changes in humidity.

Development of technologies combining these steps will not only reduce the time of production of plants and to improve their quality, but also to minimize the loss of regenerated plants during adaptation to *ex vitro* conditions.

In the course of our research we conducted an experiment on the use of sphagnum moss for rooting and adaptation that made it possible to combine these stages.

Sphagnum, or Peat moss (*Sphagnum* L.) is a marsh plant, rod moss. Antibacterial, disinfectant, and even anti-fungal properties of sphagnum caused by substances which enter into its composition. Sphagnum moss contains phenolic and triterpene compounds, humic or sphagnum acid, resin, sugar, pectin elements and other substances. Along with antibacterial and disinfecting effect detected disinfectant and antifungal properties of the plant. Moss excellent air-permeability and is able to absorb a lot of liquid. The cultivation of regenerated plants growing on sphagnum moss with the pre-treatment of shoots with a solution of the IBA makes it possible to provide a gradual decrease in relative humidity. When planting these plants adapt to the conditions of the greenhouse.

As objects of research - the representatives of the genus *Actinidia, Rosa, Rubus, Syringa* and *Clematis*. A series of experiments on rooting and adaptation of regenerated plants on the sphagnum moss. Plants obtained by using the moss- sphagnum for rooting of microshoots, have a great height, wet and dry weight of shoots and roots compared with the regenerated, rooted *in vitro*.

When using sphagnum moss rooting and survival of shoots about 100%.

Keywords: *moss-sphagnum, ex vitro, rooting, adaptation, regerants*

ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ИНДУКЦИИ МОРФОГЕНЕЗА И КЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ *CAMELIA JAPONICA* (L.) И *HYDRANGEA MACROPHYLLA* (SER.) В УСЛОВИЯХ КУЛЬТУРЫ *IN VITRO*

В.И. Маляровская, С.Л. Губаз, Т.М. Коломиец, М.В. Гвасалия
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт цветоводства и субтропических культур», г. Сочи, Россия, e-mail: *malayrovskaya@yandex.ru*

Морфогенез растений *in vitro* является ключевым процессом как для разработки эффективных протоколов клонального микроразмножения ценных генотипов, так и для познания фундаментальных основ биологии развития растений. Имеющиеся единичные данные по микроразмножению красивоцветущих кустарников (*Camelia japonica* L., *Hydrangea macrophylla*) в полной мере не дают представления о процессах клеточной детерминации и морфологической дифференциации, связанных с побегообразованием *de novo.*

В связи с этим разработка методов культивирования изолированных тканей и органов красивоцветущих кустарников (*Camellia japonica, Hydrangea macrophylla)* с целью изучения особенностей индукции морфогенеза и клонального микроразмножения, а также сохранения генoресурсов культур является актуальной.

В результате изучения действия минерального состава питательной среды на индукцию морфогенеза двух видов красивоцветущих кустарников, *Camelia japonica* L. и *Hydrangea macrophylla* Ser., установлено, что развитие эксплантов зависело как от генотипа, так и от состава среды. Лучшей минеральной основой для камелии японской была питательная среда по прописи WPM. При этом отмечено существенное различие между сортами по индукции морфогенеза. Активная пролиферация почек проходила у сорта *Lelie* (65,1%), а медленнее этот процесс протекал у сорта *Bochi* (43,4%). Для *Hydrangea macrophylla* наоборот лучшие результаты были получены при культивировании эксплантов на питательной среде Мурасиге и Скуга. В результате исследований были отмечены различия в индукции морфогенеза у различных генотипов. Доля эксплантов развившихся в микропобеги у сорта *Draps Wande* была выше, чем у сорта *Madam Hamard* и составляла 67,9% и 61,5%, соответственно.

Выявлено отличие действия разных соотношений и концентраций регуляторов роста на индукцию морфогенеза красивоцветущих кустарников. У камелии японской на базальной части микропобегов наблюдали образование каллусной ткани, которая в дальнейшем замедляла их рост. При этом активное развитие каллуса было у сорта *Reine des Beautes* (15,6%) и сорта *Bochi* (19,6%) на варианте с содержанием гормонов роста 6-БАП, НУК и ГК в концентрациях – 2,0 мг/л, 0,5 мг/л и 1,0 мг/л, соответственно.

В результате проведенных исследований был определен оптимальный тип эксплантов: для красивоцветущих кустарников - пазушные и апикальные почки с частью побега. Установлено, что на индукцию морфогенеза эксплантов изученных культур (*C. japonica* L., *H. macrophylla*) оказывали влияние различные факторы, к которым в первую очередь можно отнести: сортовые особенности, минеральную основу питательной среды и сочетание различных регуляторов роста.

Выявлены оптимальные минеральные основы питательной среды и гормональный состав на этапах введения и микроразмножения гидрангеи крупнолистной это среда по прописи Мурасиге и Скуга с 2,0 мг/л 6-БАП, 0,5 мг/л НУК, 0,5 мг/л ГК; для камелии японской среда по прописи WPM с 2,0 мг/л ТДЗ, 0,5 мг/л кинетина, 1,0 мг/л ГК.

Ключевые слова: *камелия японская, гидрангея крупнолистная, культура in vitro, индукция морфогенеза, клональное микроразмножение*

STUDY OF MORPHOGENESIS AND CLONAL PROPAGATION *IN VITRO* OF *CAMELLIA JAPONICA* (L.) AND *HYDRANGEA MACROPHYLLA* (SER.)

V.I. Malyarovskaya, S.L. Gubaz, T.M. Kolomiets, M. Gvasalia
Federal State Budgetary Scientific Institution «Russian Research Institute of Floriculture and Subtropical Crops», Sochi, Russia, e-mail: *malyarovskaya@yandex.ru*

Morphogenesis of plants in vitro is a key process for development of effective protocols for clonal propagation of valuable cultivars as well as for understanding basic questions of plant developmental biology. Only few data of micropropagation of ornamental shrubs (*Camelia japonica* L., *Hydrangea macrophylla*) present in literature and do not provide fully understanding of cell determination and morphological differentiation processes associated with *de novo* adventitious shoot induction.

For this reason development of tissue and organ propagation techniques of ornamental shrubs (*C. japonica, H. macrophylla),* including their morphogenesis, micropropagation and conservation of genetic resources is needed.

Our results of study the effect of basal media on morphogenesis induction in the two ornamental shrubs (*C. japonica* and *H. macrophylla*) showed dependence of explant development on cultivar and media composition. In our study the best basal media for *C. japonica* was WPM. Herewith significant difference was noted between cultivars during their morphogenesis induction. Bud proliferation was more efficient in *cv. Lelie* (65.1%) comparing to *cv. Bochi* (43.4%). Best explant proliferation of *H. macrophylla* was obtained using MS culture media. The genotype effect was also significant during morphogenesis induction: the rate of explants derived into new shoots was higher in *cv. Draps Wonder* comparing with *cv. Madam Hamard* (67.9% and 61.5%, respectively).

Effect of plant growth regulators on morphogenesis induction was different in two species. Formation of basal callus was observed in *C. japonica* microcutings and it was inhibited further growth of microplants. The callus developed actively in *cv. Reine des Beautes* (15.6 %) and in *cv. Bochi* (19.6%) when explants were cultured on media containing 2.0 mg/l 6-BAP, 0.5 mg/l NAA and 1.0 mg/l GA.

The best explant type for *in vitro* propagation of two ornamental shrubs was determined during the study: auxiliary buds and apical buds with a part of the shoots. The effect of different factors (mainly genotype, basal media and plant growth regulators) on *in vitro* morphogenesis of *C. japonica* and *H. macrophylla* was established.

Optimal basal media and growth regulators were established for tissue culture initiation and in vitro propagation of two species. It was MS media supplemented with 2.0 mg/l 6-BAP, 0.5 mg/l NAA and 1.0 mg/l GA for *H. macrophylla* and WPM media supplemented with 2.0 mg/l TDZ, 0.5 mg/l Kinetin, 1 mg/l GA for *C. japonica* .

Keywords: *Camelia japonica, Hydrangea macrophylla, in vitro, morphogenesis induction, micropropagation*

СОМАКЛОНАЛЬНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ БЕРЕЗЫ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

О.С. Машкина[1,2], Т.М. Табацкая[2]
[1]Воронежский государственный университет, г. Воронеж, Россия,
e-mail: *olga_mashkina@yahoo.com*
[2]Всероссийский НИИ лесной генетики, селекции и биотехнологии, г. Воронеж, Россия,
e-mail: *ilgis@lesgen.vrn.ru*

Как известно, сомаклональная изменчивость, возникающая в процессе культивирования *in vitro* растительной ткани (особенно каллусной), нежелательна при клональном микроразмножения ценных генотипов. С другой стороны, расширение генетического разнообразия культивируемого материала является основой для клеточной селекции и генетического улучшения растений. Кроме того, сомаклональные варианты – удобная модель для изучения генетики развития растений.

В процессе клонального микроразмножения карельской березы (*Betula pendula* Roth *var. carelica* Merkl.) с узорчатой древесиной и березы далекарлийской с рассеченными листьями (*B. pendula* Roth *var. dalecarlica* Schneid.) нами были отмечены случаи сомаклональной изменчивости, проявляющейся как на уровне отдельных пробирочных (*in vitro*), так и вегетирующих в питомнике (*in vivo*) растений. Так, при регенерации растений карельской березы через стеблевые каллусные культуры получен клон Л с комплексом измененных признаков, сохраняющихся на протяжении 18 лет культивирования *in vitro*. У регенерантов наблюдалось образование каллуса вместо корней, формирование кустообразного морфотипа за счет закладки 2-6 и более пазушных почек. Среди вегетирующих *in vivo* растений карельской березы каллусного происхождения отмечено появление карликов (с частотой 0,9-5,2%) и многостовольных рамет (до 66%). В ходе регенерации растений березы далекарлийской с рассеченным листом через пазушные меристемы получен клон-ревертант (из 8-ми изученных) с нормальными цельными листьями, фенотипические особенности которого сохранились и при высадке растений в почву. Отмечены существенные различия между клонами с аномальным и нормальным фенотипом на клеточном, субклеточном, биохимическом и молекулярно-генетическом уровнях. Так, у клона Л в клетках каллуса (формирующегося вместо корней) выявлена одна (из 28-ми) маркерная хромосома с сильно суженным районом плеча. Ее появление может быть вызвано структурными перестройками, что согласуется с данными молекулярно-генетического анализа с использованием SSR-маркеров, выявившего у данного клона феномен «потери гетерозиготности». Известно, что хромосомные перестройки вызывают существенные изменения экспрессии генов. Группа карликовых деревьев была неоднородна по изучаемым признакам и может иметь как генетическую (мутантную), так и эпигенетическую (связанную с изменением активности генов) природу. Получены данные о том, что реверсия к дикому типу (нормальному цельному листу) у клона березы далекарлийской в процессе культивирования *in vitro* могла быть вызвана изменением эндогенного баланса гормонов в соматической ткани и повышением степени компактизации хроматина. Это могло привести к подавлению экспрессии гомеобоксных генов KNOX (кодирующих транскрипционные факторы и влияющих на морфогенез листа). Сомаклональная изменчивость березы, наблюдаемая при культивировании *in vitro*, в значительной степени обусловлена генотипическими особенностями исходных деревьев. Она может иметь различную природу (генетическую или эпигенетическую) и разный по стабильности проявления измененного признака характер (необратимый или обратимый) при высадке регенерантов в питомник (*in vivo*) или при их повторном введении в культуру *in vitro*.

Ключевые слова: *береза, сомаклональная изменчивость, in vitro, in vivo*

SOMACLONAL VARIATION OF BIRCH DURING CULTIVATION *IN VITRO*

O.S Mashkina[1,2], T.M. Tabatskaya[2]
[1]Voronezh State University, Voronezh, Russia, e-mail: *olga_mashkina@yahoo.com*
[2]All-Russian Research Institute of Forest Genetics, Breeding and Biotechnology, Voronezh, Russia, e-mail: *ilgis@lesgen.vrn.ru*

It is known that somaclonal variability, which occurs during *in vitro* cultivation of plant tissue (especially callus), is undesirable in clonal micropropagation of valuable genotypes. On the other hand, the expansion of the genetic diversity of the cultivated material is the basis for cell selection and genetic improvement of plants. Moreover, somaclonal variants are a convenient model for studying plant genetics development.

Somaclonal variation was found during micropropagation of Karelian birch (*Betula pendula* Roth *var. carelica* Merkl.) with patterned wood and *B. pendula* Roth var. *dalecarlica* Schneid. with dissected leaves. It was observed on a level of microplants *in vitro* and vegetating plants in the nursery (*in vivo*). For example, clone L with modified complex traits remaining stable for 18 years of cultivation *in vitro*, was obtained during regeneration of plants through stem callus of the Karelian birch. The plants of this clone have formed a callus (instead of roots) and formed a bush shaped morphotype by formation of 2-6 or more axillary buds. Dwarfs (with a frequency of 0.9-5.2%) and multistemmed trees (up to 66%) have been identified among the vegetating plants (*in vivo*) of Karelian birch having callus origin. During the regeneration of dalecarlica birch plants with dissected leaf through meristem culture one revertant clone (of 8 studied) with normal leaves was obtained. Phenotypic features of this clone were survived after it planting in soil. There were significant differences between clones with abnormal and normal phenotype at the cell, subcell, biochemical and molecular genetic levels. For example, one marker chromosome (among 28 chromosomes) with a strongly tapered shoulder area was found in callus cells formed in place of the roots. Its appearance may be caused by structural rearrangements. This is consistent with the molecular genetic analysis using SSR-markers, which identified the phenomenon of "loss of heterozygosity" in this clone. It is known that chromosomal rearrangements cause significant changes in gene expression. We found that group of dwarf trees was heterogeneous and may have a genetic (mutant) and epigenetic (related to changes in the activity of genes) nature. There is evidence that reversion to the wild type (normal leaf) in dalecarlica birch clone during in vitro culture could be caused by a change in the balance of endogenous hormones in somatic tissue and increase in the degree of chromatin compaction. This may result in silencing of homeobox gene KNOX coding transcription factors and having influence on morphogenesis of the leaf. Somaclonal variation of birch, observed during in vitro cultivation, is determined largely by genotypic features of the original trees. It includes different nature (genetic or epigenetic) and different manifestations of the modified feature (reversible or irreversible) during planting the regenerants in the nursery (*in vivo*) or their *in vitro* re-cultivation.

Keywords: *birch, somaclonal variability, in vitro, in vivo*

ОСОБЕННОСТИ ПОЛУЧЕНИЯ АСЕПТИЧЕСКОЙ КУЛЬТУРЫ И ВЫРАЩИВАНИЯ *IN VITRO* НЕКОТОРЫХ ЛУКОВИЧНЫХ И КЛУБНЕЛУКОВИЧНЫХ ГЕОФИТОВ

Е.В. Мокшин, Е.В. Большакова, А.С. Лукаткин, О.А. Ведяшкина
ФГБОУВПО «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва»,
г. Саранск, Россия, e-mail: *evmokshin@yandex.ru*, *aslukatkin@yandex.ru*

В связи с возрастающим спросом в России на новые растения, интенсификацией озеленения строений, необходимостью сокращения импорта посадочного материала актуальна проблема массового размножения высокодекоративных луковичных и клубнелуковичных культур. Наличие инфекционного фона у посадочного материала сказывается на внешнем виде, качестве цветения, продолжительности жизни растений, а также на заражении среды опасными патогенами. Эта проблема успешно решается в кмплексе с исползованием методов клонального микроразмножения, позволяющих выявлять общие закономерности морфогенеза растений, особенности их проявления в условиях *in vitro* и в коммерческих целях.

Объектами исследования являлись луковичные растения – тюльпан (*Tulipa* L.) сорта Double Princess, нарцисс (*Narcissus* L.) сорта Replete, мускари (*Muscari botryoides* L.) сорта Album, и клубнелуковичное – крокус (*Crocus vernus* L.) сортов Vanguard и Dorothy. Эксплантами служили целые чешуи и сегменты 5×5 мм. В качестве стерилизующих агентов использовали 0,1% $KMnO_4$, 70% этанол, 50% Domestos, 6% хлорамин. Время экспозиции варьировали (1–25 минут). Культивирование эксплантов осуществляли при постоянном освещении и температуре 18–23°С на агаризованной (0,7%) среде Мурасиге и Скуга с добавлением сахарозы (40 г/л), витаминов B_1 и B_6 (по 1 мг/л), аскорбиновой кислоты (15 мг/л) и регуляторов роста: 6-бензиламинопурина (6-БАП; 0,1–4,0 мг/л), индолилуксусной кислоты (ИУК; 0,5 мг/л), Рибав-Экстра и Эпин-Экстра (оба 10^{-7}–10^{-2} %).

На этапе введения в культуру *in vitro* для всех объектов наиболее эффективной для подавления микрофлоры оказалась комбинация 0,1% $KMnO_4$ (25 мин) + 70% этанол (1 минута) + 50% Domestos (20–25 минут) или 6% хлорамин (20 мин). Выход стерильных эксплантов составил 70,5–90,2%.

На этапе микроразмножения максимальное количество луковичек *de novo* формировалось на среде, дополненной 3 мг/л БАП + 0,5 мг/л ИУК (2–8 шт./эксплант у тюльпана, нарцисса и крокуса, до 15 шт./эксплант у мускари). Интенсивное побегообразование выявлено на среде с 10^{-4}% Рибав-Экстра – от 2–3 шт./эксплант (тюльпан, нарцисс, крокус) до 5,5 шт./эксплант (мускари). Максимальной длины побеги достигали в варианте 2,0 мг/л 6-БАП + 0,5 мг/л ИУК (до 5 см). В ряде случаев на эксплантах нарцисса и мускари отмечался каллусогенез (10^{-2} % Эпин-Экстра). На этапе микроразмножения шел активный ризогенез; наилучшее развитие корневой системы наблюдали на среде, дополненной 10^{-4} % Рибав-Экстра. При переводе в условия *ex vitro* регенеранты лучше приживались после 30-минутной обработки 1,0 г/л ИУК.

Проведенные исследования показали высокую эффективность технологии микроразмножения данных луковичных и клубнелуковичных растений для получения посадочного материала.

Ключевые слова: *луковичные, клубнелуковичные, in vitro, стерилизация, микроразмножение, регуляторы роста, органогенез*

Результаты были получены в рамках выполнения государственного задания Минобрнауки России (проект № 6.783.2014К).

PREPARATION OF ASEPTIC CULTURE AND *IN VITRO* PROPAGATION OF SOME BULBOUS AND TUBER-BULBOUS ORNAMENTAL GEOPHYTES

E.V. Mokshin, E.V. Bolshakova, A.S. Lukatkin, O.A. Vedyashkina
NP Ogarev Mordovia State University, Saransk, Russia, e-mail: *evmokshin@yandex.ru*, *aslukatkin@yandex.ru*

Due to growing demand in Russia for new plants, intensified greening of buildings, the need to reduce the import of planting material, it is relevant the problem of mass reproduction of highly decorative bulbous and tuber-bulbous crops. The presence of infection in the planting material affect the habitus, flowering, plants life duration, as well as environment contamination by the dangerous pathogens. This problem is successfully solved by the method of clonal micropropagation, which is used both to analyzes the patterns of plant morphogenesis and their manifestation in *in vitro* conditions, as well as for commercial purposes.

The objects of study were bulbous plsnts – tulip (*Tulipa* L.) cv. Double Princess, narcissus (*Narcissus* L.) cv. Replete, muscari (*Muscari botryoides* L.) cv. Album, and tuber-bulbous plant – crocus (*Crocus vernus* L.) cv. Vanguard and Dorothy. Whole scales and segments 5×5 mm used as explants. As sterilizing agents were used 0.1% KMnO4, 70% ethanol, 50% Domestos, and 6% chloramine. The exposure time varied from 1 to 25 minutes. Explants were cultivated at constant light and temperature 18-23°C on agarized (0.7%), Murashige and Skoog medium supplemented with sucrose (40 g/l), vitamins B_1 and B_6 (both 1 mg/l), ascorbic acid (15 mg/l) and growth regulators 6-benzylaminopurine (6-BAP; 0,1-4,0 mg/l), indoleacetic acid (IAA; 0.5 mg/l), Ribav-Extra or Epin-Extra (both 10^{-7}-10^{-2}%).

In the first stage the most efficient sterilizing procedure was selected for *in vitro* conditions. We show that for all the objects the maximal microflora inhibition was at combination of 0,1% KMnO4 (25 minutes) + 70% ethanol (1 min) + 50% Domestos (20–25 minutes) or 6% chloramine (20 minutes). Procent of sterile explants was 70.5–90.2%.

At the stage of micropropagation, maximum number of microbulbs *de novo* formed on a medium supplemented with 3 mg/l 6-BAP + 0.5 mg/l IAA (2–8 bulb/explant in tulip, narcissus and crocus, 15 bulb/explant in muscari). Intensive shoot formation observed on the medium with 10^{-4}% Ribav-Extra – from 2–3 shoots/explant (tulip, narcissus, crocus) to 5.5 shoots/ explant (muscari). The maximum shoots length (5 cm) noted on media supplemented with 2.0 mg/l 6-BAP + 0.5 mg/l IAA. Some explants of narcissus and muscari shown callusogenesis (so, 10^{-2}% Epin-Extra). Active root formation observed at the micropropagation stage too; best root development was noted in the medium supplemented with 10^{-4}% Ribav-Extra.

Transfer of regenerated plants to *ex vitro* conditions showed better survival rate after 30 minute treatment by 1.0 g/l of IAA/

Studies have shown high efficiency of micropropagation technology of these bulbous and tuber-bulbous plants to produce improved planting material.

Keywords: *bulbous crops, tuber-bulbous crops, in vitro, sterility, micropropagation, growth regulators, organogenesis*

Aknowlegment
This work was financially supported by the Ministry of Education and Science of Russia (project number 6.783.2014K).

ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ПРИ КЛОНАЛЬНОМ МИКРОРАЗМНОЖЕНИИ НЕТРАДИЦИОННЫХ ЯГОДНЫХ КУЛЬТУР

С.А. Муратова, Н.С. Субботина, Р.В. Папихин
ФГБОУ ВО Мичуринский государственный аграрный университет,
г. Мичуринск, Россия, e-mail: *smuratova@yandex.ru*

Интродукция и селекционная работа с новыми видами нетрадиционных растений имеет важное хозяйственное и экономическое значение. Поэтому развитие исследований в области биотехнологии нетрадиционных ягодных культур представляет особый интерес.

Рассмотрены вопросы клонального микроразмножения в культуре *in vitro* нетрадиционных ягодных культур: ежевики, ежевично-малиновых гибридов, актинидии, жимолости, ремонтантных форм малины, барбариса, лимонника китайского. Изучено влияние на индукцию морфогенетического потенциала нетрадиционных ягодных культур химических факторов (регуляторов роста растений, элементов углеводного и минерального питания, антиоксидантов, элиситоров, биологически активных веществ негормональной природы).

В работе применялись различные модификации питательных сред MS (Murashige, Skoog, 1962), QL (Quorin, Lepoivre, 1977), Андерсона (Anderson, 1984), DKW (Driver, Kuniyuki, 1984), WPM (Lloyd, McCown, 1980). Изучено влияние на эффективность микроразмножения и ризогенез микрочеренков различных регуляторов роста (6-БАП, зеатина, 2-иП, тидиазурона, ИМК, ИУК, НУК).

В результате проведенных исследований установлены оптимальные концентрации и сочетания регуляторов роста, элементов минерального питания, обеспечивающие интенсивную пролиферацию микропобегов и ризогенез. При культивировании ряда форм положительный эффект получен при изменении источника углеводного питания и его концентрации. Изучено влияние фруктозы, сахарозы, глюкозы, мальтозы на размножение, прирост побегов и ризогенез микрочеренков. Определено оптимальное содержание углевода в составе питательной среды для разных видов и сортов ягодных растений. Установлена зависимость эффективности размножения и числа хлоропластов в листьях опытных растений от типа и концентрации углевода и концентрации хелата железа в питательной среде.

Изучен морфогенетический потенциал, включенных в исследования форм. Дана оценка видовых и сортовых особенностей растений, коэффициента размножения, силы роста, эффективности ризогенеза на питательных средах разного состава. Коэффициент микроразмножения разных видов на средах с цитокининами и ауксинами составил от 3 до 12 новых побегов на эксплант. Эффективность укоренения микрочеренков и адаптации микрорастений к условиям *in vivo* в зависимости от вида и сорта растения составила 75-100%.

В результате проведенных исследований модифицированы методики клонального микроразмножения включенных в исследования культур с учётом биологических особенностей конкретного вида или сорта растения, а так же привлечения различных стимулирующих факторов. Предложены составы сред, обеспечивающие оптимальное развитие изучаемых культур на каждом этапе культивирования. В результате проведенных исследований нами оптимизированы протоколы клонального микроразмножения для широкого набора нетрадиционных ягодных культур.

Ключевые слова: *клональное микроразмножение, нетрадиционные ягодные растения, состав питательной среды*

OPTIMIZATION OF THE MEDIA COMPOSITION UNDER CLONAL MICROPROPAGATION OF NON-TRADITION BERRY PLANTS

S.A. Muratova, N.S. Subbotina, R.V. Papikhin
Michurinsk State Agrarian University, Michurinsk, Russia, e-mail: *smuratova@yandex.ru*

Introduction and the breeding of new types of non-traditional plants have important economic value. Therefore, the developments of research in biotechnology of non-traditional berry plants are of particular interest.

The question of clonal micropropagation in the *in vitro* culture of non-traditional berry plants, such as blackberry and its hybrids, actinidia, honeysuckle, barberry, of primocane raspberry, *Schizandra chinensis* was examined. The chemical factors (plant growth regulators, the elements of carbohydrate and mineral nutrition, antioxidants, elicitors, biologically active substances non-hormonal nature) were used to induce morphogenetic potential of non-traditional berry crops.

In the work were used different modifications composition of the nutrient media MS (Murashige, Skoog, 1962), QL (Quorin, Lepoivre, 1977), A (Anderson, 1984), DKW (Driver, Kuniyuki, 1984), WPM (Lloyd, McCown, 1980). The influence of different plant growth regulators (6-BAP, zeatin, 2-iP, thidiazuron, IAA, IBA, NAA) on the effectiveness of proliferation of microshoots and rizogenesis was stated.

As a result more efficient concentrations and combination of hormones and mineral salts, which provide high intensive proliferation of microshoots and rizogenesis was stated. In several forms positive effect was obtained due to the change in source of carbohydrate nutrition and its concentration. Influence of fructose, sucrose, glucose, and maltose on proliferation, growth shoots and effectiveness of rooting of microcutting was investigated. Optimum contents of the carbohydrate in composition of medium for different species and varieties berry plants are determined. Influence type and concentrations of carbohydrate and concentrations of iron chelate on efficiency micropropagation and number of chloroplasts of experimental plant leaves was investigated.

Studied morphogenetic potential included in the study forms. The estimation of species and varietal characteristics of plants, the multiplication factor, the strength of growth, efficiency rhizogenesis on different composition of media is presented. Efficiency micropropagation of different species on medium with citokinins and auxines from 3 before 12 new shoots on explant. The effectiveness of rooting of microcutting and adaptation to *in vivo* conditions was 75-100% and mostly depending on plant species and cultivar.

Modified technique micropropagation cultures included in the study, taking into account the biological characteristics of a particular species or varieties of plants, as well as the involvement of different motivating factors. The compositions of media ensuring an optimal development of the studied crops at each stage of cultivation have been offered. In the course of our research we have optimized the protocols of micropropagation of a wide range of non-traditional berry plants.

Keywords: *clonal micropropagation, non-traditional berry plants, medium composition*

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ ДЛЯ СОЗДАНИЯ СПОСОБОВ РАЗМНОЖЕНИЯ ДВУХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *BEGONIA* L.

А.Ю. Набиева[1], Т.Д. Фершалова[1], Т.В. Полубоярова[1]
[1]Центральный сибирский ботанический сад, г. Новосибирск, Россия,
e-mail: *sibflower05@gmail.com*

Представители семейства *Begoniaceae* успешно интродуцированы в оранжереях ЦСБС в качестве компонента многоярусного тропического леса и используются в качестве модельных образцов. Коллекция бегоний ЦСБС насчитывает 250 таксонов, принадлежащих к 27 секциям из 63 по классификации Doorenbos. Одним из условий стабильного поддержания столь обширной коллекции является размножение и сохранение бегоний с помощью методов культуры ткани.

Цель работы – разработать методику клонального размножения 2 видов бегоний из флоральных эксплантов и определить факторы, влияющие на выход выводковых почек *B. sutherlandii* из периода покоя в культуре *in vitro*.

B. sutherlandii Hook. f. - травянистый клубневый многолетник сезонного климата из Южной Африки, относящийся к секции *Augustia*. Выводковые почки, образующиеся на стеблях после цветения, могут быть использованы для размножения данного вида.

B. hybrida ‘Gloire de Lorraine’ получена В. Лемуаном как результат скрещивания *B. socotrana* J.D. Hooker с *B. dregei* Otto & A. Dietrich.

Типы морфогенетических ответов тканей эксплантов из соцветий 2 видов бегоний были различны и являлись реакцией генотипа на компоненты питательных сред и регуляторы роста (РР). Для выявления воздействия экзогенных РР на морфогенез *in vitro* в состав модифицированных сред MS и N6, содержащих аденин-сульфат в количестве 50 мг/л, были введены ТДЗ, БАП, 2,4-Д и ИМК. Во всех изученных вариантах сред образование каллуса происходило под действием ауксина 2,4-Д взятого по отдельности, либо в сочетании с БАП. В редких случаях, при культивировании частей соцветий *B. sutherlandii* на среде MS, содержащей аденин сульфат, у части адвентивных почек происходил генеративный морфогенез и индукция цветения под воздействием 1,5 мг/л БАП. Цветки относились к мужскому типу. Число адвентивных побегов, образующихся на эксплантах соцветий бегоний, было выше в вариантах среды N6, по сравнению с вариантами среды MS, при условии, что концентрации РР в них были одинаковы.

Таким образом, разработана эффективная система регенерации растений из флоральных эксплантов 2 представителей рода *Begonia*: *B. sutherlandii* и *B. hybrida* ‘Gloire de Lorraine’. Индукция адвентивного побегообразования происходила прямым и непрямым путем на модифицированной среде N6 с добавлением ТДЗ, тогда как триггером детерминации адвентивных почек *B. sutherlandii* к цветению на среде MS являлся БАП.

Гистологический анализ позволил выявить ранние стадии морфогенеза побегов в ультраструктуре выводковых почек *B. sutherlandii*, индуцированных *in vitro* к выходу из покоя под действием различных факторов. Стратификация при температуре 2-4ºС при последующем воздействии низкими концентрациями БАП – являлась наиболее эффективным условием прорастания выводковых почек в культуре *in vitro.*

Ключевые слова: *бегонии, флоральные экспланты, морфогенез in vitro, гистологический анализ*

BIOTECHNOLOGICAL APPROACHES FOR DEVELOPMENT OF PROPAGATION TECHNIQUES FOR TWO *BEGONIA* L. SPECIES

A.Yu. Nabieva[1], T.D. Fershalova[1], T.V. Poluboyarova[1]
[1]Central Siberian Botanical Garden, Novosibirsk, Russia, e-mail: *sibflower05@gmail.com*

Representatives of the family *Begoniaceae* are successfully introduced in CSBG green houses as a component of the pluristratal tropical forest and used as the model samples. *Begoniaceae* collection in CSBG contains 250 taxa, belonging to 27 sections from 63, by Doorenbos classification. Sustainable maintenance of the vast *Begonia* collection is effected applying tissue culture methods.

The aim of this work was to develop the techniques of two *Begonia* species micropropagation from floral explants and to determine factors for *B. sutherlandii* bulbils dormancy breaking in tissue culture.

B. sutherlandii Hook. f. is deciduous tuberous plant of a season climate from the South Africa, included in the section *Augustia*. Bulbils formed on the stems at the end of flowering could provide the species propagation.

B. hybrida 'Gloire de Lorraine' was produced by V. Lemoine as the result of crossing *B. socotrana* J.D. Hooker with *B. dregei* Otto & A. Dietrich.

Different morphogenic responses of inflorescences explants of two *Begonia* species were observed depending on genotype, nutritious medium and plant growth regulators (PGR). To reveal the influence of exogenous PGR on morphogenesis *in vitro*, TDZ, BAP, 2, 4-D and IBA were added to the composition of modified MS and N6 media, supplemented with 50 mg/l sulfate adenine. In all variants studied, callusogenesis occurred due to auxin 2, 4-D, applied alone or in combination with BAP. *B. sutherlandii* adventitious buds when cultured on the medium MS with sulfate adenine and 1, 5 mg/l BAP rarely exhibited generative morphogenesis and anthesis *in vitro*. Flowers were of the male type. Number of adventitious shoots formed from *Begonias* inflorescences explants was higher in N6 medium variants, as compared to the MS medium ones with equal concentration of PGR.

Thus, an efficient micropropagation system for obtaining regenerants from the floral explants of 2 *Begonia* representatives - *B. sutherlandii* и *B. hybrida* 'Gloire de Lorraine'- was developed. The induction of direct and indirect adventitious shoots organogenesis occurred on modified N6 medium, supplemented with TDZ, while BAP was determined as the trigger of *B. sutherlandii* adventitious buds determination of flowering on MS medium.

Histological examination allowed revealing the early stages of shoot morphogenesis *in vitro* in sprouting bulbils under the different factors of dormancy breaking. Among them, bulbils cool treatment at 2-4ºC, followed by application of BAP in low concentrations was considered to have notable effect on their germination *in vitro*.

Keywords: *Begonias, floral explants, morphogenesis in vitro, histological analysis*

ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬУРУ ВИДОВ *JUNO* TRATT.

Е.В. Никитина, М. Тургунов
Институт Генофонда растительного и животного мира АНРУз
г. Ташкент, Узбекистан, e-mail: *elenanikita2013@rambler.ru*

Исследования по выявлению особенностей размножения и развития растений в условиях открытого грунта на территории Ботанического сада г. Ташкента, показали, что при семенном размножении видов рода *Juno* Tratt. (сем. *Iridaceae*) возникает такая проблема, как физиологический покой семян и необходимость его преодоления.

Объектами исследования являлись виды рода *Juno* Tratt.: *Juno warleyensis* (Foster) Vved., *Juno vicaria* Vved. - ранневесенние эфемероиды, собранные в районе Байсун, Сурхандарьинской области, Узбекистан. К настоящему времени род насчитывает 57 видов. В Средней Азии насчитывается не менее 31 вида, являясь центром многообразия представителей юнон. Более 20 видов произрастает на территории Узбекистана (Хасанов Ф.У.).

Наша задача состояла в преодолении покоя зрелых семян методом эмбриокультуры и получение стерильной культуры. Для успешной регенерации важным моментом является состояние семян, поэтому в этом эксперименте в качестве эксплантов использованы цельные полностью созревшие семена в качестве контроля и надрезанные семена. Так же проведена предварительная 30-суточная стратификация (при +4°C) для выявления необходимости температурного воздействия в преодолении покоя. Материал стерилизовали в условиях ламинар бокса по схеме: 1) обработка 70% этиловым спиртом – 1 мин; 2) промывание в стерильной дистиллированной воде – 10 мин; 3) обработка 0,1% раствором $AgNO_3$ – 10 мин; 4) промывание семян в стерильной дистиллированной воде три раза. На этапах посева первичных эксплантов и культивирования регенерантов использовали минеральную основу питательной среды MS (Himedia) с 0.5% агара и добавлением 0,5 г/л казеина, 0,5 г/л глутамина, 40 г/л сахарозы и регуляторов роста.

Применяли различное сочетание БАП (0.1 - 1.0 мг/л), кинетина и комбинации этих препаратов с 3-индолилуксусной кислотой (ИУК). Необходимо отметить, что культура юнон оказалась отзывчива на применение регуляторов роста. Появление первых проростков отмечали через 2-3 недели после посева. В варианте с соотношением цитокинин/ауксин - 5:1 (0.5мг/л БАП/0.1мг/л ИУК) из одного зародыша *J. vicaria, J. warleyensis* минуя стадию каллусообразования образовывались регенеранты с наилучшими показателями. Укоренение первичных эксплантов наблюдали через 2 недели спустя поддержания стерильной культуры обоих видов на среде ½ МС с 0.5 мг/л ИУК.

Ключевые слова: *введение в культуру, Juno vicaria, Juno warleyensis, цитокинины, ауксины*

INITIATION OF *JUNO* TRATT. SPECIES *IN VITRO* CULTURE

E.V. Nikitina, M. Turgunov
Institute of the Gene Pool of Plants and Animals, Uzbek Academy of Sciences
100053, Uzbekistan, Tashkent, Bogishamol str., 232, e-mail: *elenanikita2013@rambler.ru*

The investigation on the identification of plant propagation and development features under Tashkent Botanical Garden open ground conditions, showed that the seed breeding of *Juno* Tratt. species *(Iridaceae)* has a problem of seed dormancy and there is necessity of its overcoming.

The objects of study were *Juno warleyensis* (Foster) Vved., *Juno vicaria* Vved. species of *Juno* Tratt. genus - early spring ephemeroids, collected in Boysun district, Surkhandarya region, Uzbekistan. The genus includes 57 species. At least 31 species are native to Central Asia, being the center of *Juno* diversity. More than 20 species grow in Uzbekistan territory.

The aim of our work was to break of mature seeds dormancy by embryo culture method and to obtain sterile plant material. An important aspect for successful regeneration is seed state, so in this experiment as the primary explants used mature seeds (control) and incised seeds. Also, to identify the temperature effects on overcoming seeds dormancy a preliminary 30-day stratification (+ 4°C) has been conducted. The material was sterilized under laminar box condition according to the scheme: one minute treatment with 70% ethanol; ten minutes washing in sterile distilled water; ten minutes treatment in 0.1% $AgNO_3$; rinsing seeds in sterile distilled water three times. The nutrient basal medium MS (Himedia), 0.5% agar, 0.5 g/l casein, 0.5 g/l glutamine, 40g/l sucrose and plant growth regulators were used for explants seeding and regenerates cultivation.

The effect of different combinations of 6-benzylaminopurine - BAP (0.1 - 1.0 mg/l) with kinetin, 3-indole acetic acid (IAA) has been investigated. It should be noted that *Juno* is responsive to the applying of growth regulators. The first seedlings were observed in 2-3 weeks after sowing. The variation of cytokinin/auxin in 5: 1 ratio (0.5mg/l BAP/0.1mg/l IAA) was optimal for perfect regenerates. One embryo of *J. vicaria, J. warleyensis* inoculated explants formed regenerates missing callus stage. The direct rhizogenesis process was observed in 2 weeks from sterilized culture in ½ MS medium with 0.5 mg/l IAA.

Keywords: *introduction in vitro, Juno vicaria, Juno warleyensis, cytokinin, auxin*

ВЛИЯНИЕ СПЕКТРАЛЬНОГО СОСТАВА СВЕТА НА МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ЗВЕРОБОЯ ПРОДЫРЯВЛЕННОГО (*HYPERICUM PERFORATUM L.*)

Н.В. Никифорова[1], В.Н. Овчинникова[2], Н.П. Карсункина[1]
[1]Российский государственный аграрный университет – РГАУ-МСХА имени К.А.Тимирязева, г. Москва, Россия, e-mail: *nikif_natali@mail.ru*
[2]ФГБНУ «ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии» ФБГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии (ФБГНУ ВНИИСБ), г. Москва, Россия, e-mail: *vera.ovchinnikova.1957@mail.ru*

Зверобой продырявленный (*Hypericum perforatum L.*) является важным лекарственным растением. В качестве лечебного средства это растение применяется очень давно, т. к. спектр применения его чрезвычайно широк. Это приводит к истощению его запасов в природе, поэтому эта культура представляет большой интерес для биотехнологов.

Искусственный свет является основным и необходимым требованием для коррекции роста и развития растений в условиях *in vitro*. При этом большое значение играет сочетание спектрального состава света и гормональных факторов среды. Поэтому целью исследования и было изучение совместного влияния спектрального состава света и гормонального состава питательной среды на рост и развитие растений зверобоя в условиях *in vitro*.

Проводили визуальную оценку состояния растений, измерение ширины листовой пластины, длины побегов и их количества.

Микропобеги дикорастущего и культурного (сорт Золотодолинский) зверобоя выращивались на питательных средах различного гормонального состава под светодиодными излучателями с красным, белым и красно-синим спектром в течение месяца на трёх вариантах сред МС: 1) 0,2 мг/л ИМК (контроль); 2) 0,2 мг/л ИМК + 3 мг/л 6-БАП; 3) 0,2 мг/л ИМК + 0,2 мг/л 6-БАП при фотопериоде 16 часов.

У растений сорта Золотодолинский при всех вариантах освещения отмечены значительное увеличение длины побегов и редукция листовых пластин на средах с цитокинином. Однако следует отметить существенное уменьшение числа побегов при красном световом спектре на всех вариантах питательных сред.

А на дикорастущем генотипе при красном и белом источниках освещения 6-БАП стимулировал активное побегообразование, увеличивая при этом и размер листовых пластин.

Таким образом, реакция генотипов на освещение разными спектрами была различной.

Ключевые слова: *зверобой продырявленный, питательные среды цитокинины, спектральный состав света*

EFFECT OF LIGHT SPECTRAL COMPOSITION ON MORPHOLOGICAL AND PHYSIOLOGICAL ACTIVITY OF ST. JOHN'S WORT (*HYPERICUM PERFORATUM* L.)

N.V. Nikiforova[1], V.N. Ovchinnikova[2], N.P. Karsunkina[1]
[1]Russian State Agrarian University - RSAU-MTAA named after K.A. Timiryazev, Moscow,Russia, e-mail: *nikif_natali@mail.ru*
[2]Federal Budget State Scientific Institution "Russian Federal Research Institute of Agricultural Biotechnology", Moscow, Russia, e-mail: *vera.ovchinnikova.1957@mail.ru*

St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) is an important medicinal herb. As a medicament this plant is used for a long time since the range of its application is extremely wide. This leads to the depletion of its reserves in nature, that's why the culture is of great interest for biotechnologists.

Artificial light is a basic and a necessary requirement for correction of plant's growth and development in an *in vitro*. At that a combination of the spectral composition of light and hormonal factors of the environment plays a great significance. That's why the aim of the research was to study the joint influence of the spectral composition of light and hormonal composition of the culture medium on the growth and development of St. John's wort plants in an *in vitro*.

An assessment of status plant, the measurement of the width of lamina, the length and number of shoots were visually performed.

Microshoots of wild and cultivated (Zolotodolinsky cultivar) Hypericum were grown on nutrient media of different hormonal composition under LED emitters with red, white, and red and blue range for a month in three versions of MS media: 1) 0.2 mg/l IBA (control); 2) 0.2 mg/l IBA + 3 mg/l 6-BAP; 3) 0.2 mg/l IMK + 0.2 mg/l 6-BAP with a photoperiod of 16 hours.

In plants of Zolotodolinsky cultivar under all lighting versions a significant increase the length of shoots and the reduction of leaf plates on a cytokinin media are noted. However, it should be noted a significant decrease in the number of shoots at a red light spectrum in all versions of nutrient media.

But for wild-growing genotype at the red and white light source 6-BAP stimulated active shoot formation, increasing the size of leaf blades.

Thus, the reaction of genotypes for different illumination spectrums was various.

Keywords: *St. John's wort, cytokinins nutrient media, spectral composition of light*

СОМАКЛОНАЛЬНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ЭМБРИОГЕННЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ *LARIX SIBIRICA,* ПОЛУЧЕННЫХ ПУТЕМ СОМАТИЧЕСКОГО ЭМБРИОГЕНЕЗА *IN VITRO*

М.Э. Пак, А.С. Иваницкая, И.Н. Третьякова, А.С. Саймова
ФГБУН Институт леса им. В. Н. Сукачева СО РАН, Академгородок, г. Красноярск, Россия, e-mail: *culture@ksc.krasn.ru*

С целью индукции соматического эмбриогенеза у *Larix sibirica* изолированные незрелые зародыши деревьев, устойчивых к лиственничной почковой галлице, культивировали на среде АИ по методике, разработанной И.Н. Третьяковой с соавторами (2012). В результате экспериментов за последние 5 лет было получено 15 пролиферирующих эмбриогенных клеточных линий (Кл) *Larix sibirica* различного возраста. Было отмечено, что Кл лиственницы отличались разной эмбриогенной продуктивностью, содержанием и размером соматических зародышей, их способностью созревать и прорастать, а также образовывать жизнеспособные регенеранты. Число глобулярных соматических зародышей в молодых Кл (до одного года) в 1 г сырой эмбрионально-суспензорной массы (ЭСМ) в среднем колебалось от 2040 до 11103 шт. Пролиферативная активность Кл сохранялась в течение 2–7 лет. При добавлении в питательную среду АИ абсцизовой кислоты (АБК) происходили морфогенез и созревание соматических зародышей в течение 45 сут. Число созревших соматических зародышей у разных Кл колебалось от 12 до 1221 шт. на 1 г сырой ЭСМ. Мелкие соматические зародыши гибридной Кл5 (*L. sibirica* x *L. sukaczewii*) не созревали на среде с АБК. Наблюдались разные аномалии в морфогенезе соматических зародышей в процессе созревания: отклонения в развитии доменов зародыша и цитокинезе. Наименьшее число аномальных зародышей отмечено у Кл4. У данной линии жизнеспособные зародыши составили 83.31±3.00%. Прорастание соматических зародышей происходило на безгормональной среде АИ и начиналось с растяжения гипокотиля и удлинения корешка. Соматические сеянцы переносили в почвенный субстрат в условия ростовой камеры, а затем высаживали в теплицу Института леса СО РАН. Коллекция эмбриогенных клеточных линий *L. sibirica* будет использоваться для плантационного лесовыращивания лиственницы в Сибири.

Ключевые слова: *Larix sibirica, соматический эмбриогенез, эмбриогенные клеточные линии, продуктивность, длительная пролиферация*

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 15-04-01427.

SOMACLONAL VARIABILITY OF *LARIX SIBIRICA* EMBRYOGENIC LINES OBTAINED THROUGH SOMATIC EMBRYOGENESIS *IN VITRO*

M.E. Park, A.S. Ivanitskaya, I.N. Tretyakova, A.S. Saymova
V.N. Sukachev Institute of Forest, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Akademgorodok, Krasnoyarsk, Russia, e-mail: *culture@ksc.krasn.ru*

With the aim of *Larix sibirica* somatic embryogenesis induction, the isolated embryos of trees resistant to gall-bud midge were cultured on AI medium agreed with the methods developed by I.N. Tretyakova with coauthors (2012). As a result of experiments of five latest years 15 proliferated embryogenic cell lines (Cls) of *Larix sibirica* of different ages were obtained. It was noted that Siberian Larch Cls were differed by embryogenic productivity, somatic embryos content and their sizes, capability to maturate and to germinate, and to form viable plantlets. While for young (1-year-old) CLs embryo numbers ranged from 2040 to 11103 embryos per 1 gram of fresh weight of embryonal suspensor mass (ESM) on the average. Proliferated activity of Cls remained during 2-7 years. Morphogenesis and maturation of somatic embryos occurred at the adding of ABA to the medium within 45 days. The number of mature somatic embryos ranged from 12 to 1221 embryos per 1 gram of fresh weight of ESM in different CLs. Small somatic embryos of Cl 5 (*L. sibirica* x *L. sukaczewii*) did not maturate on the medium supplemented with ABA. The range of developmental anomalies were observed during somatic embryos embryogenesis: abnormalities in embryo domain development and cytokinesis. The least number of abnormalities were found in Cl 4. In that Cl the number of viable somatic embryos was 83.31±3.00%. Somatic embryos germination occurred on hormone-free AI medium and began from elongation of hypocotyl and embryo root. After acclimatization in sterile soil at the growth-chamber, emblings were planted in a greenhouse of Institute of Forest SB RAS. The collection of Cls of *L. sibirica* will be used for establishing coniferous forest plantations in Siberia.

Keywords: *Larix sibirica, somatic embryogenesis, embryogenic cell lines, productivity, long proliferation*

Aknowlegment
This work was supported by Russian Foundation for Basic Research (grant № 15-04-01427).

ПРИМЕНЕНИЕ УЛЬТРАЗВУКА В КУЛЬТУРЕ ТКАНЕЙ РАСТЕНИЙ

Р.В. Папихин, С.А. Муратова, В.А. Солопов
ФГБОУ ВО Мичуринский государственный аграрный университет,
г. Мичуринск, Россия, e-mail: *parom10@mail.ru*

За сравнительно короткий период времени формирования биотехнологии растений как самостоятельного направления науки достигнуты результаты, имеющие большое фундаментальное и прикладное значение. Наибольшее развитие получили технологии клонального микроразмножения и оздоровления растений. Одновременно с этим развивались и методы, позволяющие интенсифицировать пролиферацию и другие морфогенетические процессы.

Ультразвуковое излучение (УЗ) является одним из наиболее эффективных способов стимуляции морфогенеза в культуре растительных тканей. Под действием УЗ проницаемость клеток увеличивается за счет изменения размера и формы устьичных щелей, пор, канальцев, ослабления связи в межклеточных соединительных тканях, частичного разрыва клеток во время кавитации. При воздействии УЗ низкой мощности усиливается ферментативная активность ряда энзимов, локализованных в поверхностных слоях клеточных оболочек, и повышается чувствительность обработанных УЗ клеток к действию ряда биологически активных веществ.

Обработка микрочеренков УЗ нужной интенсивности и определенным способом повышает эффективность стандартных методик, основанных на индукции ризогенеза препаратами ауксиновой природы. Подбор оптимальных режимов и способов ультразвукого облучения позволил в 1,5-2 раза повысить эффективность укоренения микрочеренков культур, обладающих пониженной способностью к образованию корней в условиях *in vitro* и ускорить процесс ризогенеза у всех изучаемых форм.

Изучали влияние УЗ облучения на индукцию каллусообразования и морфогенез в культуре тканей растений. Подбор оптимальных параметров и способов УЗ воздействия позволил в 2-2,5 раз повысить интенсивность каллусообразования и эффективность морфогенеза из изолированных листовых дисков.

Факторы, определяющие морфогенетические процессы *in vitro* связаны с таксономической принадлежностью и генетически характерными признаками исходного растения. Эффект УЗ обработки зависит от типа, размера, возраста и физиологического состояния растительных эксплантов. При использовании очень молодых, нежных листьев необходимо более щадящее воздействие, поскольку чрезмерное повреждение изолированных тканей растений приводит к некрозу и угнетает ростовые и регенерационные процессы.

Ключевые слова: *ультразвук, культура ткани, ризогенез, каллус, морфогенез*

Работа выполнена при поддержке Министерства сельского хозяйства РФ.

APPLICATION OF ULTRASOUND IN PLANT TISSUE CULTURE

R.V. Papihin, S.A. Muratova, V.A. Solopov
Michurinsk State Agrarian University Michurinsk, Russia, e-mail: *parom10@mail.ru*

In a relatively short period of time the development of plant biotechnology as an independent branch of science has achieved results that have great fundamental and practical importance. The greatest progress has been made in the technology of clonal micropropagation and recovery of plants. At the same time the development of methods to improve proliferation and other morphogenetic processes. Ultrasound irradiation is one of the most effective ways to stimulate morphogenesis in plant tissue culture. The cell permeability has increased by changing the size and shape of stomatal slits, pores, tubules, by reducing of intercellular communication in connective tissues and also by partial rupturing of cells during cavitation under the action of ultrasound. The activity of enzymes localized in the surface layers of cell walls and the cells' sensitivity to biologically active substances has increased under the low power ultrasound exposition.

Required intensity of ultrasound in the microcuttings treatment has improved the efficiency of standard methods based on the induction of root formation using auxin preparations. The choice of optimum regimes and ways of ultrasound irradiation enabled to increase by 1,5 – 2 times the microcuttings' rooting of plants with the lower ability of the root formation *in vitro* and to accelerate the rhisogenesis process of all studied forms.

The effect of ultrasound irradiation on callus induction and morphogenesis in plant tissue culture *in vitro* has been tested. The callus formation intensity and morphogenesis efficiency of isolated leaf disks has increased 2- 2, 5 times by choice of optimum parameters and ways of ultrasound irradiation.

Factors determining morphogenetic processes *in vitro* are related to taxonomic affiliation and genetic characteristic features of the parent plant. The effect of ultrasound treatment was depended on type, size, age and physiological condition of the explants. Using the very young, tender leaves must be applied more sparing ultrasound effect, because the excessive damage of isolated plant tissues leads to necrosis and inhibits the growth and regeneration processes.

Keywords: *ultrasound, tissue culture, root formation, callus, morphogenesis*

Aknowlegment
This work was supported by the Ministry of Agriculture of the Russian Federation.

СОЗДАНИЕ КОЛЛЕКЦИИ ХРИЗАНТЕМЫ САДОВОЙ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Г.Н. Пищева
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт садоводства Сибири им.М.А. Лисавенко», г. Барнаул, Россия, e-mail: *pisheva_galina@mail.ru*

Хризантема относится к ведущим и популярным цветочным культурам. Однако, в условиях Сибири многие сорта, особенно крупноцветковые, проявляют низкую зимостойкость. Создание и сохранение коллекции требует отбора наиболее устойчивых сортов, выполнение определенных агротехнических мероприятий, в частности в зимний период укрытие растений, хранение маточника в теплице или выращивание *in vitro*.

Технология клонального микроразмножения представляет исключительную ценность для поддержания и сохранения коллекций ботанических садов, и особенно в тех случаях, когда вид или сорт представлен ограниченным количеством экземпляров.

Цель данной работы - создание коллекции *in vitro* хризантемы (*Chrysanthemum* L.).

Для достижения поставленной цели были определенны следующие задачи:

разработка методики введения в культуру *in vitro* флоральных типов эксплантов;

повышение эффективности регенерации растений в культуре *in vitro*;

усовершенствование существующих способов адаптации пробирочных растений к условиям *ex vitro*.

Объектом исследований является коллекция хризантемы Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт садоводства Сибири имени М.А. Лисавенко» (ФГБНУ «НИИСС»), которая включает 25 сортов из группы мелкоцветковые.

В работе использованы общепринятые методики. В качестве эксплантов при микроразмножении брали фрагменты соцветия в фазе бутонизации. Питательные среды готовили по прописи Мурасиге и Скуга (MS) с добавлением 30 г/л сахарозы. Из регуляторов роста использовали α–нафтилуксусную кислоту (НУК), индолил-3-масляную кислоту (ИМК), 6-бензиламинопурин (БАП), тидиазурон (TDZ), кинетин (Кн). Одноступенчатая стерилизация (0,1% раствор сулемы 10 мин) позволяла получить 14,3-90,0% стерильных эксплантов. При двухступенчатой обработке (0,1% растворе сулемы 3 мин + сульфохлоронтин 10 мин) получали до 90% стерильных и 96,7-100% жизнеспособных эксплантов.

Адаптировали растения к условиям *ex vitro* в лаборатории при освещенности 3 кЛк и фотопериоде 16 часов.

Прямую регенерацию у хризантемы наблюдали на эксплантах цветков с частью цветоложа. На других фрагментах соцветия морфогенез не проявлялся. Регенеранты лучше развивались на питательной среде, содержащей 10 и 20 мкМ БАП, 1,0 мкМ НУК и 0,1 мкМ ИМК. Максимальное количество морфологически правильно сформированных побегов, из одного соцветия составило 15 шт.

Оптимальной питательной средой по гормональному составу на этапе собственномикроразмножения явилось сочетание 0,5 мкМ Кн с 0,25 мкМ ИМК, при этом побеги хризантемы активно формируют корневую систему. Это позволяет исключить этап укоренения.

Для адаптации к нестерильным условиям растения высаживали в стерильный субстрат и в течение 7 дней накрывали сверху стаканчиками. Число адаптированных растений составило 100%.

Сортоспецифичность при микроразмножении хризантемы не выявлена.

Усовершенствована технология клонального микроразмножения на основе регенерации растений из фрагментов соцветия и создана коллекция хризантемы *in vitro*, содержащая 30 сортов.

Ключевые слова: *хризантема, коллекция in vitro, клональное микроразмножение*

CREATION OF *CHRYSANTHEMUM HORTORUM* COLLECTION *IN VITRO*

G.N. Pishcheva
The Research Institute of Siberian horticulture named after M.A Lisavenko, Barnaul, Russia,
e-mail: *pisheva_galina@mail.ru*

Chrysanthemum belongs to the leading and popular flower cultures. However, under Siberian environmental conditions many varieties, especially large-flowered, show low winter hardiness. Creation and keeping of a collection demands selection of the most resistant varieties, performance of certain agronomic actions, in particular, shelter of plants during the winter period, storage of a mother material nursery in a greenhouse or cultivation *in vitro*.

The technology of clonal micropropogation is of exclusive value for maintenance and preservation of collections of botanical gardens, and, especially, when there is a limited quantity of genotype clones.

Purpose of the work is a creation of chrysanthemum (*Chrysanthemum L.*) collection *in vitro*. For achievement of the goal the following tasks were defined:

1. The development of application of floral elements *in vitro* as kind of explants;
2. Increasing of plant regeneration efficiency *in vitro*;
3. Improvement of the existing ways of sterile plantlets adaptation to *ex vitro* conditions.

The object of researches is the chrysanthemum collection of "The M. A. Lisavenko Research Institute of Horticulture for Siberia", which includes 25 varieties from group of the small-flowered.

The standard techniques were used in the work. The inflorescence fragments on budding phase were chosen as explants for micropropogation. Nutrient compositions were prepared on the base of Murashige and Skoog (MS) medium with addition of sucrose 30 g/l. Growth regulators, such as: α–naphthylacetic acid (NAA), indolil-3-butyric acid (IBA), 6-benzilaminopurin (BAP), thidiazuron(TDZ), kinetin (KN) were used. The one-step sterilization (0.1% solution of corrosive sublimate during 10 min.) gave a possibility to receive 14.3 – 90.0% of sterile explants. The two-level processing (0.1% solution of $HgCl_2$ during 3 min. + sulphochlorantine during 10 min.) led to outcome of 90% sterile and 96.7 – 100% of viable explants. Microplants were adapted to *ex vitro* conditions at laboratory under illumination of 3 kLk and photoperiod of 16/8 h.

The direct chrysanthemum regeneration was observed when the floral explants were applied with part of a receptacle. However the morphogenesis wasn't found when the other inflorescence fragments were used.

Regenerated plants developed better on the nutrient medium, which was enriched by 10 and 20 μM of BAP, 1.0 μM of NAA and 0.1 μM of IBA. The maximum number of morphologically correct shoots was equal 15 per inflorescence.

The optimum nutrient medium at the stage of micropropogation itself was the combination of 0.5 μM KN to 0.25 μM IBA. It provides chrysanthemum shoots to form a root system actively. It also allows taking away a technique stage of rooting.

For adaptation to unsterile conditions chrysanthemum regenerants were planted on a presterilized artificial soil mixture. Then within 7 days they were covered by glasses. The number of adapted plants reached 100%. Specificity, depending on the variety, through the chrysanthemum micropropagation was not observed.

As a result, the technology of clonal micropropogation on the base of plant regeneration with inflorescence fragments using was improved, and chrysanthemum collection *in vitro*, consisting of 30 varieties, was improved.

Keywords: *chrysanthemum, collection in vitro, clonal micropropagation*

ЭМБРИОКУЛЬТУРА И МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ *IN VITRO ВИШНИ СТЕПНОЙ* (*PRUNUS FRUTICOSA* PALL)

Т.В. Плаксина
Научно-исследовательский институт садоводства Сибири им. М.А. Лисавенко,
г. Барнаул, Россия, e-mail: *tplaksina@ mail.ru*

Вишня степная (*Prunus fruticosa* Pall) наиболее морозоустойчивая плодовая культура. Этот вид вишни послужил основой для создания сортов для Сибири. Гибридный фонд вишни на Алтае пополнен новыми оригинальными генотипами, в том числе гибридами сложного генетического происхождения и плоидности, не имеющими аналогов в европейской части РФ и за рубежом. Эти формы при скрещиваниях часто дают невсхожие семена, что снижает эффективность селекции. Сочетание традиционных метод селекции с методами биотехнологии *in vitro* позволяет ускорить селекционный процесс при создании новых сортов вишни. Использование эмбриокультуры *in vitro* дает возможность сохранить и размножить ценные генотипы.

Цель исследований – совершенствование методики культивирования изолированных зародышей вишни и технологии клонального микроразмножения.

Объекты исследования изолированные зародыши вишни 23-х комбинаций скрещивания разных сроков зрелости (30, 40, 50 суток с момента опыления).

В качестве основной питательной среды использовали агаризованную (7 г/л агара) среду Мурасиге-Скуга (МС) с 30 г/л сахарозы. Для инициации роста зародышей испытаны питательные среды с разным содержанием регуляторов роста (РР): цитокинина (БАП) в концентрации от 2 до 20 мкМ, ауксинов ИМК - 0,2 мкМ или НУК - 2мкМ, гиббереллина ($ГК_3$) - от 0,5 до 1, 0 мкМ.

Реакция зародышей на РР зависела от их концентрации, возраста зародыша и генотипа. Для зародышей 30-ти и 40 суток оптимальны были следующие концентрации РР – 2,0 мкМ БАП в сочетании с 0,2 мкМ ИМК и 0,5 мкМ ГК. На такой среде отмечали рост зародышевой почечки и в дальнейшем формирование микрорастения. Этот вариант питательной среды был оптимален и для 50-ти суточных зародышей, только в том случае если зародыш ещё был не полностью зрелым. Для стимуляции роста зрелых зародышей, которые вступили в период покоя, использовали среды с повышенным содержанием БАП - от 10 до 20 мкМ с добавлением 2 мкМ НУК. Такое содержание РР позволило стимулировать рост зародышевой почки, адвентивных побегов и стеблевой органогенез в семядолях.

Для инициации собственно микроразмножения микропобеги переносили на питательные среды, дополненные цитокинином БАП или тидиазуроном (ТДЗ), с ИМК или без неё.

Побеги укореняли на среде 1/2 МС, дополненной ауксинами ИМК и НУК. Растения-регенеранты были адаптированы и высажены в грунт.

Ключевые слова: *вишня степная, зародыш, питательная среда, регуляторы роста*

EMBRYO CULTURE AND MULTIPLICATION *IN VITRO* OF FRUTESCENT CHERRY (*PRUNUS FRUTICOSA* PALL)

T.V. Plaksina
Lisavenko Research Institute of Horticulture in Siberia, Barnaul, Russia,
e-mail: *tplaksina@mail.ru*

Cherry frutescent is the most frost resistant fruit crop. This species of cherry is a base for the development of crop for Siberia. Hybrid fund of cherry at Altai is extended by new original genotypes, including hybrids of complex genetic origin and ploidy which have no analogs in the European part of our country as well as abroad. These forms often give non-germinating seeds at crossings. That leads to lower breeding efficiency. Combination of traditional breeding methods with biotechnology methods *in vitro* allows accelerating breeding process for the development of new cherry cultivars. Application of embryo culture *in vitro* gives a possibility to keep and propagate valuable genotypes.

The our aim is improvement of protocols for embryo culture and micropropagation of frutescent cherry.

Embryos of the 23 combinations of three ages (30, 40, 50 days after pollination) were used. In all experiments, the MS culture medium was supplemented: 30 g/l sucrose, 7 g/l agar and different concentrations of 6-benzylaminopyrine (BAP), gibberellic acid (GA_3), indole - 3-butyric acid (IBA), naphthalene acetic acid (NAA).

The reaction of embryos on the plant growth regulators (PGR) was depended on the concentration, age of embryo and genotype. Embryos of 30 and 40 days showed the growth of embryo bud and formation of microplants on medium supplemented with 2.0 µM BAP, 0.2 µM IBA, 0.5 µM. GA_3. That variant of culture medium was optimum for 50-days embryos but only in such case, when the embryo was immature. For stimulation of the growth of mature embryos the medium with 10.0 µM BAP and 2.0 µM NAA was used. Such content of PGR allowed stimulating the growth of embryo bud, adventives shoots and organogenesis in cotyledons.

Shoots were transferred on MS medium for micropropagation supplemented with different cytokinins – BAP or thidiazuron (TDZ) with IBA or without. Rooting of the shoots was achieved on 1/2 MS medium supplemented IBA and NAA. Plants were acclimatized and successfully transplanted to soil.

Key words: *frutescent cherry, embryo, culture medium, growth regulators*

ОСОБЕННОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *IN VITRO* ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РАЗЛИЧНЫХ САДОВЫХ ГРУПП РОДА *ROSA* L.

В.Р. Праздников, О.И. Молканова
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Главный Ботанический сад им. Н.В. Цицина Российской академии наук, г. Москва, Россия,
e-mail: *molkanova@mail.ru*

Роза – одно из самых популярных растений, используемых в декоративном садоводстве. Род *Rosa* L. – один из наиболее представительных таксонов, в его состав входят более 400 видов, а так же более 40000 сортов из 36 садовых групп роз.

Наряду с традиционными способами размножения для ряда садовых групп роз нами был успешно применен метод клонального микроразмножения.

Цель нашей работы – выявить биотехнологические особенности размножения в культуре *in vitro* модельных представителей из 7 садовых групп роз.

Объектами исследования являлись:

плетистые крупноцветковые (LCl) - Alchymist, EricTaberly, Девичьи Грезы
чайно-гибридные (HT) – Земфира, Климентина, Эмми
грандифлора (Gr) – Коралловый Сюрприз, Лезгинка, Майор Гагарин
миниатюрные (Min) – Гранатовый Браслет, Дюймовочка, Мальчик-с-Пальчик
шрабы (S) – Coral Babylon Eyes, Cuthbert Grant , Glamis Castle
гибриды кордезии (HKor) - Marie-Victorin, Sympathie, ЛетниеЗвезды
гибридыругоза (HRg) – Agra, David Thompson, Himmelssturmer

Методика исследований основывалась на общепринятых классических приемах с культурами изолированных тканей и органов растений. Для микроразмножения использовали питательные среды Murashige, Skoog (MS) и Quorin, Lepoivre (QL) с различной концентрацией БАП (от 0,3 до 1,5 мг/л). Интервал между пересадками составлял около месяца.

Наиболее успешное введение в культуру отмечали в начале активного роста после периода вынужденного покоя при взятии эксплантов в феврале-марте в закрытом грунте и апреле-мае в открытом грунте. Снижению выделения тканями полифенолов способствовало культивирование эксплантов на питательной среде с аскорбиновой кислотой.

На этапе микроразмножения замена сахарозы на глюкозу оказалась наиболее предпочтительной во всех вариантах опыта. На средах с глюкозой прослеживалась тенденция к увеличению как коэффициента размножения, так и их длины.

Наибольший показатель коэффициента размножения составил 3,0 у садовой группы Min, наименьший – 2,1 у садовой группы HT.

Было отмечено явление спонтанногоризогенеза на этапе собственно микроразмножениях некоторых сортов из садовых групп Min и S, что обусловлено их индивидуальными генетическими особенностями.

Оптимизированы методики клональногомикроразмножения коллекции разных сортов садовых групп рода *Rosa* L. и показана возможность сохранения ее при разработанных условиях в культуре *in vitro* до двух лет.

Ключевые слова: *биологическое разнообразие, культура клеток и тканей, морфогенетический потенциал*

FEATURES OF *IN VITRO* CULTIVATION OF REPRESENTATIVES OF THE VARIOUS GARDEN GROUPS OF THE GENIUS *ROSA* L.

V.R. Prazdnikov, O.I. Molkanova
Federal State Institution of Science Botanical Garden.named after N.V. Tsitsin of the Russian Academy of Science, Moscow, Russia, e-mail: *molkanova@mail.ru*

Rose is one of the most popular plants used in ornamental horticulture. The genus *Rosa* L. is one of the most representative taxa, it includes more than 400 species and over 40,000 varieties from 36 groups of garden roses.

Along with traditional ways of reproduction for some groups of garden roses we successfully applied the method of micropropagation.

The aim of our work was to identify the biological features of propagation in culture in culture *in vitro* model representatives from 7 groups of garden roses.

The objects of the research were:

Large flowering Climbing (LCl) - Alchymist, Eric Taberly, Devichji Grezy

Hybrid Thea (HT) – Zemfira, Klimentina, Emmy

Grandiflora (Gr) – Coral Surprise, Lezginka, Major Gagarin

Miniature (Min) – Granatowy Bracelet, Dujmovochka, Malchik-s-Palchik

Shrubs (S) – Coral Babylon Eyes, Cuthbert Grant ,Glamis Castle

Hybrids Kordesii (HKor)- Marie-Victorin, Sympathie, LetnijeZvezdy

Hybrids Rugosa (HRg) – Agra, David Thompson, Himmelssturmer

Research methodology was based on accepted classical techniques with cultures of isolated tissues and organs of plants. For micropropagation was used nutrient medium is MS (Murashige, Skoog, 1962) and QL (Quorin, Lepoivre, 1977) with different concentration of BAP (0.3 to 1.5 mg/l). The period between passages was approximately one month.

The most successful introduction of culture is observed at the beginning of active growth

after a period of forced rest during the capture of explants in February-March indoors and April-May in open ground. To decrease polyphenol discharge into medium we added ascorbic acid.

At the micropropagation stage, the replacement of sucrose to glucose was the most preferred in all variants of experience.The tendency to increase as the rate of reproduction, and of their length was observed on media with glucose.

The highest indicator of the rate of reproduction was 3,0 at the Min, thelowest – 2,1 at the HT roses.

During micropropagation the phenomenon of spontaneous rhizogenesis of microshootsin some varieties of garden groups Min and Shas been carried because of their individual genetic characteristics.

Methods of clonal micropropagation different varieties of groups garden roses has been optimized. The possibility of preservation under elaborated conditions *in vitro* of different varieties of rose up to 2 year was shown.

Keywords: *biodiversity, cell and tissue culture, a morphogenetic capacities*

РЕГУЛЯЦИЯ МОРФОГЕНЕЗА НУТА *IN VITRO* С ПОМОЩЬЮ НАНОБИОКОМПОЗИТА

О.А. Рожанская[1], Т.В. Шилова[1], Т.С. Уразова[2], Е.М. Горшкова[1]
[1]Сибирский научно-исследовательский институт кормов, г. Новосибирск, Россия,
e-mail: *olgarozhanska@yandex.ru*
[2]Институт химии твёрдого тела и механохимии СО РАН, г. Новосибирск, Россия,
e-mail: *urazovatanya@mail.ru*

Разработана эффективная методика культивирования нута *in vitro* с использованием нового регулятора роста – модифицированного гумата МГ-15 (нанобиокомпозита), изготовленного в Институте химии твёрдого тела и механохимии СО РАН. Технология основана на механохимической переработке бурого угля или торфа в готовый продукт, не нуждающийся в дальнейшей химической обработке. При этом значительно увеличивается экстракция биологически активных гуминовых кислот, а механохимическая модификация структуры гуматов увеличивает их способность связывать токсические вещества в прочные комплексы.

Нут (*Cicer arietinum* L.) – однолетнее травянистое растение из семейства *Fabaceae*, ценная зерновая бобовая культура, устойчивая к засухе и вредителям. В пределах России нут возделывается в основном на Северном Кавказе, в Крыму и Нижнем Поволжье. Продвижению нута в северные и восточные регионы препятствует неустойчивость к переувлажнению и прохладной погоде в период цветения и формирования семян, приводящая к снижению урожая и развитию грибных болезней. Для создания новых светлосемянных сортов нута, устойчивых к биотическим и абиотическим стрессорам Сибири, мы используем методы увеличения генетического разнообразия и адаптивной селекции *in vitro*.

Изучено влияние МГ-15 в дозе 1 мг/л на морфогенез в культуре измельчённых зародышей нута сорта Камила 1255 (Казахстан). Препарат добавляли к базовой питательной среде Мурасиге-Скуга половинной концентрации (1/2MS) перед автоклавированием. За 4 недели инкубации все эксплантy сформировали 2-3 побега. В экспериментальном варианте частота ризогенеза увеличилась на 16% по сравнению с контролем без гормонов, высота побегов на 30%, количество листьев на 19%, длина корней на 45%. Таким образом, тестируемый препарат в системе измельчённых зародышей нута in vitro проявил биологическую активность как индуктор корневого морфогенеза и стимулятор развития дифференцированных тканей.

В эксперименте по клональному микроразмножению растений нута изучено влияние нанобиокомпозита МГ-15 в двух концентрациях: 0,5 и 1 мг/л. Эксплантy стеблевых узлов культивировали на питательной среде Гамборга B5 половинной концентрации (1/2B5). В течение первых двух недель культивирования все эксплантy образовывали побеги, причём под действием МГ-15 в дозе 0,5 мг/л число побегов увеличилось на 10%, высота на 53%. Доза препарата 1 мг/л способствовала увеличению высоты побегов на 44% и частоты ризогенеза втрое по сравнению с контролем. В течение последующих двух недель препарат в дозе 0,5 мг/л продолжил индуцировать появление адвентивных побегов, в дозе 1 мг/л увеличил частоту образования побегов на 10%, высоту их на 28%. Частота ризогенеза под действием обеих доз увеличилась в 5 раз.

Таким образом, изучаемый препарат способствовал клональному микроразмножению нута путём индукции морфогенеза и стимуляции роста побегов. Эффект зависел от концентрации препарата в среде: если доза 0,5 мг/л показала более высокую активность индукции стеблевого морфогенеза, то 1 мг/л – корневого морфогенеза.

Ключевые слова: *биотехнология, нут, морфогенез, регулятор роста, нанобиокомпозит*

REGULATION OF CHICKPEA MORPHOGENESIS *IN VITRO* USING NANOBIOCOMPOSITE

O.A. Rozhanskaya[1], T.V. Shilova[1], T.S. Urazova[2], E.M. Gorshkova[1]
[1]Siberian Research Institute of Fodder Crops, Novosibirsk, Russia,
e-mail: *olgarozhanska@yandex.ru*
[2]Institute of Solid State Chemistry and Mechanochemistry SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: *urazovatanya@mail.ru*

Developed effective methods of cultivation of chickpea in vitro using the new growth regulator – modified humat MH-15 (nanobiocomposite) made in the Institute of Solid State Chemistry and Mechanochemistry SB RAS. The technology is based on mechano-chemical processing of brown coal or of peat in a finished product that needs no further chemical treatment. This increases extraction biologically active humic acids, and mechanochemical modification of the structure of humates increases their ability to bind toxic substances in the solid complexes.

Chickpea (*Cicer arietinum* L.) is an annual herbaceous plant of the family *Fabaceae*, valuable grain leguminous crop, resistant to drought and pests. Within Russia, chickpea is cultivated mostly in the North Caucasus, the Crimea and the Lower Volga region. Promotion of chickpea in the Northern and Eastern regions is limited by intolerance to excessive moisture and cool weather during flowering and formation of seeds, resulting in poor harvest and fungal diseases. To create new varieties of chickpea resistant to biotic and abiotic stressors in Siberia, we use biotechnological methods to increase genetic diversity and adaptive selection in vitro.

We investigated the effect of MH-15 at a dose of 1 mg/l to morphogenesis in the crushed embryos culture of chickpea Kamila 1255 (Kazakhstan). The test product was added to the Murashige-Skoog nutrient medium of half the concentration (1/2MS) before autoclaving. Within 4 weeks of incubation, each Explant formed 2-3 shoots. In an experimental medium, the frequency of rhisogenesis increased by 16% compared with the control without hormones, height of shoots by 30%, the number of leaves by 19%, root length by 45%. Thus, the test product have shown biological activity as an inducer of morphogenesis and root stimulator for the development of differentiated tissues in the system of chickpea crushed embryos in vitro.

It was investigated the effect of nanobiocomposite MH-15 in two concentrations: 0.5 and 1 mg/l in the experiment on microclonal propagation of chickpea regenerated plants. The stem nodes explants were cultured on a nutrient medium of Gamborg B5 half the concentration (1/2B5). During the first two weeks of culturing, all explants gave shoots, and under the action of MH-15 at a dose of 0.5 mg/l the number of shoots increased by 10%, height by 53%. The dose of 1 mg/l increased the height of shoots 44% and frequency of rhisogenesis threefold compared with the control. In the next two weeks the product in a dose of 0.5 mg/l continued to induce the emergence of adventitious shoots, in the dose of 1 mg/l increased the frequency of formation of shoots on 10%, height by 28%. The frequency of rhisogenesis under the action of both doses increased in 5 times.

Thus, the product MH-15 contributed to microclonal propagation of chickpea through induction of morphogenesis and growth stimulation of shoots. The effect depended on the concentration of the drug in the environment: if the dose of 0.5 mg/l had a higher activity induction of morphogenesis of the stem, then 1 mg/l – the root morphogenesis.

Keywords: *biotechnology, chickpea, morphogenesis, growth regulator, nanobiocomposite.*

ФЕНОМЕН АНДРОКЛИННОГО ПОЛИЭМБРИОИДОГЕНЕЗА *IN VITRO* В СОХРАНЕНИИ БИОРАЗНООБРАЗИЯ РАСТЕНИЙ

О.А. Сельдимирова, И.Р. Галин, Д.Ю. Зайцев, Н.Н. Круглова
Уфимский институт биологии РАН, г. Уфа, Россия,
e-mail: *o_seldimirova@mail.ru*

Биологический феномен андроклинии заключается в формировании *in vitro* регенерантов из компетентных микроспор в результате различных путей морфогенеза. Ранее нами выявлено, что один из таких путей – полиэмбриоидогенез, состоящий в формировании зародышеподобных структур со множественными меристемами побега. При прорастании полиэмбриоидов образуются регенеранты с увеличенным количеством побегов. Это позволяет значительно увеличивать выход регенерантов с целью тиражирования растений *in vitro*. Цель работы – разработка способа стабильного получения регенерантов в культуре *in vitro* пыльников путем полиэмбриоидогенеза. Работа выполнена на примере пшеницы.

Разработан методический подход к индуцированию желаемого пути морфогенеза *in vitro* микроспор. Сопоставление эмбриологических данных и результатов твердофазного иммуноферментного анализа позволило установить, что индукция полиэмбриоидогенеза *in vitro* определяется оптимальным балансом между концентрацией экзогенного ауксина 2,4-Д в питательной среде и содержанием эндогенного ауксина ИУК в пыльниках в момент инокуляции. Полученные данные дают основание для выбора концентрации 2,4-Д, оптимальной для индукции именно полиэмбриоидогенеза у конкретного генотипа пшеницы. Кроме того, исключается необходимость многократного эмпирического подбора условий культивирования пыльников *in vitro*, как это обычно делается в биотехнологической практике.

Методом световой и сканирующей электронной микроскопии детально изучены этапы развития *in vitro* полиэмбриоидов от инициальных микроспор до регенерантов. Установлено, что в своем развитии полиэмбриоид проходит фазы: инициальная клетка – бластомеризация (двуклеточная и многоклеточная структуры) – формирование апикально-базальной оси – органогенез. В результате формируются полиэмбриоиды нескольких фенотипов («спина к спине», «сердечковидные», «суротивно ориентированные вентральными сторонами»). В целом, развитие и формирование органов полиэмбриоида принципиально сходно с аналогичными событиями у зиготического зародыша донорных растений пшеницы в естественных условиях *in planta*. Такой вывод является веской причиной использования для массового получения полноценных регенерантов именно полиэмбриоидов.

Методом иммуногистохимического окрашивания выявлена локализация эндогенной ИУК в полиэмбриоидах *in vitro* в фазе органогенеза в сравнении с аналогичными показателями развивающихся зиготических зародышей *in planta*. Установлено, что в зародышах четко прослеживался градиент окрашивания с пиками в клетках инициалей органов. В полиэмбриоидах все клетки апикальной части окрашивались равномерно, что и обуславливало инициацию множественных щитков и соответствующих им апикальных меристем побегов.

Разработан лабораторный образец биотехнологии стабильного массового получения регенерантов пшеницы на основе биологического феномена андроклинного полиэмбриоидогенеза *in vitro*. Основные этапы этой биотехнологии, на наш взгляд, применимы для разработки биотехнологии получения и тиражирования андроклинных регенерантов редких и находящихся под угрозой исчезновения видов дикорастущих злаков. Последующая репатриация проростков или семян таких растений полиэмбриоидогенного происхождения в природные экосистемы может способствовать сохранению биоразнообразия.

Ключевые слова: *биоразнообразие, биотехнология, андроклиния, полиэмбриоидогенез in vitro, эмбриогенез in planta*

Работа поддержана грантом Президента РФ по программе «Ведущие научные школы России» (№ НШ-5282.2014.4)

THE PHENOMENON OF ANDROCLINAL POLYEMBRYOIDOGENESIS *IN VITRO* IN THE PRESERVATION OF PLANT BIODIVERSITY

O.A. Seldimirova, I.R. Galin, D.Yu. Zaytsev, N.N. Kruglova
Ufa Institute of Biology of RAS, Ufa, Russia, e-mail: *o_seldimirova@mail.ru*

The biological phenomenon of androcliny is the formation in *in vitro* of regenerants from competent microspores as a result of different pathways of morphogenesis. Previously, we found that one of such pathways is polyembryoidogenesis, consisting in the formation of embryo-like structures with multiple shoot meristems. During germination of polyembryoids regenerants with increased number of shoots were formed. This allows to significantly increase the yield of regenerants for the purpose of replication of plants *in vitro*. The purpose of the study was to develop the method of stable obtaining of regenerants in anther culture *in vitro* by polyembryoidogenesis. The study was done on the example of wheat.

The methodical approach to the induction of desired pathway of microspore morphogenesis *in vitro* was developed. Comparison of the embryological data and the results of solid-phase immunoassay method allowed to set that induction of polyembryoidogenesis *in vitro* was defined by the optimal balance between concentration of exogenous auxin 2,4-D in nutrient medium and content of endogenous auxin IAA in anthers at the moment of inoculation. The obtained data give reason for choice of 2,4-D concentration which will be optimal for induction of polyembryoidogenesis namely in particular wheat genotype. In addition, it eliminates the need for multiple empirical selection of the anther culture *in vitro* conditions, as is usually done in biotechnological practice.

The stages of polyembryoid development *in vitro* from initial microspore to regenerant were studied in detail by the methods of light and scanning electron microscopy. It was found the following phases of polyembryoid development: initial cell – blastomerization (bicellular and multicellular structures) – formation of apical-basal axis – organogenesis. As a result the polyembryoids of multiple phenotypes were formed ("back to back", "heart-like", "curative oriented by ventral sides"). In general, the development and organ formation in polyembryoid were fundamentally similar to the analogical events in zygotic embryo of wheat donor plants under natural conditions *in planta*. This conclusion is a valid reason to use the polyembryoids namely for mass production of sound regenerats.

The localization of endogenous IAA in *in vitro* polyembryoids at the phase of organogenesis in comparison with similar parameters of developed zygotic embryos *in planta* was revealed by the method of immunohistochemical staining. It was found that a gradient of staining with a peak in the cells of initial organs clearly traced in embryos. All the cells of the apical part were stained evenly in polyembryoids and that was the reason of the initiation of multiple scuta and their corresponding apical shoot meristems.

The laboratory sample of stable mass biotechnology of production of wheat regenerants on the base of biological phenomenon of androclinal polyembryoidogenesis *in vitro* was elaborated. The main stages of this biotechnology, in our view, applicable for the elaboration of biotechnology of obtaining and multiplication of androclinal regeneranrs of rare and endangering wild grasses. The subsequent repatriation of seedlings or seeds of such plants of polyembryoidogenical origin into natural ecosystems may contribute to biodiversity conservation.

Keywords: *biodiversity, biotechnology, androcliny, polyembryoidogenesis in vitro, embryogenesis in planta*

Aknowlegment
The study was supported by grant of the RF President program "Leading Scientic schools of Russia" (№ НШ-5282.2014.4).

ЭКОНОМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ РАСТЕНИЙ

В.А. Солопов, Н.В. Бобкова, С.А. Муратова
ФГБОУ ВО Мичуринский государственный аграрный университет, г. Мичуринск, Россия, e-mail: *solopov@mgau.ru*

В настоящее время резкое повышение курса валют, государственная политика импортозамещения, претензии потенциальных покупателей, связанные с проблемами выпада не приспособленных к нашим климатическим условиям саженцев зарубежного происхождения и завозов в страну карантинных болезней и вредителей, не имеющих в нашей зоне естественных врагов, привели к повышению спроса на высококачественный посадочный материал отечественного производства. Адаптированный посадочный материал с закрытой корневой системой (ЗКС) получают путем адаптации микрорастений, полученных *in vitro*, в условиях защищенного грунта. Растения с ЗКС поставляются в кассетах с различным объемом ячейки и их количеством (типы кассет от 54 до 160 ячеек) и контейнерах (от 0,5 до 5 л), после доращивания в теплице. Цена реализации растения в кассетах 30-45 руб. за 1 растение, в контейнере в зависимости от возраста, размера, вида растения и ценовой политики фирмы от 80 до 350 рублей. Планируемая прибыль на единицу продукции составляет при реализации кассетных растений от 15 до 30 руб. на 1 растение; при реализации растений в контейнерах после доращивания от 30 до 300 руб. на 1 растение. Основная специализация отечественных производственных подразделений - декоративные, плодово-ягодные и лесные культуры.

Мы провели расчет себестоимости производства посадочного материала в контейнерах (на примере ежевики) на базе лаб. биотехнологии Мичуринского ГАУ. Коэффициент размножения за пассаж взят – 4, эффективность укоренения – 80% , эффективность адаптации – 80%. Расходы на этапе микроразмножения и укоренения составили 7,68 руб. на 1 растение (заработная плата с начислениями – 3,11 руб., электроэнергия – 0,81 руб., питательная среда – 0,39, расходные материалы – 2,49, общехозяйские расходы – 0, 88), на этапе адаптации в кассетах 4,76 руб. на 1 растение (заработная плата с начислениями – 2,81 руб., электроэнергия – 0,03 руб., расходные материалы – 1,49, общехозяйские расходы – 0,43), на этапе доращивания в горшках – 20,08 руб. (заработная плата с начислениями – 3,08 руб., расходные материалы – 16,27, общехозяйские расходы – 1,73). Таким образом, себестоимость адаптированного кассетного растения составила 12,44 руб., растения в горшке- 32,52 руб. Прибыль при реализации кассетных растений по цене 35 руб. составила 22,56 руб. с растения, при реализации растений в горшках по цене 80 руб. – 47,48 руб. с саженца.

В основе практически всех манипуляций по клональному микроразмножению растений лежит ручной труд высококвалифицированного персонала, что значительно повышает стоимость полученных таким образом растений. Снижение расхода электроэнергии, повышение эффективности микроразмножение и укоренения клонируемой формы, достижение эффективности адаптации микрорастений не менее 90%, замена импортных реактивов и расходных материалов на отечественные аналоги – это основные пути снижения себестоимости продукции и повышения рентабельности технологии.

Ключевые слова: *клональное микроразмножение, объем производства, планируемая прибыль*

ECONOMIC ASPECTS OF CLONAL PLANT MICROPROPAGATION *IN VITRO*

V.A. Solopov, N.V. Bobkova, S.A. Muratova
Michurinsk State Agrarian University, Michurinsk, Russia, e-mail: *solopov@mgau.ru*

Nowadays, problems are related to the increasing rate of the foreign currency, to the import substitution policies, to an elimination of foreign seedlings in reason of climate conditions, to the threat of the proliferation of invasive plants and pathogens have increased the demand for high quality native plant material. The plant material with closed root system has been obtained by adapting *in vitro* microplants in the protected ground. Plants with the closed root system after the rearing in a greenhouse are transplanted to cassettes with different quantities of cells and their capacity (54 – 160 cells) or transplanted to containers. The main specializations of domestic plant production companies are horticulture and forest crops. The average price of the one adapted plant in the cassette is 35-45 rubles, the plant in a container according to the age, size, type of plant and pricing policies of the company 80 to 350 rubles. The profit varies from 15 to 30 rubles for one plant in a cassette and from 30 to 300 rubles for grown plant in a container.

We calculated the cost of production of planting material in containers (for example, blackberry) based lab. Biotechnology Michurinsky GAU. Efficiency micropropagation for the passage - 4, rooting efficiency - 80%, the effectiveness of adaptation - 80%. Spending on stage micropropagation and rooting totaled 7.68 rubles on one plant (wages with charges - 3.11 rubles, electricity -. 0.81 rubles, growing medium - 0.39, consumables - 2.49 general expenses landlady - 0, 88), at the stage of adaptation in cassettes 4.76 rubles on one plant (wages with charges - 2.81 rubles, electricity - 0.03 rubles supplies - 1.49, general expenses landlady - 0.43), at the stage of growing in pots - 20.08 rubles (wages with charges - 3.08 rubles, supplies - 16.27, general expenses landlady - 1.73). Thus, the cost of a cassette adapted plants was 12.44 rubles., the plant in a container - 32.52 rubles. Profit in the implementation of the adapted plant in the cassette on the price of 35 rubles is 22.56 rubles, with plants in a container sold on the price of 80 rubles - 47.48 rubles.

Mainly staff salaries and the energy cost are reflected at the cost price of microplants' production. The clonal micropropagation process is based on manual work of high qualified staff, which greatly increases the cost of the thus obtained plants. By following to some ways of commercial *in vitro* plant production might reduce the cost price of end-product and increased profitability of whole technology. Long-term profitability is based on these principals - adaptation microplants should be no less 90%, efficiency of microcloning and root formation should gradually develop, should be applied the replacement of imported reagents and consumables to domestic counterparts and reduce the production cost and improve the profitability of technology.

Keywords: *clonal micropropagation, productive capacity, profit varies*

ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* И КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ *LILAEOPSIS BRASILIENSIS* (GLAZ.) AFFOLTER

А.В. Сосина, М.Ю. Чередниченко
Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева, г. Москва, Россия, e-mail: *sosina_2012@mail.ru*

За последнее время среди аквариумистов всего мира большую популярность приобрел акваскейпинг, когда в аквариуме с водой содержатся только растения или, по крайней мере, именно они являются видовой и визуальной доминантой. Среди подобных растений важное место занимает *Lilaeopsis brasiliensis* (Glaz.) Affolter (далее *L. brasiliensis*). Это почвопокровная культура, представляющая собой небольшое, ползучее, корневищное, цветковое растение. В природе произрастает в Бразилии (юго-восток), Парагвае и Аргентине. Имеет ветвистый корень, на узлах которого находятся несколько листьев зелёного цвета. Листья прямостоячие, цельнокрайние, гладкие, длиной до 6 см, шириной 2-3 мм.

В целом *L. brasiliensis* – непритязательное растение, внешний вид и состояние которого мало зависят от химических параметров воды и уровня освещенности аквариума. Растет довольно медленно по сравнению с другими почвопокровными видами аквариумных растений, что и является его главным преимуществом. Страдает от обрастания водорослями. Разрастается всегда линейно, но от любого узла может пойти в любую сторону, поэтому быстро распространяется на все дно, образуя плотный ковер.

Введение в культуру *in vitro* растения *Lilaeopsis brasiliensis* и его культивирование имеет большое значение, так как позволяет получать чистый материал для содержания в аквариумах, поддерживать вегетативное потомство растений и анализировать его с генетической точки зрения.

Задачей данного этапа исследований было введение в культуру *in vitro* и клональное микроразмножение растений *L. brasiliensis*. Изучены различные режимы стерилизации. В качестве опытных вариантов условий среды выступали минеральная основа, кислотность, концентрация фитогормонов и регуляторов роста.

Ключевые слова: *акваскейпинг, in vitro, клональное микроразмножение*

INTRODUCTION *IN VITRO* AND CLONAL MICROPROPAGATION OF *LILAEOPSIS BRASILIENSIS* (GLAZ.) AFFOLTER

A.V. Sosina, M.Yu. Cherednichenko
Russian Timiryazev State Agrarian University, Moscow, Russia,
e-mail: *sosina_2012@mail.ru*

Recently, aquascaping, when the aquarium contains only plants or, at least, they are the visualdominant species, have become very popularamong aquarists all over the world. *Lilaeopsis brasiliensis* (Glaz.) Affolter (further *L. brasiliensis*) occupies an important place among these plants. This is a cover crop, which is a small, creeping, rhizomatous, flowering plant. In nature, it grows in Brazil (south-east), Paraguay and Argentina. It has the nodes with a branched root and few green leaves. Leaves are erect, smooth-edged, smooth, up to 6 cm long, 2-3 mm wide.

In general, *L. brasiliensis*is aunpretentious plant, its appearance and state a bitdepend on the water chemical parameters and the aquariumilluminationlevel. It grows relatively slowly compared to other types of ground-covering aquarium plants, which is its primary advantage. It suffers from fouling algae. It grows always linearly, but can go either wayfrom any node, thus quickly covers all the bottom, forming a dense carpet.

Introduction *in vitro* of *Lilaeopsis brasilinsis* and its cultivation is of great importance, as it allows to obtain pure material in aquaria keeping, to supportvegetative offspring plants and to analyze it from the genetic point of view.

The aim of this phase of research was the introduction *in vitro* and clonal micropropagation of *L. brasiliensis*plants. We studied different modes of sterilization. Mineral base, acidity, concentration of plant hormones and growth regulators wereinvestigated as experienced *in vitro* options.

Keywords: *aquascaping, in vitro, clonal micropropagation*

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ ДЛЯ АДАПТАЦИИ КЛЮКВЫ КРУПНОПЛОДНОЙ И БОЛОТНОЙ К УСЛОВИЯМ *EX VITRO*

И.В. Стручкова, А.В. Юрлова, Е.В. Березина, Н.Е. Мельникова, Ю.Л. Баринова, А.В. Юдинцев, А.А. Брилкина
Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, г. Нижний Новгород, Россия; e-mail: *struchkova65@inbox.ru*

Исследовалась возможность ускорения роста и развития растений полученных путем клонально микроразмноженных клюквы крупноплодной *Oxycoccus macrocarpus* (Ait.) Pers. и болотной *O. palustris* Pers. на этапе *ex vitro* с помощью сокультивирования с грибом-микоризообразователем эрикоидных растений *Phialocephala fortinii* (Wang, Wilcox), а также с сапротрофным микромицетом *Trichoderma virens* (Miller, Giddens et Foster) ВКМ F-1117. Применявшийся изолят *P. fortinii* выделен нами из корней клюквы болотной, произрастающей в Нижегородской области. Его видовая принадлежность установлена с помощью ПЦР-анализа, проведенного лабораторией ФГБНУ ВНИИСБ ЦКП «Биотехнология». Штамм *T. virens* ВКМ F-1117 получен из Всероссийской коллекции микроорганизмов.

Двухмесячные растения *O. macrocarpus* сортов Стивенс и Ховес и *O. palustris* формы 10, полученные при микроразмножении на питательной среде Андерсона, высаживали в емкости со стерильным торфяным грунтом, в который также вносили мицелий одного из грибов. В контрольном варианте мицелий не вносили. Инокуляцию проводили тридцатидневной культурой *P. fortinii* и пятидневной культурой *T. virens*, выращенных на агаризованной питательной среде Чапека-Докса. Растения культивировали при фотопериоде 16 часов под светодиодными светильниками с преобладанием лучей красного и синего диапазона и постепенно адаптировали к условиям пониженной влажности воздуха. Спустя 5 и 10 месяцев культивирования определяли биомассу листьев, стеблей и корней растений, длину стеблей и количество побегов. Проникновение мицелия в корни растений подтверждали с помощью системы лазерной сканирующей микроскопии Carl Zeiss LSM 710 на базе инвертированного микроскопа Axio Observe Z1 (Carl Zeiss, Германия). Автофлуоресценцию клеток растений наблюдали при возбуждении лазером 488 нм и эмиссии на 508-540 нм. Мицелий, окрашенный трипановым синим, обнаруживали при возбуждении лазером 488 нм и эмиссии на 580-735 нм.

Установлено положительное воздействие инокуляции грибами *P. fortinii* и *T. virens* на исследуемые показатели, однако степень выраженности эффекта зависела от микромицета, времени сокультивирования, органа, а также вида/сорта растений. Пятимесячное сокультивирование с грибом *P. fortinii* увеличило по сравнению с контролем сырую и сухую биомассу стеблей у обоих сортов клюквы крупноплодной и сухую биомассу – у клюквы болотной. В присутствии *T. virens* у клюквы сорта Ховес возросла как сырая, так и сухая биомасса листьев. Через 10 месяцев увеличение биомассы зафиксировано для листьев, стеблей и корней клюквы крупноплодной в присутствии обоих грибов. Наибольшую стимуляцию роста наблюдали у сорта Стивенс в присутствии *P. fortinii.* Обнаруженный эффект может быть полезен для стимуляции роста растений клюквы, полученных методом клонального микроразмножения, при адаптации к почвенному субстрату.

Ключевые слова: *Oxycoccus, клональное микроразмножение, ex vitro, Phialocephala, Trichoderma*

MICROSCOPIC FUNGI USAGE FOR AMERICAN AND EUROPEAN CRANBERRY ADAPTATION TOWARDS *EX VITRO* CONDITIONS

I.V. Struchkova, A.V. Yurlova, E.V. Berezina, N.E. Melnikova, Yu.L. Barinova, A.V. Yudintsev, A.A. Brilkina
Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod, Nizhni Novgorod, Russia;
e-mail: *struchkova65@inbox.ru*

It was studied possibility of enhanced growth and development of micropropagated American (*Oxycoccus macrocarpus* (Ait.) Pers.) and European (*O. palustris* Pers.) cranberry plants in *ex vitro* conditions with ericoid mycorrhizal (*Phialocephala fortinii* (Wang, Wilcox)) and saprotrophic (*Trchoderma virens* (Miller, Giddens et Foster) VKM F-1117) fungi co-cultivation. We obtained *P. fortinii* isolate from roots of European cranberry in Nizhegorodsky region. This fungus was identified with PCR-analysis held in biotechnological laboratory in All-Russian Institute of Agricultural Biotechnology. *T. virens* VKM F-1117 strain was obtained in All-Russian Collection of Microorganisms.

O. macrocarpus (cv. Stevens and Howes) and *O. palustris* (#10) plants cultivated *in vitro* on Anderson's nutritional medium for 2 months were placed in pots with sterile peat and fungus mycelium. Inoculation was made with *P. fortinii* 30-days culture or *T. virens* 5-days culture that were grown on Czapek-Dox nutritional medium. Plants were cultivated in conditions of 16h day/8h night photoperiod under LED lamps with red and blue rays prevalence. Plants were gradually adapted to lower air humidity. Since 5 and 10 months of cultivation there were measured biomass of leaves, stems and roots, length and number of shoots. Mycelium penetration into roots was demonstrated with *confocal laser scanning* module LSM 710 and inverted microscope Axio Observe Z1 (Carl Zeiss, Germany). Plant cells autofluorescence was detected under 488 nm laser excitation and 508-540 nm emission. Trypan blue-stained mycelium was visualized under 488 nm laser excitation and 580-735 nm emission.

It was shown that *P. fortinii* and *T. virens* inoculation increased all the parameters but effect intensity depended on fungus species, co-cultivation time, plant species/cultivar and organ. 5-months co-cultivation with *P. fortinii* increased fresh and dry stem biomass of both American cranberry cultivars and only dry biomass of European cranberry compared to control. Cv. Howes was characterized with the increase in fresh and dry biomass of leaves in the presence of *T. virens*. After 10 months enhanced biomass accumulation was shown for American cranberry leaves, stems and roots in the presence of both micromycetes. The highest growth stimulation was observed for cv. Stevens grown with *P. fortinii.* This effect may be useful for growth stimulation of micropropagated cranberry plants while adaptation to soil.

Keywords: *Oxycoccus, micropropagation, ex vitro, Phialocephala, Trichoderma*

ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ *LABURNUM ANAGYROIDES* MEDIC.

С.Н. Тимофеева, О.И. Юдакова, А.И. Степанова
Саратовский государственный университет им. Н.Г.Чернышевского, г. Саратов, Россия,
e-mail: *yudakovaoi@info.sgu.ru*

При озеленении городов важно учитывать не только эколого-физиологические особенности растений, но и их эстетические характеристики. Ценными декоративными показателями обладает широко культивируемый в странах Средиземноморья Бобовник анагировидный (*Laburnum anagyroides* Medic., сем. Leguminosae). Его интродукция часто осложняется малой эффективностью размножения традиционными способами (черенками, прививкой, семенами). Решить данную проблему можно с привлечением методов клонального микроразмножения. В наших исследованиях для получения стабильно пролиферирующей культуры побегов мы использовали следующую методику. Сухие семена замачивали на 30 мин в горячей воде, после чего стерилизовали 0,1% раствором $HgCl_2$ (15 мин), промывали 3-5 порциями стерильной дистиллированной воды и помещали на питательную среду для получения проростков. После появления первого настоящего листа корни проростков отсекали и экспланты пассировали на среду для размножения. Культуры выращивали при температуре 24±2°C, 14-часовом фотопериоде и освещенности 3000 лк. Тестирование сред различного состава показало, что среда MS, дополненная 0.5 мг/л БАП, является оптимальной как для инициации стерильной культуры, так и для собственно размножения побегов.

Через 4-6 недель культивирования на среде для размножения наблюдали рост первичного побега с одновременным развитием в среднем 3 пазушных побегов и 4-5 адвентивных побегов из каллусной ткани. Как известно, развитие побегов в стерильной культуре может быть результатом прямого органогенеза из тканей эксплантa или непрямого органогенеза из каллусной ткани. В последнем случае существует риск самоклональной изменчивости. Для определения путей морфогенеза нами был проведено гистологическое исследование эксплантов, зафиксированных ацетоалкоголем (3:1). Срезы приготавливали с использованием техники просветления растительных тканей.

Анализ показал, что через 4 недели культивирования базальная часть побега в зоне среза разрасталась за счет пролиферативной активности клеток камбия, феллогена, перимедуллярной зоны сердцевины и лучевой паренхимы. В разросшейся базальной части побега дифференцировались проводящие пучки. Через 6-7 недель базальная часть побега внутри каллуса продолжала разрастаться, количество проводящих пучков увеличивалось. Через 7-8 недель на них формировались глобулярные структуры – зоны повышенной пролиферативной активности, где дифференцировались апикальные меристемы, дающие начало адвентивным побегам. Через 3-4 месяца культивирования количество зон повышенной пролиферативной активности продолжало возрастать и достигало нескольких десятков.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что адвентивные побеги являются результатом пролиферативной активности меристем первичного побега и связаны с ним общей проводящей системой. Это позволяет предполагать наличие генетического соответствия всех вновь развившихся побегов. Для массового получения посадочного материала по выше описанной методике вполне допустимо использование адвентивных побегов.

Ключевые слова: *клональное микроразмножение, морфогенез, Laburnum anagyroides*

GISTOLOGICAL ASPECTS OF CLONAL MICROPROPAGATION OF *LABURNUM ANAGYROIDES* MEDIC.

S.N. Timofeeva, O.I. Yudakova, A.I. Stepanova
Saratov State University by N.G.Chernyshevsky, Saratov, Russia,
e-mail: *yudakovaoi@info.sgu.ru*

The ecological, physiological and ornamental characteristics of plants are important factors for gardening. *Laburnum anagyroides* Medis. (Leguminosae) widely cultivated in the Mediterranean region has attractive external characteristics. Conventional propagation through seeds or cutting are not very effective, that limits its introduction. Clonal propagation *in vitro* is a reliable alternative to conventional propagation. In our experiment, we used *in vitro* derived sterile seedlings as primary explants. Dry seeds were soaked in hot water for 30 minutes, then immersed into 0.1% solution of $HgCl_2$ (15 min). After that, the seeds were washed with 3-5 portions of sterile distilled water and were traversed onto a culture medium. After the development of a first true leaf the roots of the seedlings were cut off, the remaining parts of the seedlings were placed onto the culture media for propagation and shoot multiplication. The cultures were incubated at 24±2°C, under 14-photoperiod and illumination of 3 klux. Among various tested media, only the MS medium supplemented with 0.5 mg/l BAP demonstrated the best result for both culture initiation and shoot multiplication.

After 4-6 weeks of cultivation the development of primary shoots and axillary shoots (3 in the average) was observed. At the same time, a callus formed at the basal ends of explants and 4-5 adventitious shoots developed from the callus tissue. It is known that *in vito*-derived shoots may be a result of both direct organogenesis from the explant tissue and indirect organogenesis from the callus tissue. In The latter case there is a risk of somaclonal variability. We conducted a histological study of the explant tissue to determine morphogenesis pathways. The explants were fixed temporally in acetoalcohol (1:3). Sections were prepared by clearing of the plant tissue.

Our analysis showed that after 4 weeks of cultivation the basal part of the shoot grew as the result of the cell proliferate activity of the phellogen, perimedullary core zone and radiation parenchyma. Vascular bundles differentiated in the exaggerated basal part of the shoot. After 6-7 weeks of cultivation the basal part of shoot grows too, furthermore the number of vascular bundles increases. During 7-8 weeks of the cultivation the globular structure formed on the vascular bundles. These structures are zones of adventitious shoot formation. After 3-4 months of cultivation the number of proliferative activity zones increases.

Thus, the adventitious shoots develop by the proliferative activity of primary shoot meristems. Adventitious shoots have common with the primary shoot vascular system. This may suggest the existence of genetic conformity of all newly developed shoots. Using adventitious shoots is quite allowed for the mass production of planting material according to the above method.

Keywords: *clonal micropropagation, morphogenesis,Laburnum anagyroides*

ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* ХОЗЯЙСТВЕННО-ЦЕННОГО ТРУДНОУКОРЕНЯЕМОГО ТРОПИЧЕСКОГО ВИДА *MOMORDICA COCHINCHINENSIS* (LOUR.) SPRENG. (CUCURBITACEAE)

В.К. Тохтарь[1], Жанг Доанг[2], Л.А. Тохтарь[1], О.И. Коротков[3], Г.И. Сафронова[4]
[1]Ботанический сад Белгородского государственного национального исследовательского университета, г. Белгород, Россия, e-mail: *tokhtar@bsu.edu.ru*
[2] Ханойский государственный университет, г. Ханой, Вьетнам
[3]ФГБУН "НБС-ННЦ", г. Ялта, Россия
[4]Волгоградский региональный ботанический сад, г. Волгоград, Россия,
e-mail: *vrbs@list.ru*

M. cochinchinensis (Lour.) Spreng. (Cucurbitaceae) относится к группе двудомных растений, формирующих твердые семена с очень толстой, одревесневшей и очень прочной семенной кожурой (Joseph, 2004). Проведенные ранее опыты по воспроизводству двудомных видов *Momordica* путем выращивания растений из семян, собранных в природе не принесли результата из-за их низкой всхожести (Watanabe, 1998). Для изучения возможности введения растений *M. cochinchinensis* в культуру in vitro были проведены эксперименты по подбору наиболее оптимальных способов размножения этого вида.

Использовали семена с повреждением плотной оболочки в зоне микропиле и семена, лишенные плотной семенной оболочки (только семядоли). Стерилизация проводилась по следующей схеме: семена, смоченные в 96% этиловом спирте, обжигали в пламени спиртовой горелки (не более одной минуты), затем их стерилизовали в растворах лизоформина разной концентрации: 10% (7 мин), 10% (10 мин), 7% (10 мин), 7% (15 мин). Эксплантыкультивировались на питательной среде MS без добавления фитогормонов при температуре 22-24°C, влажности воздуха не менее 70%, на свету с 16-часовым фотопериодом. Приготовление и стерилизацию питательных сред для культивирования проводили согласно предложенным рекомендациям (Бутенко, 1999) с некоторыми модификациями.

По результатам нашего исследования для эксплантов без семенной оболочки, а также эксплантов с поврежденной оболочкой наилучшим вариантом была стерилизация семян 7%-ным раствором лизоформина в течение 10 минут.

Через двенадцать дней после посадки на питательную среду появились первые изменения в строении семядолей. После шестнадцати дней культивирования отмечено интенсивное корнеобразование и увеличение размера апекса. Первые листья появились на двадцать первый день. На сорок седьмой день культивирования микропобеги были уже хорошо развиты. В некоторых случаях они занимали все свободное пространство в зоне культивирования. Длина побега составила более 10 см. На этом этапе развития образовались проростки, которые были расчеренкованы для культивирования по одному междоузлию в пробирки на питательную среду WPM (Woody Plant medium). Через один месяц культивирования полученные в ходе исследования растения-регенеранты были высажены в грунт для адаптации к нестерильным условиям среды.

Таким образом, проведенное нами исследование впервые позволило вырастить растения *M. cochinchinensis* в условиях *in vitro*. Было установлено, что экспланты успешно стерилизуются в 7%-ном растворе лизоформина в течение 10 минут. После адаптации растения, высаженные в открытый грунт, сформировали плети оптимальных размеров, что свидетельствует о перспективности использования данного способа размножения растений *Momordica cochinchinensis* в культуре *in vitro*.

Ключевые слова: *Momordica cochinchinensis, двудомный трудноукореняемый вид, культура in vitro*

INTRODUCTION OF THE ECONOMIC AND VALUABLE HARDLY ROOTED TROPICAL SPECIES OF *MOMORDICA COCHINCHINENSIS* (LOUR.) SPRENG. (CUCURBITACEAE) TO *IN VITRO* CULTURE

V.K. Tokhtar[1], Zhang Doang[2], L.A. Tokhtar[1], O.I. Korotkov [3], G.I. Safronova[4]
[1]Botanichesky garden Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia, e-mail: *tokhtar@bsu.edu.ru*
[2] Hanoi National University, Hanoi, Vietnam
[3]FGBUN " NBG -NSC" , Yalta , Russia
[4]Volgograd Regional Botanical Garden, Volgograd, Russia, e-mail: *vrbs@list.ru*

Momordica cochinchinensis (Lour.) Spreng. (Cucurbitaceae) belongs to the dioecious group of plants forming seeds with very thick, lignified and very strong seed peel (Joseph, 2004). The experiments on reproduction of the dioecious *Momordica* species by cultivation of plants from the seeds collected in the nature haven't brought result because of their low viability (Watanabe, 1998). For studying of a possibility of the *M. cochinchinensis* plants introduction to the *in vitro* culture the experiments on selection of the most optimum ways of propagation have been made.

We used seeds with damage of a dense cover within micropyle zone and the seeds deprived of a dense seed cover (only cotyledons). Sterilization was carried out according to the following scheme: the seeds moistened in 96% ethyl alcohol burned in a flame of a spirit torch no more than a minute, then we have sterilized them in lizoformin solutions of different concentration: 10% (7 min), 10% (10 min), 7% (10 min), 7% (15 min). Explants were cultivated on a MS nutrient medium without addition of phytohormones at a temperature 22-24°C, with air humidity not less than 70% on light with the 16-hour photoperiod. Preparation and sterilization of nutrient mediums for cultivation were carried out according to the offered recommendations (Butenko, 1999) with some modifications.

Sterilization of seeds by seven-percentage solution of lizoformin within 10 minutes was the best option for explants without seed cover, and also for explants with the damaged cover according to the results of our research.

The first changes in a cotyledon structure have appeared in twelve days after planting to a nutrient medium. After sixteen days of cultivation the intensive root-forming processes and increase in the size of an apex were noted. The first leaves have appeared for the twenty first day. For the forty seventh day of cultivation microsprout have been already well developed. They occupied all free space in a cultivation zone in certain cases. The length of the sprouts was more than 10 cm. At this stage of development the sprouts were propagated for cultivation (one plant internode was placed in test tubes on a nutrient medium of WPM (Woody Plant medium)). In one month of cultivation the plant-regenerants received during research have been planted in soil for adaptation to unsterile conditions of the environment.

Thus, the research conducted allowed by us to grow up the *M. cochinchinensis* plants in the *in vitro* conditions for the first time. It was revealed that the explants can successfully be sterilized in solution of a seven-percentage lizoformin within 10 minutes. After the adaptation of plants, planted under the opened ground conditions, they formed stigas of optimum size/ This thing indicates the prospects of this method using for propagation in *Momordica cochinchinensis* plants under in vitro conditions.

Keywords: *Momordica cochinchinensis, the dioecious hardly rooted species, in vitro culture*

ФЛОРАЛЬНЫЙ МОРФОГЕНЕЗ *DENDROBIUM APHYLLUM* (ROXB.) FISCH В КУЛЬТУРЕ ТКАНЕЙ

Нгуен Тхань Хай[1], Нгуен Тхьи Фыонг Тхао[1], Е.А. Калашникова[2]
[1] Вьетнамский национальный аграрный университет, Биотехнологический факультет, г. Ханой, Вьетнам, e-mail: *nthaicnsh@vnua.edu.vn*
[2] Российский государственный аграрный университет - МСХА имени К.А.Тимирязева, г. Москва, Россия, e-mail: *kalash0407@mail.ru*

Цветение растений – это сложный процесс, который регулируется генетическими причинами и многими факторами окружающей среды. Первые исследования по управлению процессом цветения растений были начаты более 100 лет назад, однако на сегодняшний день окончательной информации о причинах и механизмах цветения не получено. Одним из путей изучения процессов цветения и способов их регулирования является проведение исследований в лабораторных условиях *in vitro*.

Объектом исследования служили одиночные микропобеги и кластеры микропобегов орхидей (*Dendrobium aphyllum* (Roxb.) Fisch), которые формировались в условиях *in vitro*. Микропобеги размножали на питательной среде, содержащей минеральные соли по прописи Мурасига и Скуга (МС), сахарозу 3%, агар 8 г/л.

Образование цветочных почек индуцировали на одиночных микропобегах высотой 2 см и кластерах побегов (формирование 2-3 адвентивных побегов). В качестве индуктора флорального морфогенеза использовали: БАП в концентрации 0,2-2,0 мг/л, паклобутразол (PBZ) – 0,1-1,0 мг/л и тиадиазурон (TDZ) – 0,1-1,0 мг/л. Препараты применяли отдельно и в сочетании друг с другом.

При выращивании побегов *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) Fisch на среде МС, содержащей БАП 1,0 мг/л и PBZ 0.1 мг/г формирование цветочных почек происходил в 22,68% случаев, а при культивировании на среде МС с TDZ 1,0 мг/л и 0,5 мг/л PBZ частота флорального морфогенеза составила 100% после 10 недель с начала культивирования микропобегов.

Ключевые слова**:** *орхидеи, цветочные почки, регуляторы роста, БАП, тиадиазурон, паклобутразол, морфогенез, in vitro*

FLORAL MORPHOGENESIS *DENDROBIUM APHYLLUM* (ROXB.) FISCH IN PLANT TISSUE CULTURE

Nguyen Thanh Hai[1], Nguyen Thi Phuong Thao[1], E.A. Kalashnikova[2]
[1]Vietnam National University of Agriculture, Vietnam, Hanoi Plant Biotechnology Department, e-mail: *nthaicnsh@vnua.edu.vn*
[2]Russian State Agrarian University- Moscow Agricultural Academy named after K.A. Timiryazev, Russia, Moscow, e-mail: *kalash0407@mail.ru*

Plant flowering is a sophisticated process. This process is regulated by environmental and genetic factors. The research on controlling of flowering in plants has been conducting for more than 100 years ago, however, the flowering process knowledge in plants is still limited. Besides the traditional research methods, *in vitro* flowering research as an experimental model is also a potential approach, since plant development under *in vitro* condition is not influenced by environmental factors. In addition, this method shortens the induction of flowering time in plants.

In vitro single or shoot clusters (2-3 shoots) of *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) Fisch, with 2 cm height were used for *in vitro* flowering induction. Micro shoots propagated on a nutrient Murashige and Skoog medium (MS), 3% sucrose, agar 8 g/l. Individual and/or in combination of plant hormones, including BAP - 0.2 to 2.0 mg/l, Paclobutrazol (PBZ) - 0.1 to 1.0 mg/l and Thidiazuron TDZ - 0.1 to 1.0 mg/l were added to the media in order to control the flowering.

The combination of BAP and PBZ successfully induced *in vitro* flowering shoots clusters *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) Fisch 22,68% on MS + 0.1 mg/l PBZ + 1 mg/l BAP after 10 weeks. The combination of TDZ and PBZ successfully induced in vitro flowering shoots clusters *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) Fisch 100% on MS + 1 mg/l TDZ + 0.5 mg/l PBZ after 10 weeks.

Keywords: *orchids, flower buds, growth regulators, BAP, Thidiazuron (TDZ), Paclobutrazol (PBZ), morphogenesis, in vitro*

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СОВРЕМЕННЫХ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ В СЕЛЕКЦИИ И ПРОИЗВОДСТВЕ ХОЗЯЙСТВЕННО-ЦЕННЫХ ЯГОДНЫХ КУЛЬТУР СЕМЕЙСТВА БРУСНИЧНЫЕ

О.В. Чижик, В.Л. Филипеня, В.Н. Решетников
Центральный ботанический сад НАН Беларуси, г.Минск, Беларусь,
e-mail: *alisa67@hotbox.ru*

Представители сем. Брусничные (*Vacciniaceae*) – голубика высокорослая (*Vaccinium corymbosum*), клюква крупноплодная (*Oxycoccus macrocarpus*) и брусника сортовая (*Vaccinium vitis-idaea*) – интродуцированные в Беларуси экономически важные ягодные культуры. Их возделывание особенно актуально в связи с проблемой продовольственного обеспечения населения продуктами питания, содержащими БАВ. В связи с высокой востребованностью плодов и эффективностью фармакологических субстанций, получаемых из древесно-кустарниковых видов рода *Vaccinium*, стоит задача расширения площадей их культивирования, что напрямую связано с наработкой качественного посадочного материала в короткие сроки и в промышленных масштабах. Технологии клонального микроразмножения стали неотъемлемой частью промышленного плодоводства, позволяя интенсифицировать процесс размножения и улучшить качество получаемых растений.

В отделе биохимии и биотехнологии растений ЦБС проведен комплекс работ по биохимии и биотехнологии сем. Брусничные. Проводится генетическая паспортизация сортов сем. Брусничные для сертификации посадочного материала, а также анализ генетической идентичности регенерантов и исходных генотипов методами PCR-анализа, разработаны эффективные технологии клонального микроразмножения (в том числе с использованием микробных препаратов и наночастиц) для получения оздоровленного сортового посадочного материала новых интродуцированных сортов голубики, обладающих высокой потенциальной урожайностью, устойчивостью к стрессовым факторам среды, а также с высоким содержанием биологически активных веществ. В отделе разработаны методики клонального микроразмножения голубики высокорослой, клюквы крупноплодной и брусники, которые позволяют получать физиологически однородный, оздоровленный и омоложенный посадочный материал. В настоящее время ведутся работы по изучению регенерационого потенциала клюквы крупноплодной, голубики высокорослой и брусники сортовой в культуре *in vitro*, генетической стабильности и вариабельности материала, полученного методами клонального микроразмножения, изучаются физиолого-биохимические процессы и их регуляция при регенерации и морфогенезе у растений. Традиционные методы получения новых сортов голубики, брусники и клюквы достаточно трудоемки и требуют больших затрат времени. Перспективным направлением селекции этих культур является получение сортов с новыми характеристиками с использованием приемов молекулярной селекции, одним из методов которой является генетическая трансформация растений, позволяющая генетическое улучшение качества культур и, таким образом, дополняющая и расширяющая классические методы селекции растений. В отделе оптимизированы условия агробактериальной трансформации брусничных на основе анализа транзиентной экспрессии репортерного гена GUS. Исследовано влияние моносахаридов, индукторов vir-генов на эффективность получения устойчивых к канамицину регенерантов. Проведены серии трансформаций с целью установления влияния антиоксидантов на эффективность агробактериальной трансформации. Отобраны и размножены устойчивые к канамицину регенеранты (линии). Получены линии трансгенных растений с повышенной резистентностью к фитопатогенам и максимальным соответствием исходному сортотипу.

Ключевые слова: *Vacciniaceae, клональное микроразмножение, генетическая трансформация*

THE MODERN BIOTECHNOLOGICAL METHODS USAGE IN BREEDING AND PRODUCTION OF COMMERCIALLY VALUABLE FRUIT CROPS OF *VACCINIACEAE* FAMILY

Olga Chizhik, Veronica Filipenia, Vladimir Reshetnikov
The Central Botanical Garden of NAS of Belarus, Minsk, Belarus,
e-mail: *alisa67@hotbox.ru*

The representatives of *Vacciniaceae* family – highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum*), American cranberry (*Oxycoccus macrocarpus*) and lingonberry (red bilberry) (*Vaccinium vitis-idaea*) are introduced in Belarus economically important berry crops. Its cultivation is topical in connection with the problem of the population supplying with food products containing biologically active substances.

At the present time there is a task to expand the area of *Vaccinaceae* cultivation due to high effectiveness of its pharmacological substances. This task is connected with qualitative planting material production in a short time and on a commercial scale. The technologies of micropropagation have become an essential part of the berry growing industry. This technologies allow to intensify the process of multiplication and to improve the quality of the plants.

In the Department of Biochemistry and Biotechnology of Plants of the Central Botanical Garden have carried out a range works on *Vaccinaceae* biochemistry and biotechnology. We perform genetic certification of cultivars for the planting material certification as well as the analysis of the genetic identity of regenerants and the original genotypes with PCR-analysis methods.

The effective technologies of micropropagation (including the microbial preparations and nanoparticles usage) had been elaborated to produce the improved high-quality planting material with high yield potential and resistance to environmental stress factors as well as with high content of biologically active substances. The methods of microclonal propagation of highbush blueberry, American cranberry and lingonberry which allow to obtain physiologically unimodal, sanitated and rejuvenated planting material had been developed in our department.

At the present time we carry out works on regenerative potential of highbush blueberry, American cranberry and lingonberry in *in vitro* culture investigation and on genetic stability and variability of the obtaining plant material. We study the physiological and biochemical processes and its regulation in regeneration and morphogenesis in plants.

The traditional methods of new cultivars of blueberry, cranberry and lingonberry obtaining are quite laborious and time consuming. A perspective direction of these cultures selection is to obtain cultivars with new characteristics by molecular breeding techniques. The genetic transformation method allows to improve culture's quality and complements and extends the classical plant breeding methods.

In the department the agrobacterium-mediated transformation conditions based on analysis of transient expression of the reporter gene GUS have been optimized. The monosaccharides, vir-genes inductors influence on effectiveness of the kanamycin-resistant regenerants production as well as the influence of antioxidants on the Agrobacterium-mediated transformation efficiency have been investigated. Kanamycin resistant regenerants (lines) had been selected and multiplicated. The lines of transgenic plants with heighten resistance to pathogens and maximum original cultivar's correspondence have been obtained.

Keywords: *Vacciniaceae, micropropagation, genetic transformation*

КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ ПЛОДОВЫХ И ДЕКОРАТИВНЫХ КУЛЬТУР В УСЛОВИЯХ ПРОМЫШЛЕННОГО ПРОИЗВОДСТВА

А.А. Шипунова
Научно-производственный центр биотехнологии «Фитогенетика», г.Тула, Россия,
e-mail: *npc.fitogenetika@ya.ru*

Современное питомниководство в наше время активно использует биотехноллогические приёмы, позволяющие за короткое время получить качественный посадочный материал, свободный от основных вирусных и грибных болезней. В полной мере такие приёмы используются вот уже 20 лет на НПЦ «Фитогенетика». В коллекции культур *in vitro* находятся такие культуры, как земляника, актинидия, ежевика, малина, виноград, жимолость, голубика, рябина, вишня, слива, алыча, сирень, рододендроны, гейхера, чубушник. Годовой объём производства – около 500 тысяч растений. В условиях промышленного производства важно искать пути снижения себестоимости полученных растений, так как на рынке востребованы не просто качественные, а прежде всего, дешёвые растения. За 20 лет работы на нашем предприятии разработаны некоторые приёмы, позволяющие снизить себестоимость продукции: исключение в некоторых случаях этапа укоренения *in vitro* и перенос его *ex vitro*; широкое применение простого черенкования, прежде всего, на кустарниковых культурах и лианах; применение светодиодного освещения в световых комнатах; разработка унифицированных сред на этапах размножения и укоренения; использование многоразовой посуды; отказ от применения дистиллированной воды и замена её водой фильтрованной высокой степени очистки; приёмы адаптации минирастений в условиях стеллажных теплиц, с использованием отечественной биотехнологической новинки – препарата Биофиш.

Ключевые слова: *клональное микроразмножение, себестоимость, питательные среды, укоренение, светодиоды, адаптация*

CLONAL MICROPROPAGATION OF FRUIT AND DECORATIVE CULTURES FOR INDUSTRIAL PRODUCTION

A.A. Shipunova
"Fitogenetika" scientific and production centre of biotechnology Tula, Russia,
e-mail: *npc.fitogenetika@ya.ru*

Nowadays modern nursery-gardening very actively uses biotechnological techniques permitting to produce high-grade planting stock free of main viral and fungal diseases at a short time. Such techniques have already been used by the "Fitogenetika" SPC to the full extent for 20 years. Such cultures as *strawberry, actinidia, blackberry ,raspberry, grape, lonicery, blueberry, sorbus, cherry, prunus, lilac, rhododendrons, heihera, philadelfus* are presented in our *in vitro* collection of cultures. Our annual output equals 500 thousand plants. In industrial production conditions it is important to look for plants cost reduction ways, as not merely high-grade but first of all inexpensive plants are in demand at the market. Some techniques permitting to achieve a productcost reduction have been developed at our center during 20 years of work: removal of *in vitro* rooting step and its transfer to *ex vitro* in some cases; wide use of simple cutting with shrub cultures and lianas; application of LED lighting in luminous chambers; development of unified tissue media at micropropagation and rooting stages; application of nonexpendable vessels; disuse of destilled water and its substitution for high-purity filtered one; mini-plants adaptation techniques in shelf greenhouse conditions using home-produced biotechnological recent development – Biofish product.

Keywords: *clonal micropropagation, production cost, tissue media, rooting, light-LED, adaptation*

ОПТИМИЗАЦИЯ ОСНОВНЫХ ЭТАПОВ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ *ORIGANUM VULGARE* L. *IN VITRO*

О.В. Якимова, Н.А. Егорова
ФГБУН «НИИ сельского хозяйства Крыма», г. Симферополь, Россия,
e-mail: *olyyakimova@yandex.ru*

Душица обыкновенная *(Origanum vulgare* L.*)* – многолетнее травянистое лекарственное и эфиромасличное растение, широко применяемое в различных отраслях экономики, а также в медицине. Особую ценность имеет эфирное масло душицы, поэтому проводится селекционная работа по созданию сортов с высоким содержанием эфирного масла. Для повышения эффективности селекции необходимо внедрение современных биотехнологических методов, одним из которых является клональное микроразмножение. В связи с этим, целью нашего исследования была разработка основных этапов клонального микроразмножения душицы *in vitro* для ускоренного размножения ценных генотипов и новых сортов.

Объектом исследований служили растения *Origanum vulgare* L. (селекционные образцы № 10, № 17, № 40), выращиваемые в условиях закрытого грунта. В качестве эксплантов использовали сегменты стебля с одним узлом. Экспланты культивировали на различных модификациях среды Мурасиге и Скуга (МС), дополненных БАП, кинетином, гиббереллoвой кислотой (ГК) и ИУК, в культуральной комнате при 24-26°С, 70% влажности воздуха, освещенности 2–3 клк и 16-часовом фотопериоде.

В результате проведенных экспериментов были установлены особенности влияния состава питательной среды и генотипа на развитие эксплантов на этапе введения *in vitro*. Максимальные показатели развития эксплантов (количество и длина побегов, число узлов и др.) были получены при использовании в составе питательной среды БАП в концентрациях 1,0–2,0 мг/л. При этом коэффициенты размножения (КР) у изученных селекционных образцов достоверно отличались и варьировали от 1:11,7 до 1:22,9. Максимальные значения были отмечены у образца № 40.

На втором этапе микроразмножения душицы было испытано 20 вариантов среды МС. Максимальный коэффициент размножения за цикл культивирования (1:94,9) был получен при использовании 0,5 мг/л БАП. Изучено влияние места расположения экспланта на побеге на эффективность микроразмножения при сравнении сегментов стебля с 1-м узлом разного яруса, выделенных из побегов *in vitro*. Установлено, что КР у эксплантов, выделенных из среднего яруса побега, был соответственно в 2,1 и 2,8 раз больше по сравнению с верхушкой и нижним ярусом.

При подборе питательной среды для укоренения были испытаны 7 модификаций среды МС с добавлением ИМК, НУК и ИУК. Максимальная частота укоренения (100%) была на среде, содержащей 1,0 мг/л ИМК, при этом было отмечено хорошее развитие как основного, так и боковых корней.

Заключительным этапом микроразмножения *in vitro* является адаптация полученных проростков к условиям *in vivo*. В качестве компонентов субстрата использовали торф, перлит, песок, почву, керамзит в различных сочетаниях. Установлено, что максимальная частота приживаемости проростков (100%) была при использовании смеси торфа и перлита в соотношении 1:1.

Полученные результаты явились основой для разработки методики клонального микроразмножения *Origanum vulgare* L. *in vitro*.

Ключевые слова: *Origanum vulgare* L.*, клональное микроразмножение, эксплант, in vitro.*

OPTIMIZATION OF THE MAIN STAGES OF CLONAL MICROPROPAGATION *ORIGANUM VULGARE* L. *IN VITRO*

O.V. Yakimova, N.A. Yegorova
Scientific Research Institute of Agriculture of Crimea, Simferopol, Russia,
e-mail: *olyyakimova@yandex.ru*

Oregano (*Origanum vulgare* L.) – is a perennial herbaceous medicinal and aromatic plant, widely used in different branches of the economy, as well as in medicine. The essential oil of oregano is especially valuable, so breeding works for creation the cultivars with a high content of essential oil are carried out. To increase the efficiency of breeding it is necessary to introduce modern biotechnological methods, one of which is a clonal micropropagation. The aim of our study consequently was to develop the basic stages of micropropagation of oregano *in vitro* to accelerate the process of new cultivars and genotypes multiplication.

As research object the *Origanum vulgare* L. plants (breeding samples № 10, № 17, № 40) were used. The plants were grown in a greenhouse. Stem segments with a single node were used as explants. The explants were cultured on different modifications of Murashige and Skoog medium (MS), supplemented by BAP, kinetin, gibberellic acid (GA) and IAA, in a culture room at 24-26°C, 70% humidity, with lightning 2-3 Klux and 16-hour photoperiod.

The peculiarities of nutrient medium composition and genotype influence on the explants' development on the stage of introduction *in vitro* were defined as a result of the experiments. Maximum parameters of explants development (length and number of shoots, the number of nodes etc.) were obtained using in the composition of the nutrient medium 1.0-2.0 mg/l BAP. In this case multiplication coefficients at the studied breeding samples were significantly different and ranged from 1:11.7 to 1:22.9. The highest values were observed in the sample № 40.

At the second stage of oregano micropropagation the 20 variants of MS medium were tested. The maximum multiplication coefficient for the cultivation cycle (1:94.9) was obtained using 0.5 mg/l BAP. The influence of explant location on the shoot at the efficiency of micropropagation when comparing shoot segments with the one node of different tiers that were isolated from *in vitro* plants was studied. It was found that multiplication coefficient for explants isolated from the middle tiers of shoot was accordingly 2.1 and 2.8 times more in comparison with the tip and lower tiers.

Selecting a nutrient medium for rooting the seven modifications of MS medium, with the addition IBA, NAA and IAA, were tested. The maximum frequency of rooting (100%) was on a medium containing 1.0 mg/l IBA. Good development of both primary and lateral roots was noted.

The final stage of *in vitro* micropropagation is the adaptation of obtained plantlets to conditions *in vivo*. As components of substrate the peat, perlite, sand, soil, expanded clay in various combinations was used. It is found that the maximum frequency of plantlets survival (100%) was while using a mixture of peat and perlite in the ratio 1:1.

The obtained results were the basis for the development of methods of clonal micropropagation of *Origanum vulgare* L. *in vitro*.

Keywords: *Origanum vulgare L., clonal micropropagation, explant, in vitro*

PHYSIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY OF USEFUL TRAITS IN ORNAMENTAL GEOPHYTES

Rina Kamenetsky
Institute of Plant Science, ARO, the Volcani Center, Bet Dagan, Israel,
e-mail: *vhrkamen@volcani.agri.gov.il*

Ornamental geophytes (flower bulbs) present one of the most fascinating and challenging sectors in the global flower industry. Traditionally, the primary goal of bulb research was to provide the flower industry with the technologies for efficient growth cycles and high quality market standards. These goals are still important, and a great deal of the current research is dedicated to plant development, quality and reproduction. Today we understand that the interrelationship between reproduction and dormancy during the life cycle is regulated by the environmental signals, including temperature, moisture and photoperiod. The external and internal factors define the survival strategy of the plant, including vegetative growth, flowering, drought tolerance and the formation of storage organs.

However, recent advancement in molecular science and technology has brought geophyte research to an entirely new level. Genes can be analyzed at relatively low costs, proteomics and metabolomics have become valuable research tools, and genome sequencing, using the most complicated technologies, have been achieved in several species. Thus, classical breeding, supported by modern biotechnological tools (e.g., marker-assisted selection, *in vitro* technologies or introduction of functional genes), is not focused anymore on aesthetic traits and physiological characteristics, but prioritizes novel key traits, e.g., reduced sensitivity to ethylene, postharvest longevity, resistance to pests and diseases. Remarkable advancement has been achieved in the breeding of several major crops (e.g., lilies and tulips) using state-of-the arts methods and approaches. In many other species and genera the potential for creating new variation is evident, but still awaits an application.

The up-to-date trends and research challenges in geophyte science, technologies for sustainable production and conservation of natural resources will be discussed with specific examples.

Keywords: *geophyte research, marker-assisted selection, in vitro technologies*

STRATEGIES AND PROBLEMATICS ON *IN VITRO* CLONAL PROPAGATION OF FRUIT ROOTSTOCKS AND VARIETIES: THE ITALIAN EXAMPLE OF 'VIVAI PIANTE BATTISTINI'

Romano Roncasaglia[1], E. Aylin Ozudogru[2], Giuliano Dradi[1], Diego Bujazha[1], Massimiliano Meneghini[1]
[1]Vivai Piante Battistini Società Agricola, Martorano di Cesena (Forlì-Cesena), Italy,
e-mail: *romanoroncasaglia@battistinivivai.com*
[2]IVALSA/Istituto per la Valorizzazione del Legno e delle Specie Arboree, CNR (National Research Council), via Madonna del Piano, Sesto Fiorentino (Firenze), Italy

Plant micropropagation is a reliable nursery technology applied commercially worldwide, which allows large-scale clonal propagation and supply of selected plants, such as fruit species, orchids, flowers, indoor and outdoor ornamentals. In Italy, for instance, over 30 million plants (mainly fruit rootstocks and varieties) are produced annually by the micropropagation technique. The nursery 'Vivai Piante Battistini', located in Cesena, North-East of Italy, is an example of successful commercial micropropagation, developed since the beginning of the 80's. The company is specialized in the *in vitro* propagation of fruit rootstocks for peach, plum, cherry and apricot, as well as varieties of kiwi, fig, hazelnut and small fruits, largely demanded by the national and international nursery market. Micropropagation, however, is highly labor oriented and, for this reason, outsourcing of plant multiplication activities is shifting today to countries having a lower labor cost, such as, Poland, Greece, Turkey, Czech Republic, Portugal, Hungary and, outside Europe, in India, Egypt, China and Argentina, where recently-established new commercial laboratories have often benefited from Italian counseling. This strong competition is particularly felt in countries, such as Italy, producing mainly fruit trees and rootstocks where the margin of profit is generally very limited. In the technologically-advanced countries, the reduction of the unit cost of micropropagated plants, without compromising the quality of productions, can be pursued only by adopting practices and optimizing the use of equipment and resources. Furthermore, the development and rapid multiplication of new selected cultivars are required to meet the demand of consumers all year round. The scientific activity carried out in public research Institutions has recently produced important outcomes, not only in the optimization of micropropagation protocols for many economically-important species, but also in the development of innovative *in vitro* techniques, such as the liquid culture in temporary immersion system and the *ex vitro* rooting and acclimatization of plants. Moreover, the attention is also directed towards the modernization of laboratory equipment and the efficient conservation of shoot cultures in slow growth storage, aimed to increase the laboratory offer of species and cultivars, as well as the improvement of productions in terms of genetic and sanitary conditions. However, such an important innovation often faces difficulties in moving outside research Institutions and reaching commercial laboratories.

Keywords: *micropropagation, fruit trees, rootstocks, liquid culture*

PLANT MICROPROPAGATION IN DESERT REHABILITATION – A SUCCESS STORY

C. Sudhersan, S. Jibi, L. Al-Sabah, J. Ashkanani and S. Al-Melhem
Biotechnology Program, Environment and Life Sciences Research Center, Kuwait Institute for Scientific Research, P.O. Box 24885, Safat 13109, KUWAIT,
e-mail: *schellan@kisr.edu.kw*

Desertification and land degradation are increasing in the arid regions due to anthropological activities and natural calamities. Many valuable native plant species are in endangered condition worldwide. Plant biodiversity conservation and large-scale reintroduction of native plants are highly important to combat desertification. Replacement of conventional methods of conservation and rehabilitation with advanced technologies like micropropagation via tissue culture method can speed-up the process. An experimental trial was conducted in Kuwait to study the effect of micropropagation technology application in conservation and desert rehabilitation. Micropropagation protocol was developed for several native plants prior to conduct the experimental trial. Two native shrubs such as: *Lycium shawii* and *Ochradenus buccatus* that are surviving under the harsh climatic conditions of Kuwait were identified as potential native plant species. Large-scale *in vitro* plant production in limited time duration through conventional means of propagation has failed due to several reasons. Therefore, micropropagation technology was identified as an alternative tool for large-scale plant production. Using the micropropagation protocol developed for these two species, large number of plants were produced, hardened them in the greenhouses and reintroduced into 5 hectares area of the selected desert sites where the natural rehabilitation trial failed. The micropropagated native shrubs planted in the desert experimental sites showed very high rate of survival and tolerance to the frequently occurring sand storms. After planting these two tissue culture derived native shrubs in thousands, soil quality of the experimental site has improved through sand deposit and organic material enrichment. A microclimate suitable for the natural plant regeneration has established and a desert vegetation having more than 120 species of native plants has been established successfully through the wind born native seeds. Results of the study confirmed the application of micropropagation technology in desert rehabilitation program much faster than the conventional methods.

Keywords: *desertification, native plants, endangered species, in vitro production, conservation, reintroduction*

СЕКЦИЯ 3.
SESSION 3.

СОЗДАНИЕ КОЛЛЕКЦИЙ РАСТЕНИЙ *IN VITRO*, МЕТОДЫ СОХРАНЕНИЯ ГЕНОФОНДА

CREATION OF *IN VITRO* PLANT COLLECTIONS, METHODS FOR GERMPLASM CONSERVATION

ВОЗМОЖНОСТИ СОЗДАНИЯ *IN VITRO* КОЛЛЕКЦИИ ИСЧЕЗАЮЩИХ ВИДОВ ЗАПАДНОЙ ГРУЗИИ

Г.Р. Верулидзе, Д.Д. Сурманидзе, Ц.В. Болквадзе
Батумский государственный университет им. Шота Руставели, г. Батуми, Грузия,
e-mail: *g.verul@gmail.com*

Территория Западной Грузии входит в перечень 34 горячих точек биологического разнообразия планеты. Её растительный мир очень богат, включает в себя более 4500 видов высших растений, из которых 380 эндемики региона. 56 видов высших растений внесены в Красную Книгу Грузии. Глобальное изменение климата оставляет след и на растительность Кавказа, на глазах меняется видовой состав уникальных биомов. Поэтому, создание *in vitro* коллекций исчезающих видов приобретает все большее значение. Работы проводились с меристемными культурами пяти видов: самшита колхидского (*Buxus colchica* Pojark.), клекачки колхидской (*Staphylea colchica* Stev.*),* земляничника мелкоплодного (*Arbutus andrachne* L.), рододендронами Смирнова (*Rhododendron smirnowii* Trautv.) и Унгерна (*Rhododendron ungernii* Trautv.). Первичные экспланты были взяты из различных экологических точек. Из этих видов только земляничник мелкоплодный имеет статус вымирающий (EN), остальные имели статус уязвимый (VU), но на фоне эпифитотии вызванной грибом *Cylindrocladium buxicola* и распространения карантинного вредителя *Cydalima perspectalis* статус самшита колхидского следует пересмотреть. Для изучаемых видов разработаны/уточнены протоколы микроразмножения, определены параметры их длительного хранения в культуре. Продолжаются наблюдения за морфо-физиологическими характеристиками культур.

Ключевые слова: *микроразмножение, длительное хранение, биоразнообразие Закавказья*

POSSIBILITY OF CREATION OF *IN VITRO* COLLECTION OF ENDANGERED SPECIES OF WESTERN GEORGIA

G.R. Verulidze, D.D. Surmanidze, Ts.V. Bolkvadze
Batumi Shota Rustaveli State University, Batumi, Georgia, e-mail: *g.verul@gmail.com*

The territory of Western Georgia is included into the list of 34 hotspots of biological diversity of our planet. Its flora is very rich; it includes more than 4500 species of higher plants, 380 from which are endemics of the region. 56 species of higher plants are included in the Red Book of Georgia. The global climate change leaves its mark on the vegetation of Caucasus; the floristic composition of unique biomes changes right in front of our eyes. Therefore, creation of *in vitro* collections of endangered species acquires the increasing importance. Works were carried out with the meristem cultures of five species: boxwood (*Buxus colchica* Pojark.), Caucasian bladder nut (*Staphylea colchica* Stev.*),* Greek strawberry tree (*Arbutus andrachne* L.), Smirnov rhododendron (*Rhododendron smirnowii* Trautv.) and Ungern's rhododendron (*Rhododendron ungernii* Trautv.). Primary explants have been taken from various ecological points. Out of these species only Greek strawberry tree has the status endangered (EN), the others have the status vulnerable (VU), however on the background of epiphytoty, caused by the fungi *Cylindrocladium buxicola* and propagation of the quarantine pest *Cydalima perspectalis* the status of boxwood should be reconsidered. Micropropagation protocols are developed/ specified for the studied species, parameters of their long-term storage in culture are determined. Observation over morpho-physiological characteristics of cultures is continued.

Key words: *micropropagation, long-term conservation, biodiversity of Transcaucasia*

КОЛЛЕКЦИЯ КУЛЬТУР ВОДОРОСЛЕЙ СИФИБР СО РАН – IRK–A

И.Н. Егорова
Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск, Россия,
e-mail: *egorova@sifibr.irk.ru*

Коллекция культур водорослей СИФИБР СО РАН – IRK–A в настоящее время включает около 300 штаммов из пяти отделов: цианопрокариота (Cyanophyta/Cyanobacteria/Cyanoprokaryota – 12 штаммов), эустигматофитовых (Eustigmatophyta – 20 штаммов), желтозеленых (Xanthophyta – 2 штамма), зеленых (Chlorophyta – 254 штамма) и стрептофитовых (Streptophyta – 12 штаммов) водорослей. По предварительным данным образцы принадлежат 65 видам, 42 родам. Коллекцию составляют водоросли, выделенные из проб различных наземных субстратов и почв, собранных на территории России, Монголии и Антарктиды. Материал из России в настоящий период включает образцы из нескольких регионов: Забайкальского края, Иркутской области, Республики Бурятия, Республики Саха (Якутия), Ленинградской области*. 23 альгологически чистых культуры зеленых водорослей получены из коллекции *LABIK Ботанического института РАН им. В.Л. Комарова (г. Санкт-Петербург). Коллекция регулярно пополняется.

Идентификация водорослей осуществлена преимущественно при помощи световой микроскопии на основе изучения особенностей морфологии и жизненного цикла. Также ведутся исследования методами трансмиссионной электронной микроскопии и молекулярной филогении.

Культуры поддерживаются в стеклянной и пластиковой посуде на агаризованной (1,0–1,8 % агар), жидкой и бифазной основной среде Болда (Bold’s basal medium; N BBM и 3N BBM) (Bischoff & Bold 1963; Groover & Bold 1969) в холодильных шкафах-витринах, оснащенных лампами Fluora. Условия выращивания: режим освещенности 16 ч – день : 8 ч – ночь; температура 10–12°C. Пересадка культур осуществляется 1-3 раза в год.

Ключевые слова: *коллекция водорослей, культуры, СИФИБР СО РАН, IRK–A*

THE CULTURE COLLECTION OF ALGAE AT THE SIBERIAN INSTITUTE OF PLANT PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY SIBERIAN BRANCH OF RUSSIAN ACADEMY OF SCIENCES – IRK–A

I.N. Egorova
Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, e-mail: *egorova@sifibr.irk.ru*

The culture collection of microalgae at the SIFIBR SB RAS included about 300 strains of algae from five divisions: Cyanophyta/Cyanobacteria/Cyanoprokaryota – 12 isolates, Eustigmatophyta – 20 isolates, Xanthophyta – 2 isolates, Chlorophyta – 254 isolates and Streptophyta – 12 isolates. According to preliminary data, collection comprises of algae from 42 genera and 65 species. Most of the algae were isolated from various samples terrestrial substrates, but there are also soils and a few water species in the collection. Samples were collected in Russia (Irkutsk region, Zabaikalskiy region, Buryatia, Yakutia, Leningrad region*), Mongolia and Antarctica. Also 23 isolates from culture collection *LABIK at the Komarov Botanical Institute of the Russian Academy of Sciences (Saint-Petersburg, Russia) are deposited in IRK–A.

The taxonomic identification of the species has been based primarily on morphology and life history. Their identification based on light microscopy studies, a number of species was studied also by transmission electron microscopy and molecular phylogeny methods.

All cultures are maintained in glass and plastic container. Monocultures are grown in Bold's Basal Medium (Bischoff & Bold 1963; Groover & Bold 1969) by regular serial transfer (1–3 times a year) and are inspected microscopically. Cultures are maintained on agar slants, also liquid media and bi-phasic media are used for those that do not grow well on agar. Material are cultivated in the climate chamber Binder (Germany) and in cold box, equipped with lamps "Fluora", at a temperature of 10–13 °C with 16:8 hours regime light: dark.

Keywords: *culture collection, algae, SIFIBR SB RAS, IRK–A*

СОХРАНЕНИЕ И ВОСПРОИЗВОДСТВО ОХРАНЯЕМЫХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ САРАТОВСКОЙ ОБЛАСТИ *IN VITRO* И ОЦЕНКА ИХ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ

Т.А. Крицкая[1], А.С. Кашин[1], Е.А. Блюднева[1], Н.В. Евсеева[2], В.А. Спивак[1]
[1]Национальный исследовательский Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского, г. Саратов, Россия, e-mail: *kritckaiata@gmail.com*
[2]Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, г. Саратов, Россия, e-mail: *evseeva@ibppm.sgu.ru*

Создана коллекция асептических культур *in vitro* 37 видов 27 родов 17 семейств покрытосеменных растений, занесённых в красные книги Саратовской области и Российской Федерации. Для каждого образца оптимизированы протоколы клонального микроразмножения и получены жизнеспособные растения-регенеранты.

Впервые получена стерильная культура *Potentilla volgarica*. Выявлено влияние различных регуляторов роста на активацию пазушных меристем исследуемого объекта. Установлено, что сочетание зеатина (0.5 мг/л) и БАП (0.1−0.25 мг/л) является оптимальным для быстрого микроразмножения эксплантов. Ризогенез отмечен на питательной среде без регуляторов роста, либо с добавлением 0.05 мг/л ИУК. Выявлен оптимальный почвенный субстрат для адаптации регенерантов к нестерильным условиям, состоящий из нейтрального садового грунта, мела, вермикулита и дренажного слоя из керамзита. Акклиматизированные растения успешно высажены в природные условия и по показателям семенной продуктивности не уступают растениям-донорам.

Разработан эффективный протокол клонального микроразмножения *Silene cretacea* – исчезающего вида с узкой экологической амплитудой, остро нуждающегося в восстановлении численности популяций и являющегося перспективным источником получения лекарственного сырья. Доказано меристематическое происхождение микропобегов и отсутствие каллусогенеза на протяжении всего времени культивирования эксплантов на указанном варианте питательной среды (патент РФ № 2552174 C1). Выявлено, что инокуляция культуры *S. cretacea* ризобактериями *Azospirillum brasilense* Sp245 оказывает значительный положительный эффект на приживаемость регенерантов *ex vitro*, повышая тем самым эффективность всего процесса клонального микроразмножения.

Методом ISSR анализа изучено генетическое разнообразие в 18 природных популяциях *Tulipa gesneriana* L. (= *T. schrenkii* Regel, *T. suaveolens* Roth) на севере Нижнего Поволжья. Десять использованных ISSR праймеров позволили выявить 102 ПЦР фрагмента, из которых 50 оказались полиморфными (49.0%). На основании данных, полученных в результате кластерного анализа по коэффициенту Жаккара и Neighbor Joining, было установлено, что исследуемые популяции объединяются в 2 основных кластера по степени генетической близости. Результаты ANOVA показали достоверные различия (F_{CT} = 0.430; p = 0.000) между этими группами. Локальные популяции генетически значительно дифференцированы друг от друга (F_{ST} = 0.632) и практически не связаны современным потоком генов, о чем свидетельствуют результаты теста Мантеля (r = – 0.118; p = 0.819). В связи с этим, отбор материала для сохранения вида *ex situ* рекомендуется производить из популяций двух контрастных групп.

Ключевые слова: *Silene cretacea, Azospirillum brasilense Sp245, Potentilla volgarica, Tulipa gesneriana, Tulipa schrenkii, генетический банк in vitro*

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ № 16-04-00142, а также Минобрнауки России в рамках базовой части государственного задания в сфере научной деятельности по Заданию № 2014/203, код проекта 1287.

IN VITRO CONSERVATION AND PROPAGATION OF RARE PLANTS OF SARATOV REGION AND EVALUATION OF THEIR GENETIC DIVERSITY

T.A. Kritskaya[1], A.S. Kashin[1], E.A. Blyudneva[1], N.V. Evseeva[2], V.A. Spivak[1]
[1]Saratov State University, Saratov, Russian Federation, e-mail: *kritckaiata@gmail.com*
[2] Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, Russian Federation, e-mail: *evseeva@ibppm.sgu.ru*

The collection of *in vitro* aseptic cultures was created comprising flowering plants (Angiospermae) of 37 species of 27 genera of 17 families in the Red List of Saratov region and the Red Data Book of the Russian Federation. A protocol for efficient clonal micropropagation of every species was established that resulted in obtaining viable regenerants.

It is the first time that the culture of *Potentilla volgarica* has been obtained. The impact of various plant-growth regulators on the development of axillary shoot buds was studied. It is established that the combination of zeatin (0.5 mg/l) and 6-benzylaminopurine (0.1−0.25 mg/l) is the best enhancer of the explants' micropropagation. Rhizogenesis is observed either on the hormone-free medium or on the medium containing IAA 0.05 mg/l. It is proved that the best substrate for *ex vitro* planting and acclimatization is the mix of neutral soil, chalk, vermiculite, and drainage layer of LECA. After *ex vitro* transfer, seed productivity of plantlets was the same as the one of donor plants.

A protocol was established for efficient clonal micropropagation of *Silene cretacea*, an endangered species with a narrow ecological amplitude that needs population boosting as it is a promising source of pharmaceutical raw materials. It is demonstrated that axillary shoots are of meristematic origin as well as that the use of the defined medium (Russian Federation Patent № 2552174 C1) does not allow for callus formation in explants. It is proved that inoculation with *Azospirillum brasilense* Sp245 rhizobacteria significantly strengthens *S. cretacea* acclimatization to *ex vitro* conditions and, thus, improves the effectiveness of clonal micropropagation of the species.

The genetic diversity of the eighteen natural populations of *Tulipa gesneriana* L. (= *T. schrenkii* Regel, *T. suaveolens* Roth) found in the north of the Lower Volga region was subject to the ISSR analysis. The utilised inter-sequence simple repeat (ISSR) primers showed 102 PCR-fragments, of which 50 were polymorphic (49.0%). The clustering analysis (UPGMA) allowed subdividing the samples into two large clusters. The unrooted tree which was built using the Neighbour Joining analysis had the similar topology. The first cluster includes the populations with the low variation of markers while the highly-variable populations comprise the second cluster. The analysis of molecular variance (ANOVA) showed the consistent differences (F_{CT} = 0.430; p = 0.000) between the two groups. The Mantel test confirmed that the local populations show significant genetic differentiation from one another (F_{ST} = 0.632) and have nearly no links via actual gene flow (r = – 0.118; p = 0.819). It is assumed that the degree of genetic proximity of populations depends on the period and peculiar features of the species introduction on this territory.

Keywords: *Silene cretacea, Azospirillum brasilense Sp245, Potentilla volgarica, Tulipa gesneriana, Tulipa schrenkii, genetic diversity, genebank in vitro*

Aknowlegment
The research for this paper was partially financed through RFBR grant № 16-04-00142 as well as supported by the Ministry of Education and Science of Russia within the framework of the basic part of the government commission in the field of research, Commission № 2014/203, project code 1287.

УСОВЕРШЕНСТВОВАННЫЕ ПРОТОКОЛЫ КРИОКОНСЕРВАЦИИ АПИКАЛЬНЫХ МЕРИСТЕМ ДЛЯ СОЗДАНИЯ КРИОБАНКА ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ РАСТЕНИЙ

С.В. Кушнаренко, Н.В. Ромаданова, Л.Н. Карашолакова, С.А. Мишустина, М.М. Аралбаева, С.Ж. Жоламанова, И.Р. Рахимбаев
Институт биологии и биотехнологии растений, г. Алматы, Казахстан,
e-mail: *svetlana_bio@mail.ru*

Усовершенствованы протоколыкриоконсервации на основе метода PVS2-витрификации для яблони, жимолости и картофеля.

Растения *in vitro* культивировали в светокультуральной комнате при температуре 24±1°С, освещенности 40 μмол $м^{-2}с^{-1}$, 16-ти часовом фотопериоде на среде Мурасиге и Скуга (МС) с различными концентрациями регуляторов роста: яблоня – на среде с 0,5 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП) и 0,01 мг/л индолилмасляной кислоты (ИМК); жимолость – 1 мг/л БАП; картофель – без регуляторов роста с добавлением 2 мг/л пантотената кальция.

Важным этапом протокола криоконсервации является закаливание пробирочных растений. Культивирование растеньиц яблони в течение трех недель при переменных в течение дня температурах (22°С, 8 час/-1°С, 16 час) значительно повышало выживаемость апикальных меристем после замораживания. Для жимолости более подходящим оказалось закаливание растений *in vitro* в течение трех недель при низких положительных температурах (4°С). В отличие от большинства плодовых и ягодных культур, для картофеля не требовалось закаливание.

Апикальные меристемы (апексы побегов) размером 1,2-1,5 мм изолировали из асептических растений и предварительно культивировали на среде МС с 0,3 М сахарозой в течение 2 суток при температуре закаливания (яблоня и жимолость) или в течение 1 суток при температуре 24°С (картофель). Апексы побегов картофеля и жимолости погружали в раствор 2 М глицерина с 0,4 М сахарозой на 20 мин. Затем все культуры обрабатывали рас твором криопротектора PVS2, при этом для яблони и жимолости наиболее эффективна обработка охлажденным до 0°С криопротектором в течение 80 мин; для картофеля оптимальна длительность обработки криопротектором 30 мин при комнатной температуре.

Криопробирки с апексами побегов в растворе криопротектора погружали в жидкий азот. Выживаемость апикальных меристем после криоконсервации и регенерация из них побегов составляла для яблони 60-80%, для жимолости 40-76%, для картофеля 43-67%.

Разработанные протоколы криоконсервации апикальных меристем используются для создания криогенного банка сортов, гибридов, дикорастущих форм яблони, жимолости и картофеля.

Ключевые слова: *криоконсервация, метод PVS2-витрификации, криобанк*

IMPROVING SHOOT TIP CRYOPRESERVATION PROTOCOLS TO DEVELOPING A CRYOGENIC BANK FOR PLANT GENETIC RESOURCES

S.V. Кushnarenko, N.V. Romadanova, L.N. Кarasholakova, S.A. Mishustina, M.M. Aralbaeva, S.Zh. Zholamanova, I.R. Rakhimbaev
Institute of Plant Biology and Biotechnology, Almaty, Republic of Kazakhstan
e-mail: *svetlana_bio@mail.ru*

The cryopreservation protocols based on PVS2-vitification technique have been improved for some cultures: apple, potato and honeysuckle.
In vitro plantlets were cultured in plant growth room at 24±1°C with a 16 h light/8 h dark photoperiod, light intensity of 40 µmol $m^{-2}s^{-1}$ on Murashige and Skoog (MS) medium with various phytohormone concentrations: apple – 0.5 mg/l, N^6-benzylaminopurine (BAP) and 0.01 mg/l indole-3-butyric acid (IBA); honeysuckle – 1 mg/l BAP; potato – no growth regulators with 2 mg/l calcium pantothenate.

The important step of the cryopreservation protocol is cold acclimation of *in vitro* plantlets. Three weeks of apple plantlets cold acclimation at alternating temperatures (22°C, 8 hours/-1°C, 16 h) significantly increased shoot tips survival after freezing. Cold acclimation at constant temperature (4°C) for three weeks was more appropriate for honeysuckle. Unlike the most fruit and berry crops,cold hardening was not required for potato.

Shoot tips (1.2 to 1.5 mm) were dissected from aseptic plantlets and precultured on MS medium with 0.3 M sucrose for 2 days at cold acclimation temperatures(apple and honeysuckle) or for 1 day at 24°C (potato). Shoot tips of potato and honeysuckle were loaded in 2 M glycerol with 0.4 M sucrose for 20 min. Then all cultures were treated with PVS2 cryoprotectant: the most efficient treatment for apple and honeysuckle was 80 min at 0°C; for potato, the optimal duration of PVS2 treatment was 30 min at room temperature.

The cryovials with shoot tips in cryoprotectant solution were immersed in liquid nitrogen. Shoot tips survival and shoot regrowth following cryopreservation reached for apple 60-80%; for honeysuckle40-76%, for potato 43-67%.

The elaborated protocols of shoot tips cryopreservation are used to developing a cryogenic bank for cultivars, hybrids, wild forms of apple, honeysuckleand potato.

Keywords: *cryopreservation, PVS2 vitrification technique, cryobank*

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ И КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ ДАЛЬНЕВОСТОЧНЫХ ВИДОВ РОДА *ACTINIDIA* LINDL.

Е.В. Малаева[1], Л.Н. Коновалова[2]
[1]ГБУ ВО «Волгоградский региональный ботанический сад», г. Волгоград, Россия,
e-mail: *e.malaeva@mail.ru*
[2] ФГБУН Главный ботанический сад им. Н.В.Цицина РАН, г. Москва, Россия,
e-mail: *new_tech@mail.ru*

Представлены основные этапы формирования и перспективы дальнейшей работы с уникальной коллекцией дальневосточных видов актинидии *Actinidia* Lindley. На основе трехлетних исследований показано, что дальневосточные виды актинидии успешно интродуцированы в засушливых условиях Нижней Волги. Наряду с традиционными методами сохранения растений *ex situ* применение культуры изолированных тканей и органов становится все более и более актуальным.

Цель наших исследований - совершенствование технологии клонального микроразмножения, изучение морфогенетических процессов и создание банка *in vitro* дальневосточных видов актинидии.

Объектами исследования были представители рода *Actinidia* – *A. kolomikta* (Rupr. et Maxim.) Maxim., *A. arguta* Planch. и *A. polygama* (Siebold et Zucc.) Maxim.

Методы исследования основывались на классических приемах работы с культурами изолированных тканей и органов растений.

В результате установлено, что разработка эффективных методов устойчивого воспроизводства растений является основой работ по сохранению генофонда. На основе массового скрининга разработаны высокоэффективные технологии клонального микроразмножения представителей рода *Actinidia*. Хранение *in vitro* ценных форм растений является основным способом для содержания коллекций растений и сохранения биологического разнообразия. Подобраны оптимальные условия для длительного хранения. Установлены оптимальные условия хранения меристем представителей рода *Actinidia* в генетическом банке культур *in vitro* (t = 5-7^{0}C). Установлены важнейшие факторы, влияюшие на длительность сохранения в условиях *in vitro*.

Ключевые слова: *актинидия, коллекция, интродукция, клональное микроразмножение, сохранение биоразнооб разия in vitro*

BIOLOGICAL PECULIARITIES AND CLONAL MICROPROPAGATION OF FAR EASTERN SPECIES OF THE GENUS *ACTINIDIA* LINDL.

E.V. Malaeva[1], L.N. Konovalova[2]
[1]Volgograd Regional Botanical Garden, Volgograd,Russia, e-mail: *e.malaeva@mail.ru*
[2]Main Botanical Garden named after N.V. Tsitsin of RAS, Moscow, Russia,
e-mail: *new_tech@mail.ru*

This research presents the main stages of the definition and the prospects of further work with the unique collection of selected forms of Far Eastern species of *Actinidia* Lindley. On the basis of three years investigations it is shown that Far Eastern species of *Actinidia* Lindley have been successfully introduced in arid condition of lower Volga region. Alongside with the traditional methods of plant preservation ex situ the application of isolated tissue and organ cultures is becoming more and more actual.

The purpose of our research is to improve the clonal micropropagation technology, to study the morphogenetic processes in the course of propagation and to create the bank and of in vitro cultures of Far Eastern species of *Actinidia* Lindley.

The objects of our research were *Actinidia* – *A. kolomikta* (Rupr. et Maxim.) Maxim., *A. arguta* Planch. и *A. polygama* (Siebold et Zucc.) Maxim.

Our research methods are based on the classical ways of working with cultures of isolated organs and tissues of plants.

In the result it has been found out that the development of effective methods for sustainable reproduction of plants is the basis of the work on preserving the plant gene bank. Based on mass screeninghighly efficient technologies of clonal micropropagation of various taxonomic group of *Actinidia* have been developed. Storage *in vitro* of valuable plant forms is a highly efficient way for maintening plant collections and conservation of plant biodiversity. Optimal conditions for long-term storage of the genus *Actinidia* meristems in gene bank cultures in vitro (t = 5-7^{0}C) have been found. The critical factors affecting the duration of preservation conditions in vitro have been determined.

Keywords: *collection, Actinidia, introduction, selection, clonal micropropagation, conservation of plant biodiversity*

ОСОБЕННОСТИ РАЗМНОЖЕНИЯ И СОХРАНЕНИЯ КОЛЛЕКЦИИ ЭКОНОМИЧЕСКИ ВАЖНЫХ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

О.И. Молканова, О.Г. Васильева, Л.Н. Коновалова, Т.С. Стахеева, И.Л. Крахмалева
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина Российской академии наук, г. Москва, Россия,
e-mail: *molkanova@mail.ru*

Сохранение биоразнообразия растений – одна из актуальных задач ботанических садов. Разработка эффективных методов устойчивого воспроизводства растений с применением культуры изолированных тканей и органов является основой работ по сохранению генофонда.

Разработаны высокоэффективные технологии клонального микроразмножения растений различных таксономических групп для более 1300 генотипов, 150 видов, 59 семейств. На основе этих исследований создана крупнейшая в России коллекция *in vitro* ценных видов и сортов растений. Особое внимание уделяется применению биотехнологических методов для сохранения экономически важных растений. Наиболее представительными в банке меристем являются семейства: Actinidiaceae, Asteraceae, Caprifoliaceae, Ericaceae, Liliaceae, Oleaceae, Rosaceae.

В настоящее время разрабатываются технологии клонального микроразмножения ценных лекарственных растений: *Chamerion angustifolium* L. var. *alba, Potentilla alba* L., *Codonopsis lanceolata* Benth.

Коллекция растений *in vitro* используется для изучения морфогенетических и регенерационных процессов у эксплантов. Определены условия и питательные среды для всех этапов микроразмножения и показано, что для устойчивого воспроизводства растений можно использовать индукцию множественного побегообразования или микрочеренкование побегов.

При культивировании представителей родов *Actinidia, Clematis, Rosa*, *Rubus* положительный эффект получен при изменении источника углеводного питания - сахарозы на глюкозу.

Подобраны оптимальные условия и определены оптимальные типы эксплантов различных жизненных форм растений для длительного хранения *in vitro* (3-7^{0}C). Установлены важнейшие факторы, влияюшие на длительность сохранения в условиях *in vitro*: осмотики, ретарданты и физические факторы культивирования - температура и освещенность.

Первостепенное значение при создании генетического банка in vitro уделяется репрезентативности и сохранению генетической чистоты. Основной критерий оценки депонирования – жизнеспособность эксплантов и их последующая регенерационная способность.

Показана возможность длительного сохранения в культуре *in vitro* коллекции ценных генотипов.

Ключевые слова: *биологическое разнообразие, культура клеток и тканей, органогенез, банк in vitro.*

PECULIARITIES OF PROPAGATION AND CONSERVATION OF COLLECTIONS OF ECONOMICALLY IMPORTANT PLANTS *IN VITRO*

O.I. Molkanova, O.G. Vasilyeva, L.N. Konovalova, T.S. Staheeva, I.L. Krakhmalyova
Federal State Institution of Science Botanical Garden. named after N.V. Tsitsin of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, e-mail: *molkanova@mail.ru*

Conservation of plants biodiversity is one of the most actual problem of botanical gardens. The development of sustainable reproduction plants with application of isolated tissue and organ cultures to constitute the basis for the work on preserving the plant gene bank.

The highly efficient technologies of clonal micropropagation of various taxonomic group of plants have been elaborated and improved for more than 1300 plant genotypes attributed to 150 genera and 59 families. On the basis of these researches the largest in Russia genepoll collection *in vitro* of valuable species and cultivars plants was created.

Application of biotechnological methods for preservation of rare plant species the special attention is given. Actinidiaceae, Asteraceae, Caprifoliaceae, Ericaceae, Liliaceae, Oleaceae, Rosaceae families are the most representative in bank *in vitro.*

Currently developed technologies of clonal micropropagation of valuable medicinal plants: *Chamerion angustifolium* L. *var. alba, Potentilla alba* L.*, Codonopsis lanceolata* Benth.

The collection of plants *in vitro* are used for studying of regeneration and morphogenetic processed in explants. .

The conditions and nutrient medium for all stages of micropropagation were identified. It was shown that for sustainable reproduction plants can be used the induction of multiple shoot formation or microcutting of shoots.

When cultured representatives of the genera *Actinidia, Clematis, Rosa, Rubus* positive effect was obtained due to the change in source of carbohydrate nutrition-of sucrose on fructose.

The optimum storage conditions, determined the optimal types of explants for different life forms of plants for conservation *in vitro* for 3-7^{0}C. The major factors influencing on duration of explants of plants in condition *in vitro* were established: retardants, osmotic and physical factors of cultivation, temperature and light intensity.

At creation of gene bank *in vitro* primary importance is given to representative and preservation of genetic stability. The main criterion for assessment of evaluation during conservation is explants viability and their next regeneration ability.

The possibility of long-term preservation *in vitro* of collection of valuable genotypes was shown.

Keywords: *biodiversity, cell and tissue culture, organogenesis, in vitro bank*

СОЗДАНИЕ КОЛЛЕКЦИЙ *IN VITRO* РЕДКИХ И ЭНДЕМИЧНЫХ ВИДОВ РОДА *FRITILLARIA* L.

Д.С. Мурасева, Т.И. Новикова
ФГБУН Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения РАН,
г. Новосибирск,Россия, e-mail: *dsmuraseva@csbg.nsc.ru*

Традиционная стратегия по сохранению биоразнообразия *ex situ* в последние годы успешно дополняется современными методами биотехнологии для сохранения исчезающих видов растений в коллекциях *in vitro*. Биотехнологический подход обладает рядом преимуществ, при этом одним из наиболее значимых является возможность получения стерильных культур редких и эндемичных видов без изъятия из природных местообитаний, что позволяет предотвратить разрушение фитоценозов.

Цель настоящего исследования – разработать эффективные системы клонального микроразмножения редких и эндемичных представителей рода *Fritillaria* и на их основе создать коллекцию рябчиков *in vitro.*

Объектами исследования послужили редкие и эндемичные виды рода *Fritillaria* (сем. Liliaceae): *F. camschatcensis* (L.) Ker Gawl., *F. dagana* Turcz. ex Trautv., *F. meleagris* L., *F. meleagroides* Patrin ex Schult. & Schult. f., *F. ruthenica* Wikstr., *F. sonnikovae* Schaulo et A. Erst.

В качестве первичных эксплантов использовали стерильные сегменты луковичных чешуй размером 5×5 мм. Культивирование проводили на агаризованных питательных средах по прописи B_5 (Gamborg, Eveleigh, 1968) и BDS (Dunstan, Short, 1977), дополненных регуляторами роста (БАП, ТДЗ, НУК, ИУК).

Использование питательных сред, дополненных 5 мкМ БАП и 2 мкМ НУК, на этапе индукции регенерации приводило к развитию в среднем 2,0-3,6 адвентивных луковичек на эксплант, при этом наибольший морфогенный потенциал характерен для *F. dagana* и *F. sonnikovae.* На этапе собственно размножения установлены генотипические различия исследуемых видов в ответ на использованные комбинации минеральной основы сред и регуляторов роста. Так, применение среды B_5 и низких концентраций цитокининов (0,1 мкМ) было оптимально для *F. camschatcensis* и *F. dagana* и позволило получить до 5,0±1,5 побегов на эксплант. Для активации побегообразования у других исследуемых видов эффективным было сочетание цитокининов и ауксинов. Комбинация среды B_5, дополненной 5 мкМ БАП и 2 мкМ НУК была эффективна для *F. ruthenica*, а среды BDS и той же комбинации регуляторов роста – для *F. sonnikovae*. Внесение в питательную среду B_5 0,4 мкМ БАП в сочетании с 3,2 мкМ НУК и 2,3 мкМ ИУК стимулировало регенерацию *F. meleagris* и *F. meleagroides*.

В результате разработанных систем клонального микроразмножения коллекция *in vitro* лаборатории биотехнологии ЦСБС СО РАН пополнилась 6 редкими и эндемичными видами рода *Fritillaria*.

Полученные культуры поддерживаются в условиях активного роста при температуре 23±2ºС и фотопериоде, а также в условиях замедленного роста при температуре 7ºС и фотопериоде, на средах ½BDS или ½B_5, содержащих 30,0 г/л сахарозы и активированный уголь, что позволяет пролонгировать беспересадочный период культивирования до 9-12 месяцев.

Ключевые слова: *Fritillaria, редкие и эндемичные виды, луковичные чешуи, коллекция in vitro*

CREATION OF *IN VITRO* COLLECTION OF RARE AND ENDEMIC SPICIES OF THE GENUS *FRITILLARIA* L.

D.S. Muraseva, T.I. Novikova
FSIS Central Siberian Botanical Garden, Siberian Branch RAS, Russia, Novosibirsk
e-mail: *dsmuraseva@csbg.nsc.ru*

Recently the traditional strategy for *ex situ* conservation of biodiversity was successfully complemented by modern biotechnology methods for the conservation of endangered species of plants in *in vitro* collections. Biotechnological approaches have several advantages, the most attractive of them is the possibility of obtaining sterile cultures of rare and endemic species without their isolation from natural habitats, that helps to prevent the destruction of phytocenoses.

The aim of present study was to develop the effective systems of clonal micropropagation of rare and endemic species of the genus *Fritillaria* and to create *in vitro* collection.

The objects of the study were rare and endemic species of the genus *Fritillaria* (fam. Liliaceae.): *F. camschatcensis* (L.) Ker Gawl., *F. dagana* Turcz. ex Trautv., *F. meleagris* L., *F. meleagroides* Patrin ex Schult. & Schult. f., *F. ruthenica* Wikstr., *F. sonnikovae* Schaulo et A. Erst.

The sterile segments of bulb scales (size of 5×5 mm) were used as primary explants. The cultivation was carried out on agar-nutrient media B_5 (Gamborg, Eveleigh, 1968) and BDS (Dunstan, Short, 1977), supplemented with plant growth regulators (BAP, TDZ, NAA, IAA).

Use of nutrient media supplemented with 5 μM BAP and 2 μM NAA led to development on average of 2.0-3.6 adventives bulblets per explants at the stage of induction of regeneration. The highest morphogenic potential was revealed for *F. dagana* and *F. sonnikovae* had. The genotypic differences of studied species in response to combination of mineral base and plant growth regulators of medium were established at the stage of propagation. The use of B_5 medium and low concentration of cytokinins (0.1 μm) was optimal for *F. camschatcensis* and *F. dagana* and allowed to obtain up to 5.0±1.5 shoots per explant. For activation of adventitious shoot formation in other studied species, the combinations of cytokinins and auxins were effective. The combination 5 μM BAP and 2 μM NAA with B_5 medium was effective for *F. ruthenica*, and BDS medium with the same combination of plant growth regulators – for *F. sonnikovae.* Regeneration of *F. meleagris* and *F. meleagroides* was stimulated on B_5 medium supplemented with 0.4 μM BAP with 3.2 μM NAA and 2.3 μM IAA.

As a result the clonal micropropagation systems were developed and *in vitro* collection of the laboratory of biotechnology of CSBG SB RAS was supplemented by 6 rare and endemic species of the genus *Fritillaria*.

The cultures obtained are maintained under conditions of active growth at 23±2ºC and photoperiod, as well as under conditions of slow growth at 7ºC and photoperiod on ½BDS or ½B_5 media containing 30.0 g/l sucrose and activated carbon that allowed to prolong the stage of cultivation up to 9-12 months.

Keywords: *Fritillaria, rare and endemic species, bulb scales, in vitro collection*

КОЛЛЕКЦИЯ *IN VITRO* И БАНК ДНК РЕДКИХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ В ЦЕНТРАЛЬНОМ БОТАНИЧЕСКОМ САДУ НАН БЕЛАРУСИ

Е.В. Спиридович, Т.И. Фоменко, А.Б. Власова, И.Ф. Вайновская, А.Н. Юхимук, В.Н. Решетников
ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси», г. Минск, Беларусь,
e-mail: *E.Spiridovich@cbg.org.by*

Основной целью глобальной и европейской стратегий сохранения растений (*https://www.cbd.int/gspc/*; *www.plantaeuropa.org*) является приостановление темпа продолжающегося процесса утраты биоразнообразия растений. Руководствуясь данными стратегиями, а также в рамках глобальных усилий по прекращению утраты биоразнообразия к 2020 году и конвенции о биологическом разнообразии (КБР 1992; Glawka et al. 1994) ботанические сады определены как приоритетные объекты по *ex situ* и *in vitro* сохранению редких и исчезающих видов растений (Sharrock and Jones, 2009). За последнее столетие на территории Беларуси исчезло около 70 аборигенных видов растений. В отделе биохимии и биотехнологии растений ЦБС создана *in vitro* коллекция редких и эндемичных видов растений дикорастущей флоры стран СНГ на основе природных источников и существующих *in vitro* коллекций этих стран. Коллекция переназначена для сохранения биоразнообразия, реинтродукции и разработки подходов промышленного использования ценных лекарственных растений. На сегодняшний момент в состав этой коллекции входят образцы 46 видов из 34 родов 16 семейств покрытосеменных и споровых растений. Для пополнения коллекции регулярно осуществляются экспедиции по особо охраняемым природным территориям (ООПТ) Беларуси, проводится генетический мониторинг исследуемых популяций. В настоящее время он осуществлен для следующих локальных белорусских популяций редких растений, занесенных в Красную РБ: *Isoëtes lacustris* L., *Salvinia natans* (L.) All., *Trapa natans* L.), *Osmunda regalis* L.), *Dactylorhiza fuchsii* (Druce) Soo., *Dactylorhiza incarnata* (L.) Soo., *Dactylorhiza ochroleuca* (Wustn. ex Boll.) Holub, (*Gymnadenia conopsea* (L.) R.Br.) и др. Для этих растений создан банк ДНК, который призван решать задачи в области сохранения и изучения биоразнообразия флоры с использованием современных молекулярных методов. В рамках международного обмена в коллекцию привлечены образцы редких и охраняемых растений из коллекций асептических культур различных учреждений РФ: *Dioscorea nipponica* Makino, *Hedysarum razoumovianum* DC, *Actinidia arguta* (Siebold & Zucc.) Planch. ex Miq., *Actinidia kolomikta* (Rupr. & Maxim.) Maxim., *Drosera rotundifolia* L., *Chrysanthemum zawadskii* Herbich — Волгоградский региональный ботанический сад; *Ficus carica* L. cv Blanche, mg/l *Cardiocrinum cordatum* (Thunb.) Makino — Ботанический институт имени В.Л. Комарова РАН (Санкт-Петербург), *Tribulus terrestris* — Института физиологии растений РАН (ИФР РАН). В рамках сотрудничества с ботаническим садом Мичиганского Университета (MBGNA) привлекаются редкие исторические сорта мировой селекции рода *Paeonia*, которые наряду с глобально исчезающими видами рода из коллекции ЦБС (*P. tenuifolia* L., *P. daurica* subsp. *mlokosewitschii* (Lomakin) D.Y.Hong, *P. anomala* L. *P. lactiflora* Pall.) вовлечены в исследование генетического разнообразия и родственности таксонов рода *Paeonia*.. Образцы коллекции документированы в системе EURISCO. Совместно с ИФР РАН разработаны правила предоставления доступа и передачи депонированных растительных объектов коллекции *in vitro*. Создана электронная база данных изучаемой коллекции, представленная в интернет-ресурсе ЦБС в информационно-поисковой системе Hortus Botanicus Centralis-Info (*http://hbc.bas-net.by/hbcinfo*).

Ключевые слова: *коллекция in vitro, редкие и эндемичные виды растений, документирование, депонирование*

IN VITRO COLLECTION AND DNA BANK OF PLANT ENDANGERED SPECIES IN THE CENTRAL BOTANICAL GARDENS OF NAS OF BELARUS

E.V. Spiridovich, T.I. Fomenko, N.B. Vlasava, I.F. Vaynovskaya, A.N. Yukhimuk, V.N. Reshetnikov
SSI «Central Botanical Gardens of NAS of Belarus», Minsk, Belarus,
e-mail: *E.Spiridovich@cbg.org.by*

In the frame of global efforts to halt the loss of biodiversity by 2020, the Convention on Biological Diversity (CBD 1992; Glawka et al. 1994), Global and European Strategies for Plant Conservation (GSPC, ESPC, available at *https://www.cbd.int/gspc/*; *www.plantaeuropa.org*) have prioritized the *in situ* conservation of rare and threatened plant species and their back up by *ex situ* and *in vitro* conservation in botanic gardens (Sharrock and Jones, 2009). The main goal is to stop the ongoing process of plant biodiversity loss.

Nearly 70 native species of wild flora have been lost over the last century on the territory of Belarus. *In vitro* collection of endangered and endemic plant species of wild flora of the CIS (Community of Independent States) was created on the basis of natural resources and existing *in vitro* collections of this countries aimed at biodiversity conservation, reintroduction and development of industrial approaches of medicinal plant use.

At the present *in vitro* collection of endangered and endemic plant species includes samples of 46 species from 34 genera and 16 families of angiosperms spore plants. Expeditions to protected areas (PA) of Belarus are carried out regularly to replenish the collection, genetic monitoring of populations of the number of studied species was conducted. Monitoring is currently done for the following local populations of endangered plants listed in the Red Book of Belarus: *Isoëtes lacustris* L., *Salvinia natans* (L.) All., *Trapa natans* L.; *Osmunda regalis* L. *Dactylorhiza fuchsii* (Druce) Soo., *Dactylorhiza incarnata* (L.) Soo., *Dactylorhiza ochroleuca* (Wustn. ex Boll.) Holub, *Gymnadenia conopsea* (L.) R.Br. and others. DNA banking was established for these plants, which is designed to solve problems of plant conservation and study flora biodiversity using modern molecular methods. Within the framework of international exchange samples of endangered and endemic plants from the aseptic collections of various Russian Institutes were brought the belarus collection: *Dioscorea nipponica* Makino, *Hedysarum razoumovianum* DC, *Actinidia arguta* (Siebold & Zucc) Planch ex Miq., *Actinidia kolomikta* (Rupr & Maxim) Maxim, *Drosera rotundifolia* L., *Chrysanthemum zawadskii* Herbich. -Volgogradsky regional Botanic garden, Volgograd, *Ficus carica* L. cv Blanche, *Cardiocrinum cordatum* (Thunb) Makino. - Botanical Institute of Komarov, RAS, St. Petersburg. As a result of cooperation with MBGNA of the University of Michigan rare historical cultivars of world selection of *Paeonia* genus were engaged, which, along with the globally endangered species of the genus from CBG collection (*P. tenuifolia* L., *P. daurica* subsp. *Mlokosewitschii* (Lomakin) DYHong, *P. anomala* L., *P. lactiflora* Pall.) are involved in the study of genetic diversity and relationships berween Paeonia genus taxa.

Collection accessions are documented according EURISCO. Together with the Institute of Plant Physiology Russian Academy of Science the rules for granting access and transfer of the deposited plant samples of *in vitro* collection were developed. An electronic database of collection was created and presented in the web-resource of CBG Hortus Botanicus Centralis-Info (*http://hbc.bas-net.by/hbcinfo*).

Keywords: *collection in vitro, rare and endemic species of plants, documentation, deposition*

РЕГЕНЕРАЦИЯ РАСТЕНИЙ МАЛИНЫ И ЧЁРНОЙ СМОРОДИНЫ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ДЛИТЕЛЬНОСТИ КРИОСОХРАНЕНИЯ МЕРИСТЕМАТИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ В ЖИДКОМ АЗОТЕ

Т.Т. Турдиев, И.Ю. Ковальчук, С.Н. Фролов
РГП «Институт биологии и биотехнологии растений» КН МОН РК, г. Алматы, Казахстан, e-mail: *turdievtt@mail.ru*

Криосохранение в жидком азоте апикальных побегов с меристематической зоной малины (*Rubus idaeus* L.) и чёрной смородины (*Ribes nigrum* L.) проводится в несколько этапов: изоляция побегов *in vitro*, клональное микроразмножение, замораживание, регенерация и ризогенез на питательных средах и пересадка растений в не стерильные условия закрытого грунта.

Изучали влияние длительности криосохранения меристематических тканей нескольких сортов и гибридов на регенерацию целых растений в культуре *in vitro* и восстановление роста и развития *in vivo*. Восстановление развития криосохраненных меристем черной смородины эффективно проводить на питательной среде: МС со сниженной концентрацией нитратов от исходной до 30%, - RIB среда, 20 г/л глюкозы; 0,1 мг/л БАП; 0,2 мг/л ГК; малину на среде МС, содержащей удвоенное количество хелата железа - 10 мг/л, 0,5 мг/л БАП, 0,1 мг/л ИМК, 30 г/л сахарозы.

В результате при размораживании меристем черной смородины сорта Оджебин, замороженных методом инкапсуляции-дегидратации через 15 минут жизнеспособность составила 72,2%, через год 72,5%. Малины сорта Моросейка – 66,6% и 62,5% соответственно. Жизнеспособность меристем, замороженных методом витрификации у черной смородины сортов Оджебин, Минай Шмырев и гибрида 4-44-81 через 15 минут составила от 75,0% до 80,0%, через год от 75,0% до 80,0% в зависимости от генотипа. При размораживании меристем малины сортов Моросейка, Кокинская, Бабье Лето и гибридов К-10-12, 12-4 через 15 минут составила от 40,0% до 66,6%, через год – 45,0-62,5%.

Полностью восстановленные в культуре *in vitro* растения, пересаживали на питательные среды для корнеобразования. Через две недели не зависимо от длительности криосохранения на среде ½МС без гормонов с предварительным замачиванием микропобегов в 25 мг/л ИМК в течение 16 часов у растений от 86,7% до 96,6% появились первые корни, которые через четыре недели достигли достаточной длины, для пересадки в условия *in vivo*. Приживаемость в стерилизованном путём автоклавирования субстрате (торф верховой, торф низинный, песок, мука известняковая (доломитовая), дренаж керамзитовый, комплексное минеральное удобрение и pH – 5,5-6,5) растений черной смородины, размороженных через 15 минут, составила 82,5%, через год 89,2%, малины – 90,0% и 96,7% соответственно. Дальнейший рост и развитие растений (высота и толщина стебля, размер, количество листьев, плодоношение, созревания плодов и вкусовые качества ягод) в условиях *in vivo,* были одинаковы не зависимо от длительности криоконсервации.

Представленные данные показывают, что продолжительность криосохранения в жидком азоте от 15 минут до 1 года не влияет на регенерационную способность меристем и образование корней, а также на рост и развитие растений в условиях *in vivo* и *ex situ*.

Ключевые слова: *черная смородина, малина, криоконсервация, жизнеспособность, меристема*

REGENERATION OF RASPBERRY AND BLACKCURRANT PLANTS DEPENDING ON THE DURATION OF THE CRYOPRESERVATION OF MERISTEMATIC TISSUES IN LIQUID NITROGEN

T.T. Turdiyev, I.Y. Kovalchuk, S.N. Frolov
RSE «Institute of plant biology and biotechnology» SCMESRK. Almaty, Kazakhstan,
e-mail: *turdievtt@mail.ru*

Cryopreservation of apical shoots with meristematic zone of raspberry (*Rubus idaeus* L.) and black currant (*Ribes nigrum* L.) in liquid nitrogen is carried out in several stages: *in vitro* shoot isolation, micropropagation, freezing, regeneration and rhizogenesis on nutrient media and transplanting plants into non-sterile greenhouse conditions.

The effect of cryopreservation duration of meristematic tissues of several cultivars and hybrids on the regeneration of whole *in vitro* plants, also growth recovery and *in vivo* development was studied. Development recovery of cryopreserved meristems of black currant is performed efficiently on a nutrient medium: MS with reduced concentration of nitrates from initial to 30%, – RIB medium, 20 g/l glucose; 0.1 mg/l BAP; 0.2 mg/l GA; and the raspberry on MS medium containing doubled amount of ferric chelate – 10 mg/l, 0.5 mg/l BAP, 0.1 mg/l IBA, 30 g/l sucrose.

As a result, during thawing of black currant meristems for Odzhebin cultivar frozen by encapsulation-dehydration method the viability after 15 minutes was 72.2% and a year later it was 72.5%. For Moroseyka cultivar of raspberry the viability was 66.6% and 62.5% respectively. The viability of meristems frozen by vitrification method for Odzhebin, Minay Shmyrev cultivars of black currant and hybrid 4-44-81 after 15 minutes ranged from 75.0% to 80.0%, and a year later from 75.0% to 80.0% depending on the genotype. During thawing of raspberry meristems for Moroseyka, Kokinskaya, Babye Leto cultivars and hybrid K-10-12, 12-4 the viability after 15 minutes ranged from 40.0% to 66.6%, a year later – 45.0-62.5%.

Fully recovered *in vitro* plants were transplanted to nutrient medium for rooting. After two weeks, not depending on the cryopreservation duration on ½MS medium without hormones with presoaking of microshoots in 25 mg/l IBA for 16 hours the plants had first roots from 86.7% to 96.6% that reached a sufficient length for *in vivo* transplanting after four weeks. Survival rate in substrate sterilized by autoclaving (highland peat, lowland peat, sand, limestone meal (dolomitic),ceramsite drainage, complex mineral fertilizer and pH – 5.5-6.5) for black currant plants thawed after 15 minutes was 82.5%, a year later – 89.2%, for raspberry – 90.0% and 96.7%, respectively. Further growth and development of *in vivo* plants (height and thickness of stem, size, number of leaves, fruiting, ripening and palatability traits of berries) were the same not depending on the cryopreservation duration.

These data show that the cryopreservation duration in liquid nitrogen from 15 minutes to one year does not affect the regeneration ability of meristems and root formation, also the growth and development of *in vivo* and *ex situ* plants.

Keywords: *black currant, raspberry, cryopreservation, viability, meristem*

СОХРАНЕНИЕ И РАЦИОНАЛЬНОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕНОФОНДА ЯГОДНЫХ КУЛЬТУР *ERICACEAE* JUSS. В АСЕПТИЧЕСКОЙ КОЛЛЕКЦИИ РАСТЕНИЙ ОТДЕЛА БИОХИМИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ РАСТЕНИЙ ЦЕНТРАЛЬНОГО БОТАНИЧСЕКОГО САДА НАН БЕЛАРУСИ

В.Л. Филипеня, О.В. Чижик
Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси, г. Минск, Беларусь, e-mail: *veronika_filipenia@yahoo.com*

Ягодные растения сем. Брусничные (*Ericaceae* Juss.), как дикорастущие, так и культурные интродуцированные сорта, благодаря их уникальному составу активно действующих веществ, представляют большой научный и практический интерес. В течение нескольких десятилетий в Центральном ботаническом саду НАН Беларуси (ЦБС) целенаправленно проводятся работы по интродукции и промышленному освоению перспективных сортов, и к настоящему времени собран ценный генофонд растений этого семейства, накоплен большой опыт их возделывания.

Начиная с 1998 г. в отделе биохимии и биотехнологии растений ЦБС осуществляются работы по созданию асептической коллекции ценных таксонов ягодных растений сем. Брусничные. Одной из основных задач, которую мы ставили при формировании коллекции, является поддержание жизнеспособности, генетической целостности и качества образцов, а также обеспечение возможности их использования в научных и хозяйственных целях.

Исследования проводили по следующим направлениям:

разработка требований к исходному материалу и подбор первичных эксплантов;

определение оптимальных условий получения культур с высоким морфогенетическим потенциалом, а также условий клонирования и адвентивного корнеобразования *in vitro;*

исследование морфогенетического потенциала культивируемых тканей и определение факторов, влияющих на его реализацию, направленное управление морфогенезом *in vitro*;

изучение витрификации, сомаклональных вариаций и других изменений роста и развития растений *in vitro*, а также факторов, обуславливающих их возникновение;

сохранение образцов коллекции в виде медленно растущих культур;

генетическая сертификация образцов с целью идентификации генотипа, однородности материала при клонировании.

Уставлено следующее. Растения, относящиеся к разным видам сем. Брусничные в культуре *in vitro* показывают разный морфогенетический потенциал. Однако для всех исследуемых растений оптимальным типом первичного эксплантa являются черенки активно растущих однолетних побегов, содержащие 2-3 метамера, оптимальной средой на всех стадиях культивирования - среда WPM. При клонировании необходимо использовать в качестве цитокинина 2иП, в качестве ауксина - ИУК в определенных для каждого вида концентрациях. Применение этих регуляторов роста по сравнению с зеатином позволяет значительно снизить вероятность витрификации и сомаклональных вариаций. Сохранение растений изучаемого семейства в условиях замедленного роста предподчительно проводить путем добавления в среды культивирования 3-6% маннита.

В настоящее время в асептической коллекции ягодных культур сем. Брусничные отдела поддерживается 56 таксонов, из них 44 сорта голубики высокой (*Vaccinium corymbosum* L.), 6 сортов брусники обыкновенной (*Vaccinium vitis-idaea* L.), 5 сортов клюквы крупноплодной (*Vaccinium macrocarpon* Ait.), 1 сорт толокнянки обыкновенной (*Arctostaphylos uva-ursi (L.) Spreng.*). Коллекция постоянно пополняется новыми перспективными образцами.

Ключевые слова: *ягодные культуры, Ericaceae Juss., in vitro коллекция, морфогенез in vitro*

CONSERVATION AND SUSTAINABLE MANAGEMENT OF THE GENETIC RESOURCES OF *ERICACEAE* JUSS. SMALL-FRUIT CROPS IN PLANT ASEPTIC COLLECTION OF THE CENTRAL BOTANICAL GARDENS OF NAS BELARUS DEPARTMENT OF PLANT BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY

V.L. Filipenia, O.V. Chizhik
Central Botanical Gardens of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus,
e-mail: *veronika_filipenia@yahoo.com*

Small fruit plants of the family *Ericaceae* Juss., both wild and introduced cultivars, are of great scientific and practical interest due to their unique composition of active substances. For several decades purposeful work on the introduction and commercial development of perspective cultivars of this family are conducted at the Central Botanical Gardens NAS of Belarus (CBG), and to date it has been collected valuable gene pool of plants and a big experience on their cultivation accumulated.

Since 1998, in the Department of Plant Biochemistry and Biotechnology of CBG the work on the creation of aseptic plant collection of small fruit taxa of *Ericaceae* is carried out. One of the main tasks that we set during the formation of the collection is the maintenance of the viability, genetic integrity and quality of the samples, as well as enabling its use in scientific and economic purposes.

The studies were conducted in the following directions:

• development of requirements for source material and primary explant selection;

• determination of the optimal conditions for obtaining culture with a high morphogenetic potential and cloning conditions, as well as adventitious root formation *in vitro*;

• study the morphogenetic potential of cultivated tissues and determining the factors that influence its realization, directional control morphogenesis *in vitro*;

• studying vitrification, somaclonal variations and other changes of growth and development of plants *in vitro*, as well as the factors responsible for their genesis;

• conservation of collection samples as slow growing culture;

• genetic certification of samples to identify the genotype, the homogeneity of the material during cloning.

It has been established the following. Plants of different species of *Ericaceae* show different morphogenetic potential in *in vitro* culture. However, cuttings of actively growing annual shoots with 2-3 metameres were the best type of primary explant for all the investigated species. The optimum media at all stages of cultivation is WPM. At the cloning stage 2iP as cytokinin and IAA as auxin in selected concentrations should be used for each species. Application of these plant hormones compared with zeatin can significantly reduce the probability of vitrification and somaclonal variation. Sustaining of studied plants in the conditions of slower growth is preferentially to carry out by adding 3-6% mannitol to the culture medium.

Currently, in aseptic collection of small-fruit plants of *Ericaceae* 56 taxa is maintained, including 44 cultivars of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.), 6 cultivars of lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.), 5 cultivars of American cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.), 1 cultivar of barren myrtle (*Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng.). The collection is constantly enlarged with new perspective samples.

Keywords: *small-fruit crops, Ericaceae Juss., in vitro collection, morphogenesis in vitro*

ДЛИТЕЛЬНОЕ ХРАНЕНИЕ ВОСЬМИ СОРТОВ ВИШНИ *IN VITRO*

А.М. Чернец
Научно-Практический Институт Садоводства, Виноградарства и Пищевых Технологий
г. Кишинев, Республика Молдова, e-mail: *chernetsa@rambler.ru*

Опыты по длительному хранению растеньиц сортов вишни *in vitro* проводили в течении 10 лет. В экспериментах было восемь сортов: Подбельская, Шпанка Ранняя, Жуковская, Ранняя 2, Империал, Эрди Урожайная, Любская, Метеор Ранний. Предварительно на питательную среду были изолированы очищенные от покровных чешуй почки размером 0,3-0,8 см. В течение следующих 4-5 пассажей были размножены побеги, подходящие для дальнейших опытов. Испытаны различные питательные среды на основе макро- и микро солей по Murashige, Skoog (1962) с цитокининами, ауксинами и абсцизовой кислотой. Хранение проводили в световой комнате при температуре 23°C, в холодильнике при температуре 3-4°C в темноте, в холодильнике Sanyo при температуре 2-4°C и освещении 300-400 люкс. Испытаны сосуды на 50, 100, 300 мл и конические колбы на 50, 100 и 250 мл. В зависимости от объёма сосуда на питательную среду высаживалось от 1до 4 побегов высотой 2-4 см, без корней. Одиночные побеги, высаженные на среду для укоренения, сохранились почти без изменений в течении 12 месяцев при температуре 2-4°C. В течении следующих 12 месяцев побеги вытягиваются и утончаются. 50 побегов сортов вишни Подбельская, Жуковская и Империал хранятся без пересадок на свежую среду в течении 3 лет. В настоящее время максимальный срок хранения отмечен у сорта Подбельская – 7 лет. При этом из трех высаженных одиночных побегов высотой по 1см выросло более 60 побегов высотой 5-6 см. Лучшим сосудом для хранения были конические колбы объёмом 250 мл, закрытые ватно-марлевыми пробками с 120 мл питательной среды. Добавление в питательную среду абсцизовой кислоты в концентрации 1 и 2,5 мг/л замедляло рост и развитие растений в период хранения при 2-4°C в темноте на 20-30% по сравнению с контролем. Периодически, один раз в три месяца, хранящиеся в холодильниках растения осматривают и по мере необходимости пересаживают на свежую питательную среду того же состава. Основные потери при хранении побегов вишни отмечены из-за инфицирования растений или питательной среды. Отмечена возможность сохранения побегов клонов сортов вишни в условиях культуральной комнаты при 24°C и освещенности 3-4 тысячи люкс без пересадки в течении 3-5 месяцев . Для высадки растений на адаптацию в нестерильные условия побеги вишни после длительного хранения необходимо вернуть в обычные температурные и световые условия на 3-4 месяца.

Ключевые слова: *сорта вишни, длительное хранение растений in vitro*

LONG-TERM STORAGE EIGHT VARIETIES OF SOUR CHERRY *IN VITRO*

A.M. Chernets
Scientific-Practical Institute of Horticulture and Food Technologies, Chisinau, Moldova,
e-mail: *chernetsa@rambler.ru*

Experiments on long-term storage *in vitro* sour cherry varieties of plants were carried out for 10 years. Eight varieties were used for experiments: Podbelskaya, Spanka Ranniaia, Jukovskaia, Ranniaia 2, Imperial, Erdi Botermo, Lubskaia, Meteor Early. Buds sized 0.3-0.8 cm from the coating peeled scales were previously isolated on a nutrient medium. Shoots suitable for further experiments were propagated during following 4-5 passages.

Different culture media were tested on the basis of macro- and microsalts according to Murashige and Skoog (1962) with cytokinins, auxin and abscisic acid. Storage was carried out in a light room at 23°C, in a refrigerator at 3-4°C in the dark, in a Sanyo refrigerator at 2-4°C and 300-400 lux illumination. Vessels for 50, 100, 300 ml and conical flasks for 50, 100, 250 ml were used for the testing. One to four shoots without roots length 2 to 4 cm, were planted in the culture medium depending on the volume of the vessel. Single shoots which had been planted on rooting medium, had survived for 12 months at the temperature 2- 4°C almost without change. The same shoots have stretched and became very thin during the next year.

Fifty shoots of Podbelskaya , Jukovskaia and Imperial cherry were stored direct onto fresh medium. Currently, the longest storage period – 7 years - was shown by Podbelskaya variety.

More than 60 shoots 5-6 cm height have propagated from the three Podbelskaya 1 cm long shoots during those 7 years. It turned out that the best storage vessels were conical flasks for 250 ml, with 120 ml of culture medium, which were closed with the wadding-gauze cap.

Abscisic acid 1 mg/l and 2, 5 mg/l have slowed down growth and development of the plants storaged in the dark at 2-4°C for 20-30% compared to the control. Plants stored in the refrigerators had been inspected every three months, if needed they were transplanted to the fresh medium of the same composition. Infection of the plants or culture medium were the main reasons of storage losses for sour cherry shoots. It's possible to save cherry varieties clones shoots in the culture room at 24°C and light 3-4 thousand lux without change for 3-5 months without passage. Cherry shoots should be returned to normal temperature and light conditions for 3-4 months before planting on the adaptation of plants in non-sterile conditions after long-term storage.

Keywords: *sour cherry varieties, long-term storage in vitro*

CONSERVATION OF THAI ORCHID SPECIES USING CRYOBIOTECHNOLOGY

Kanchit Thammasiri
Department of Plant Science, Faculty of Science, Mahidol University, Phyathai, Bangkok, Thailand, e-mail: *kanchitthammasiri@gmail.com*

Thailand is the origin of about 1300 tropical orchid species and 180-190 genera. Deforestation and over-collection of wild Thai orchids for trade has placed orchid species at a risk of extinction. Therefore, the conservation, as well as sustainable use is urgently needed to conserve orchids by various means. The genus *Paphiopedilum* and *Dendrobium cruentum* are listed in Appendix I of CITES. At the Department of Plant Science, Faculty of Science, Mahidol University, various methods of cryopreservation conservation of Thai orchid species are implemented. For cryopreservation, recent methods were used, namely vitrification (dehydration in PVS2 solution, consisted of 30% (w/v) glycerol, 15% (w/v) ethylene glycol and 15% (w/v) dimethyl sulfoxide, prepared in modified Vacin and Went liquid medium), encapsulation-dehydration (encapsulation in calcium alginate beads followed by air-drying in a laminar air-flow cabinet), encapsulation-vitrification (encapsulation in calcium alginate beads followed by dehydration in PVS2 solution) droplet-vitrification (fast freezing from small drops of PVS2 solution on aluminium strip) and cryo-plate (a combination of encapsulation and droplet on very fast freezing aiuminium plate) dehydrated with silica gel and drying beads. Application of these methods in seeds was successful in *Dendrobium chrysotoxum* (99%, vitrification). *Dendrobium cruentum* (32%, virification), *Dendrobium draconis* (95%, vitrification), *Dendrobium hercoglossum* (80%, encapsulation-vitrification). *Doritis pulcherrima* (62%, vitrification). *Rhynchostylis coelestis* (85%, vitrification), *Vanda coerulea* (67%, vitrification), as well as in protocorms of *Dendrobium cruentum* (33%, vitrification; 27%, encapsulation-dehydration), *Dendrobium cariniferum* (15%, encapsulation-vitrification), *Grammaytophyllum speciosum* (14%, encapsulation-vitrification), *Rhynchostylis gigantea* (19%, vitrification), *Vanda coerulea* (40%, encapsulation-dehydration) and *Seidenfadenia mitrata* (67%, vitrification) and *Arundina graminifolia* (76% and 74%, cryo-plate dehydrated with drying beads and silica gel, respectively; 33% droplet-vitrification; 64% encapsulation-dehydration with drying beads or silica gel). Cryopreserved seeds and protocorms were able to develop into normal seedlings. These methods appear to be promising techniques for cryopreservation of some Thai orchid germplasm.

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

СЕКЦИЯ 4.
SESSION 4.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ИЗУЧЕНИИ БИОРАЗНООБРАЗИЯ РАСТЕНИЙ

MOLECULAR GENETICS TECHNIQUES FOR PLANT BIODIVERSITY STUDIES

КУЛЬТУРАКЛЕТОК *VITIS AMURENSIS* RUPR. КАК АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ ИСТОЧНИК ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО РЕЗВЕРАТРОЛА

О.А. Алейнова, А.С. Дубровина, В.С. Христенко, К.В. Киселев
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Биолого-почвенныйинститут Дальневосточного отделения Российской академии наук,
г. Владивосток, Россия, e-mail: *info@biosoil.ru*

Виноград является источником важных биологически активных веществ (БАВ), наиболее ценным, из которых является фитоалексин–резвератрол. К главным его свойствам относятся кардиопротекторная, антивирусная и противоопухолевая активность. Присутствие резвератрола показано во многих растениях, а именно клюква, какао, орехи. Однако наибольшим содержанием данного вторичного метаболита отличается виноград, в том числе виноград амурский *Vitis amurensis* Rupr.

На сегодняшний день процесс получения резвератрола связан с большими затратами и длительностью, поскольку его необходимо получить из взрослого растения горца *Polygonum cuspidatum*, которое не отличается высоким содержанием данного фитоалексина. Одной из альтернатив получения вторичных метаболитов является использование культуры клеток, поскольку продукт, возможно, получать независимо от сезона, погодных условий и почвы. Однако содержание БАВ в клеточных культурах растений обычно низкое, поэтому для промышленного производства БАВ необходимо увеличить биосинтез этих ценных веществ в клеточных культурах растений с помощью методов биотехнологии. Для увеличения синтеза вторичных метаболитов в культурах клеток растений используют ряд методов (в том числе, которые были использованы в нашей работе): селекцию и отбор наиболее продуктивных клеточных линий, варьирование состава питательных сред, добавление предшественников БАВ, обработка клеток различными элиситорами, а также использование методов генной инженерии. В ходе нашей работы мы протестировали ряд подходов для увеличения биосинтеза резвератрола, но наиболее значимые результаты мы получили при получении трансгенных культур клеток винограда. Так благодаря нашим предыдущим исследованиям мы показали, что в биосинтезе резвератрола участвуют ионы Ca^{2+}. Более того, накопление резвератрола коррелирует с повышением экспрессии CDPK (кальций-зависимые протеинкиназы–основные сенсоры цитоплазматического кальция в клетках растений). Содержание резвератрола в некоторых трансгенных линиях, сверхэкспрессирующих гены *CDPK* из винограда *V. amurensis* (например, *VaCDPK3c*), возрастало более чем в 60 раз по сравнению с нетрансгенными клетками и достигало более 30 мг на литр используемой питательной среды (0.42% от сухой массы клеток). Полученные значения соизмеримы с лучшими полученными ранее значениями продукции резвератрола в других модельных системах, но, к сожалению, спустя 2-3 года после получения содержание резвератрола в полученных клетках начало значительно снижаться. Данное снижение продуктивности было отмечено ранее и на других трансгенных культурах клеток, например, сверхэкспрессирующих ген *rolB*. Таким образом, можно сказать с большей уверенностью, что снижение продуктивности БАВ в трансгенных культурах клеток является общей тенденцией, не зависящей от выбранного гена и требует отдельного исследования.

Ключевые слова: *резвератрол, клеточная культура, V. amurensis, CDPK*

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 14-14-00366).

PLANT CALLI OF *VITIS AMURENSIS* RUPR. AS THE ALTERNATIVE SOURSE OF ANTITUMORAL RESVERATROL

O.A. Aleynova, A.S. Dubrovina, V.S. Khristenko, K.V. Kiselev
Institute of Biology and Soil Science, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia, e-mail: *info@biosoil.ru*

Trans-resveratrol (3,4',5-trihydroxy-*trans*-stilbene) is a plant phenol derived from grapes, mulberries, peanuts, and other plant sources. Resveratrol has been shown to possess chemopreventive properties against certain cancers and cardiovascular diseases, and to have positive effects on age longevity. However, a wild grapevine *Vitis amurensis* Rupr. is a species which have the highest content of this second metabolite.

Plante xtraction from plants is the classical method providing major amountof this compound, however, it suffers from low abundance of resveratrol in environmental, seasonal, orregional variations. Incontrast, grapevine callus cultures offersignificantly promising and scalable strategiesforresveratrolproduction. However, the resveratrol content plant calli usually is low, therefore to produce in commercial way the resveratrol biosynthesis have to be increased by biotechnological approaches in plant callus culture. To increase the content of second metabolites in plant cells several methods are used, namely, the selection of the most productive plant cell lines, the variation of medium compound, the elicitors treatments and the methods of genetic engineering. We tested several approaches to increase resveratrol production but the highest resveratrol content we obtained using transgenic callus culture of grapevine. It has been shown earlier Ca^{2+} ionsinvolved in resveratrol biosynthesis. Moreover, the expression of some *CDPKs* (calcium-dependent protein kinase– major sensors of cytosolic calcium in the cell) genes were increased in cell cultures of *V. amurensis* with high levels of resveratrol content. In several transgenic cell lines overexpressing *CDPK* (for example *VaCDPK20*) the resveratrol content increased to 60 times compared to non-transgenic calli and reached more than 30 mg/l (0.42% dry weight). The obtained values were comparable with the best obtained values of resveratrol production in other model systems, but, unfortunately, the resveratrol content significantly decreased after 2-3 years. The decreasing resveratrol production in transgenic plant cells is a common tendency not depending on selected gene and needs particular research.

Keywords: *CDPK, callus culture, resveratrol, Vitis amurensis*

Aknowlegment
This work was supported by grant from the Russian Science Foundation (№ 14-14-00366).

ВНУТРИГЕНОМНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ У ВИДОВ И ЕСТЕСТВЕННЫХ ГИБРИДОВ РОДА *CYPRIPEDIUM* (*ORCHIDACEAE*)

Е.В. Андронова[1], Э.М. Мачс[1], Е.Г. Филиппов[2]
[1]Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Ботанический институтим. В.Л. Комарова Российской академии наук, г. Санкт-Петербург, Россия, e-mail: *elena.andronova@mail.ru*,
[2]Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Ботанический сад Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия, e-mail: *filorch@mail.ru*

На основании данных морфологического и аллозимного анализов (Филиппов, Андронова 2011) были высказаны предположения, что особи *C.* x *ventricosum* представляют собой гибриды первого поколения между *C. calceolus* и *C. macranthon*, а в местах произрастания *C. shanxiense* и *C. calceolus* последний таксон замещен гибридами *C. calceolus* x *C. shanxiense*. Для проверки гипотез были исследованы участки 5,8S рибосомальной (*ITS*1) ДНК и хлоропластной ДНК (*trnL-F*) с использованием методики пиросеквенирования.

У некоторых образцов *C. calceolus* был выявлен внутригеномный полиморфизм *ITS*1 участка по замене C на T в позиции 320 (позиция здесь и далее обозначены в соответствии с аналогичными позициями у референса из Генбанка). Полиморфные образцы *C. calceolus* были собраны в разных частях ареала, какой-либо географической приуроченности не установлено.

У *C. shanxiense* в *ITS*1 участке в позициях 268 и 276 имелись замены G на T, которые являлись специфичными только для данного таксона (из числа изученных), а в позиции 320 имелась замена C на T (в 100% прочтений). Позиции 268 и 276 оказались полиморфными: замены обнаружены в 50 % прочтений у образцов из Забайкалья, в 85–87% - из Приморья, 70-73% с Сахалина. Все *C. shanxiense* имели 13-50% последовательностей идентичных *C.calceolus*, тогда как у *C. calceolus* из мест совместного произрастания двух таксонов, замены G на T встречались в единичных (не более1,5%) прочтениях.

*ITS*1 участки у *C. macranthon* и референса отличались по замене C на T в позициях 269, 320 и 352 (практически 100 % прочтений).

Анализ ITS1 участка *C.* x *ventricosum* выявил полиморфизм в позициях 269 и 352, и подтвердил, что это гибриды первого поколения между *C. calceolus* и *C. macranthon*.

Участок хлоропластной ДНК оказался идентичным у всех изученных образцов *C. shanxiense* и у *C. calceolus* из Забайкальского края и из Приморья. Он имел существенные различия при сравнении с образцами *C. calceolus*, собранными в Сибири, Урале, Европейской части России и запада Забайкалья (Бурятия).

У двух из 11 изученных образцов *C.* x *ventricosum* изученный участок хлоропластной ДНК имел сходство с *C. calceolus* из Забайкальского края и из Приморья, у всех других он был идентичен таковому *C. macranthon*.

Исследования с применением 454 метода секвенирования не подтвердили предположение о том, что в Забайкалье и Приморье *C. calceolus* замещен гибридом *C. calceolus* x *C. shanxiense*. Однако было показано, что *C. calceolus* на территории России представлен двумя разными группами (а возможно и таксонами) на основании различий участка хлоропластной ДНК и данных аллозимного анализа.

Ключевые слова: *внутригеномный полиморфизм, гибридизация, ITS*1, *trnL-F*

Работа выполнена по государственным заданиям № 01201255606 и № 012001459509 при финансовой поддержке гранта РФФИ (проект № 14-04-92004 ННС_а) и Программы фундаментальных исследований Президиума РАН: «Живая природа: современное состояние и проблемы развития».

INTRAGENOMIC POLYMORPHISM IN SPECIES AND NATURAL HYBRIDS OF *CYPRIPEDIUM* (*ORCHIDACEAE*)

E.V. Andronova[1], E.M. Machs[1], E.G. Filippov[2]
[1]Institution of the Russian Academy of Science Komarov Botanical Institute of RAS, Sankt-Petersburg, Russia, e-mail: *elena.andronova@mail.ru*,
[2]Institution of the Russian Academy of Science Botanical Garden of Ural branch of RAS, Ekaterinburg, Russia, e-mail: *filorch@mail.ru*

On the base of morphological and allozyme analyses data (Filippov, Andronova, 2011) it was assumed that the individuals of *C.* x *ventricosum* are the hybrids of the first generation between *C. calceolus* and *C. macranthon*, and in the locations of sympatric populations of *C. shanxiense* and *C. calceolus* the last one is substituted by hybrids (*C. calceolus* x *C. shanxiense*). For checking the hypotheses the 5,8S of ribosomal (*ITS*1) DNA and chloroplast DNA (*trnL-F*) were investigated with the using of a pyrosequencing.

In some samples of *C.calceolus* the intragenomic polymorphism in *ITS1* by the replacement of C by T in the position 320 (here and throughout designated in according with the analogous positions in reference from GenBank) was revealed. Polymorphous samples of *C. calceolus* were collected in the different parts of the areal, any geographical confinement was not established.

In *C. shanxiense* in the positions 268 and 276 of *ITS1* replacements of G by T occured, which were specific only for this taxon (from the number of studied), while in the position 320 there was a replacement of C by T (in 100% reads). Positions 268 and 276 proved to be polymorphous: replacements are discovered in 50 % reads in the samples from Transbaykal, in 85–87% - from the Prymorie, in 70-73% - from Sakhalin. All samples of *C. shanxiense* had 13-50% of the sequences identical to *C. calceolus*, whereas in *C. calceolus* from the places of the joint vegetation of both taxons, replacement of G by T occurred in the single (not more 1,5%) reads.

ITS1 in *C. macranthon* and in reference were differed in the replacement of C by T in the positions 269, 320 and 352 (practically 100 % reads).

Analysis of *ITS1* in *C.* x *ventricosum* revealed polymorphism in the positions 269 and 352, and confirmed that these are the hybrids of the first generation between *C.calceolus* and *C. macranthon*.

Chloroplast DNA was proved to be identical in all studied samples of *C. shanxiense* and of *C. calceolus* from the Transbaikal and from the Prymorie. It demonstrated essential differences comparing with the samples of *C. calceolus*, collected in Siberia, Urals, European part of Russia and West of Transbaykal (Buryatiya). In two of 11 samples *C.* x *ventricosum* studied chloroplast DNA resembled *C. calceolus* from the Transbaikal and from the Prymorie, in all others it was identical to the same in *C. macranthon*.

Studies with the using of 454method did not confirm the assumption about the fact that in Transbaykal and Prymorie *C. calceolus* was substituted by the hybrids (*C.calceolus* x *C. shanxiense*). However, it was shown that *C.calceolus* in the territory of Russia was represented by two different groups (but possibly also by taxons) on the basis of differences of chloroplast DNA and of allozyme analysis data.

Keywords: *intragenomic polymorphism, hybridization, ITS1, trnL-F*

Aknowlegments
The work is carried out according Government tasks № 01201255606 and № 012001459509 with the financial support of The Russian Foundation for Basic Research (project № 14-04-92004) and the Programs of Presidium of Russian Academy of Science: “Living nature: contemporary state and the problem of development”.

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНОМНОГО ПОЛИМОРФИЗМА *HYDRANGEA MACROPHYLLA*

Н.А. Бараева[1], Л.С.Самарина[2], В.И.Маляровская[2], С.В. Виноградова[1]
[1]Институт биоинженерии, ФИЦ Биотехнологии РАН, г. Москва, Россия,
e-mail: *svetlana.vinogradova@biengi.ac.ru*
[2]Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт цветоводства и субтропических культур», г. Сочи, Россия, e-mail: *malyarovskaya@yandexl.ru*

Род гидрангея (*Hydrangea L.*) представлен 23 видами. Некоторые из этих видов выращиваются в качестве декоративных кустарников, среди которых особой популярностью пользуется вид *Hydrangea macrophylla*. Изучение внутривидового состава сортов *H. macrophylla* необходимо для рационального использования этого декоративного растения в практике озеленения. Проблемой изучения данного вида является идентификация и дифференциация подвидов и их гибридов вследствие большого сходства их геномов. Морфологические признаки растений являются одними из наиболее важных маркеров для видовой идентификации декоративных культур. Однако морфологические признаки, как правило, зависят от климатических условий. SSR-маркеры имеют преимущество по сравнению с морфологическими маркерами, будучи не зависимыми от воздействия окружающей среды и обеспечивая информацию об индивидуальном геноме.

SSR-маркеры представляют собой метод, характеризующий внутривидовое генетическое разнообразие растений. Данные маркеры могут быть использованы для выявления генетических взаимоотношений между видами, оценки генетического разнообразия внутри вида. Кроме того, микросателлитные маркеры могут быть использованы для подтверждения гибридности потомства при внутривидовых, межвидовых и межродовых скрещиваниях, анализа родства, развития программ по маркер ассоциированной селекции (MAC) и определения сортовой принадлежности. SSR маркеры ранее были использованы для изучения взаимосвязей среди представителей рода *Hydrangea* и родственных ему видов.

В настоящей работе проведено исследование внутривидового полиморфизма 20 гибридов *H. macrophylla* (коллекция предоставлена Всероссийским научно-исследовательским институтом цветоводства и субтропических культур, г. Сочи). Нами были апробированы 10 описанных ранее локусов (Rinehart *et al*., 2006). Таким образом, SSR маркеры были успешно использованы для анализа генетического разнообразия среди 20 гибридов of *H. macrophylla*.

Ключевые слова: *полиморфизм ДНК, молекулярные маркеры, SSR-маркирование, микросателлитные локусы, гидрангея*

THE STUDY OF GENOME POLYMORPHISM IN *HYDRANGEA MACROPHYLLA*

N.A. Baraeva[1], L.S. Samarina[2], V.I. Malyarovskaya[2], S.V.Vinogradova[1]
[1]Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences; 33, bld. 2 Leninsky Ave., Moscow, Russia;
e-mail: *svetlana.vinogradova@biengi.ac.ru*
[2]Federal State Budgetary Scientific Institution «Russian Research Institute of Floriculture and Subtropical Crops», Sochi, Russia, e-mail: *malyarovskaya@yandex.ru*

The genus *Hydrangea L.* consists of 23 species. Several species are cultivated as ornamentals shrubs, the most popular of which is *Hydrangea macrophylla*. The study of intraspecific structure of *H. macrophylla* varieties is necessary for rational use of ornamental plants in landscaping practices. The problem of this species is identification and differentiation of subspecies and their hybrids due to the great similarity of their genomes. Morphological characteristics are the most important markers for varietal identification of ornamental plants. However, morphological characteristics are often dependent on climate conditions. SSR-markers have the advantage compare with morphological markers being independent of environmental effects and providing direct information on the individual genome.

SSR-markers represent a useful method for characterizing of genetic diversity within plant species. These markers may be used to reveal genetic relationships among species, assess genetic intraspecific diversity. As well, these microsatellite markers may be used to verify hybridity of progeny from intraspecific, interspecific, and intergeneric crosses, analyze parentage, develop marker assisted selection (MAS) programs, and identify cultivars. SSR markers were recently used to study relationships among *Hydrangea* and related species (Rinehart et al., 2006).

In this paper we have studied the polymorphism of 20 interspecific *H.macrophylla* hybrids (collection of the Russian Research Institute of Floriculture and Subtropical Crops, Sochi). We have tested 10 previously described loci (Rinehart *et al*., 2006). In summary, SSR markers were used successfully to analyze genetic diversity among 20 hybrids of *H. macrophylla*.

Keywords: *DNA polymorphism, molecular markers, SSR-markers, microsatellite loci, Hydrangea*

МОЛЕКУЛЯРНОЕ МАРКИРОВАНИЕ РЕДКИХ И ИСЧЕЗАЮЩИХ ГЕНОТИПОВ ВИНОГРАДА С ЦЕЛЬЮ СОХРАНЕНИЯ РАЗНООБРАЗИЯ

С.М. Гориславец, В.А. Володин, Я.А. Волков, В.И. Рисованная
ФГБУН ВННИИВиВ «Магарач» РАН, г. Ялта, Крым, e-mail: *goricvet_2@rambler.ru*

Виноградарство является важной частью сельского хозяйства Крыма и его культуры, которое насчитывает несколько тысячелетий. Удобное географическое положение Крымского полуострова и теплый климат благоприятствовали процветанию виноградарства основанного на аборигенных сортах. Однако серьезный удар по крымским аборигенным сортам винограда был нанесен, когда начали активно завозить виноград высокоурожайных сортов из Европы, что привело к значительному сокращению ассортимента местных сортов, заражению филлоксерой и гибели многих сортов. На сегодняшний день виноградарство имеет тенденцию к монокультуре, что способствует сокращению генетического разнообразия и эрозии редких, особенно аборигенных генотипов. В ампелографической коллекции института винограда и вина «Магарач» поддерживается 79 образцов аборигенных сортов Крыма, некоторые из них представлены единичными растениями. Молекулярное маркирование редких и исчезающих генотипов винограда выполнено на основе анализа аллельного полиморфизма ядерных микросателлитных локусов (nSSR). ДНК 16 образцов крымских аборигенных сортов проанализирована методом SSR-ПЦР по 9 ядерным микросателлитным локусам (nSSR) VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD25, VVMD27, VVMD28, VVMD32 VrZAG62, VrZAG79 (This, 2009). Всего было детектировано 69 аллелей, 25 из которых встречались в данной выборке в единичных случаях. Уникальные аллели при сравнении с ранее проанализированной выборкой крымских аборигенных сортов выявлены в локсусе VVMD25 генотипов Морской 75 (размеры аллелей 249 и 255 п.н.), Харко (262 п.н) и Шира изюм (266 п.н). В генотипах Солнечная долина 16 и Морской 94 детектированы уникальные аллели 137 п.н. (VVS2) и 184 п.н. (VrZAG62) соответственно. У сорта Эмир Вейс в локсусе VVMD28 выявлен уникальный аллель 277 п.н., отсутствующий как среди крымских аборигенных сортов, так и в международной базе данных INRA (Франция), которая насчитывает более 7 000 сортов. Среднее количество аллелей/локус варьировало от 6 (VVMD27, VVMD5, VVMD7) до 10 (VRZAG79) и составило в среднем 7,7. Средняя гетерозиготность была достаточно высокой 0,7 с диапазоном от 0,56 (VVMD7) до 0.84 (VrZAG62). Индекс биоразнообразия Шеннона составил 1.69, что соответствует минимальной оценке. Полученные данные подтверждают уникальность крымских аборигенных генотипов и угрозу эрозии редких генотипов.

Ключевые слова: *Крым, аборигенный виноград, генотип, разнообразие, микросателлиты*

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 15-29-02715.

MOLECULAR LABELLING OF RARE AND ENDANGERED GRAPVINE GENOTYPES FOR THE PURPOSE OF DIVERSITY CONSERVATION

S.M. Goryslavets, V.A. Volodin, Y.A. Volkov, V.I. Risovannaya

Viticulture is an important part of agriculture of the Crimea and its culture, which dates back several millennia. The convenient geographical location of the Crimean peninsula and warm climate conduced to the prosperity of viticulture based on local varieties. However, a serious damage to the Crimean indigenous grape varieties has been applied by active import of high-yielding varieties from Europe, which led to a significant reduction of the range of local varieties, phylloxera infestation and the deaths of many local varieties. Nowadays viticulture has a tendency to monoculture, thereby reducing genetic diversity and erosion of rare, especially indigenous genotypes. The ampelographic collection of "Magarach" Institute contains 79 samples of native varieties of the Crimea, some of which are represented by single plants. Molecular labelling of rare and endangered grape genotypes was performed on the basis of the analysis of allelic polymorphism of nuclear microsatellite loci (nSSR). 16 DNA samples of the Crimean indigenous varieties were analyzed by SSR-PCR using 9 nuclear microsatellite loci (nSSR): VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD25, VVMD27, VVMD28, VVMD32 VrZAG62, VrZAG79 (This, 2009). A total of 69 alleles were detected, 25 of which occurred in the sample as unique cases. The unique alleles, comparing to the previously analyzed sample of the Crimean indigenous varieties, were found at the locus VVMD25 of genotypes Morskoy (Sea) 75 (size of the alleles 249 and 255 bp), Harco (262 bp) and Shira isyum (266 bp). Unique alleles 137 bp (VVS2) and 184 bp (VrZAG62) were detected at genotypes Solnechnaya dolina (Sun Valley) 16 and Morskoy (Sea) 94 respectively. The unique allele 277 p.n. was identified in the variety Emir Weys at the locus VVMD28, which was present neither among the Crimean indigenous varieties, nor in the data base of INRA (France), that contains more than 7000 varieties. The mean number of alleles per locus was 7.7 and ranged from 6 (VVMD27, VVMD5, VVMD7) to 10 (VRZAG79). Average heterozygosity was quite high (0.7) with a range from 0.56 (VVMD7) to 0.84 (VrZAG62). Shannon biodiversity index was 1.69, which corresponds to the minimum estimate. Obtained results confirm the uniqueness of the Crimean indigenous genotypes and the threat of erosion of rare genotypes.

Keywords: *Crimea, indigenous grapevine, genotype, diversity, microsatellites*

Aknowlegment
This work was supported by RFBR grant № 15-29-02715.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ РАСТЕНИЙ, УСТОЙЧИВЫХ К АБИОТИЧЕСКИМ СТРЕССАМ: ПЕРЕНОС ГЕНОВ КАЛЬЦИЙ-ЗАВИСИМЫХ ПРОТЕИНКИНАЗ ИЗ ДИКОГО ВИНОГРАДА.

А.С. Дубровина[1], В.С. Христенко[1], О.А. Алейнова[1], К.В. Киселев[1,2]
[1]Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Биолого-почвенный институт Дальневосточного отделения Российской академии наук, г. Владивосток, Российская Федерация, e-mail: *dubrovina@biosoil.ru*
[2]Дальневосточный федеральный университет, Школа естественных наук, г. Владивосток, Российская Федерация

Абиотические стрессовые факторы, такие как высокие и низкие температуры, высокая соленость почвы, засуха или затопление, являются одними из основных факторов, лимитирующих биоразнообразие и продуктивность растений. Для адаптации к неблагоприятным условиям окружающей среды растения выработали сложные сигнальные пути, ведущие к биохимической и физиологической акклимации. В связи с этим изучение фундаментальных механизмов адаптации растений к абиотическим стрессам является высоко актуальной задачей. При помощи методов генной инженерии можно не только изучить механизмы развития устойчивости растений, но и получить растения с измененными свойствами и повышенной устойчивостью. В настоящее время существует несколько различных активно применяющихся подходов для получения трансгенных растений, и подобрать эффективный метод трансформации можно для многих видов растений. В нашей работе мы исследовали адаптационные механизмы высокоустойчивого вида винограда *Vitis amurensis* Rupr. и производили перенос генов кальций-зависимых протеинкиназ (CDPK или CPK) из этого вида растений в модельное растение *Arabidopsis thaliana* методом цветочного погружения или в культуры клеток винограда методом ко-культивирования, после чего тестировали выживаемость полученных растений при влиянии различных видов абиотического стресса. Штаммы агробактерий, используемые для трансформации, содержали бинарные вектора с целевыми генами под контролем двойного промотора CaMV 35S, что обеспечивало сверхэкспрессию.

Известно, что кальциевая сигнальная система играет одну из ключевых ролей в адаптации растений к абиотическим стрессам, и CDPK являются ключевыми белковыми сенсорами катионов кальция, поступающих из внеклеточного пространства в цитоплазму при воздействии на клетки растений внешних стрессовых сигналов. CDPK передают поступающую информацию о внешнем воздействии путем фосфорилирования белков-мишеней, которые в свою очередь активируют экспрессию защитных генов, изменяют продукцию активных форм кислорода или, например, регулируют работу устьиц. Полученные нами трансгенные растения арабидопсиса и культуры клеток винограда, сверхэкспрессирующие различные гены *CDPK* дикого винограда (*VaCPK3a*, *9*, *13*, *20*, *21* и *29*), были более устойчивы к холодовому стрессу и засухе (сверхэкспрессия *VaCPK20*), засолению почвы (сверхэкспрессия *VaCPK21*), а также к тепловому и осмотическому стрессам (сверхэкспрессия *VaCPK29*). Трансформация растений арабидопсиса или каллусных культур клеток винограда генами *VaCPK3a*, *VaCPK9* и *VaCPK13* не изменила выживаемости растений при воздействии абиотических стрессов, в то время как положительно повлияла на ростовые характеристики трансгенных культур клеток винограда, сверхэкспрессирующих соответствующие гены. Полученные данные показывают, что гены *VaCPK20*, *VaCPK21* и *VaCPK29* вовлечены в адаптацию дикого винограда к абиотическим стрессам, а гены *VaCPK3a* и *VaCPK9* – в регуляцию процессов роста. Трансформацию растений генами *CDPK* дикого винограда можно рассмотреть как способ получения трансгенных растений с повышенной устойчивостью к абиотическим стрессам.

Ключевые слова: *кальций-зависимые протеинкиназы, трансгенные растения, кальциевая сигнальная система, устойчивость к абиотическим стрессам, Arabidopsis thaliana, Vitis amurensis*

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант №14-14-00366).

GENE ENGINEERING FOR ABIOTIC STRESS RESISTANCE IN PLANTS: CALCIUM-DEPENDENT PROTEIN KINASE GENE TRANSFERS FROM THE WILD GRAPEVINE

A.S. Dubrovina[1], V.S. Khristenko[1], O.A. Aleynova[1], K.V. Kiselev[1,2]
[1]Institute of Biology and Soil Science, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia, e-mail: *dubrovina@biosoil.ru*
[2]Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia

Abiotic stresses, such as extreme temperatures, soil salinity, water deficit, or flood, are one of the major limiting factors of plant biodiversity and productivity. To cope with adverse environmental conditions, plants developed complex signaling leading to biochemical and physiological acclimation. Therefore, studying the mechanisms of plant adaptation to abiotic stresses is a burning issue in modern plant physiology. Using gene engineering techniques, it is possible not only to study the mechanisms of plant stress tolerance but also to establish plants with altered properties and enhanced stress resistance. There are several different popular approaches to obtain transgenic plants, and, therefore, it is possible to select an efficient transformation method for many plant species. We investigated adaptation of highly stress-tolerant grapevine species *Vitis amurensis* Rupr. and performed gene transfers from *V. amurensis* to a model plant species *Arabidopsis thaliana* using floral dip method or in the grapevine cell cultures by co-cultivation. Then, we tested the survival rates of the transgenic plants under different abiotic stress treatments.

It is known that Ca^{2+} signaling plays an essential role in plant adaptation to abiotic stresses. Ca^{2+}-dependent protein kinases (CDPK or CPK) are known as key protein sensors of calcium ions entering the cytoplasm under the influence of the outer stress signals. CDPKs transmit the information about the environmental cues via phosphorylation of specific target proteins that activate expression of defense genes, affect ROS production, or regulate stomatal movements. We obtained transgenic *Arabidopsis* plants and grapevine cell cultures overexpressing different *CDPK* genes of the wild grapevine *V. amurensis* (*VaCPK3a*, *9*, *13*, *20*, *21* and *29*) that were resistant to cold and drought stress (*VaCPK20* overexpression), heat and osmotic stress (*VaCPK29*), and soil salinity (*VaCPK21*). While transformation with the *VaCPK3a*, *VaCPK9* and *VaCPK13* genes did not change survival rates of *A. thaliana* plants under abiotic stress treatments, it considerably improved growth rates of transgenic grapevine cell cultures overexpressing these genes. The data obtained revealed that the *VaCPK20*, *VaCDPK21* and *VaCDPK29* genes are involved in the wild grapevine adaptation to abiotic stresses, while the *VaCDPK3a* and *VaCDPK9* genes – in the regulation of growth processes. Plant transformation with the *CDPK* genes of wild grapevine could be considered as an approach to establish transgenic plants with elevated resistance to abiotic stresses.

Keywords: *abiotic stress tolerance, Arabidopsis thaliana, calcium-dependent protein kinases, transgenic plants, calcium signaling, Vitis amurensis*

Aknowlegment
This work was supported by a grant from the Russian Science Foundation (14-14-00366).

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ В КОЛЛЕКЦИОННЫХ НАСАЖДЕНИЯХ НИКИТСКОГО БОТАНИЧЕСКОГО САДА ПОСРЕДСТВОМ МЕТАТРАНСКРИПТОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

А.В. Закубанский[1], С.Н. Чирков[1, 2], О.В. Митрофанова[2], С.В. Челомбит[2], И.В. Митрофанова[2]
[1]Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, г. Москва, Россия, e-mail: *s-chirkov1@yandex.ru*
[2]ГБУ РК «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр», г. Ялта, Россия, e-mail: *irimitrofanova@yandex.ru*

Отсутствие вирусных инфекций является необходимой предпосылкой для использования растительного генофонда в биотехнологических разработках. Целью работы являлась диагностика вирусов в сортообразцах плодовых (персик, абрикос, хурма, инжир), технических (роза эфиромасличная, лаванда, лавандин), и цветочно-декоративных культур (канна, клематис, хризантема, роза) из коллекционных насаждений Никитского ботанического сада. На этих культурах описано свыше 80 вирусов различных таксономических групп. Для косточковых наиболее патогенными являются потивирус оспы (шарки) сливы, иларвирусы и неповирусы. На инжире чаще других встречаются клостеровирусы и эмаравирусы. Для хурмы характерны рабдовирусные инфекции. На розе и хризантеме обнаружены бегомовирусы, иларвирусы, тосповирусы, неповирусы, кармовирусы, каулимовирусы, потивирусы, карлавирусы, потексвирусы, эмаравирусы и многие другие вирусы. Вирус огуречной мозаики и вирус мозаики люцерны описаны на лаванде и лавандине. Потивирусы, баднавирусы и кукумовирусы широко распространены на канне, а неповирусы, тосповирусы, иларвирусы и томбусвирусы – на клематисе. Важнейшими патогенами этих культур являются также вироиды. На инжире обнаружены *Citrus exocortis viroid* и *Hop stunt viroid*, на хурме – *Citrus viroid* VI, *Apple fruit crinkle viroid* и *Persimmon viroid*, на хризантеме - *Chrysanthemum stunt viroid* и *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid*. Многообразие патогенов вирусной и вироидной природы и путей распространения от растения к растению (при вегетативном размножении, механически, насекомыми-переносчиками, нередко пыльцой и через семена) существенно осложняет их диагностику. Между тем, визуальный анализ коллекционных насаждений персика, абрикоса, розы эфиромасличной, канны садовой, хризантемы, хурмы, инжира, клематиса выявил признаки, характерные для вирусных инфекций, на многих сортах этих культур. Для идентификации вирусов в симптоматичных образцах был использован метод метатранскриптомного секвенирования, позволяющий выявлять патоген без вирус-специфических антител, праймеров или олигонуклеотидных зондов. Тотальную РНК из анализируемых растений экстрагировали с помощью набора RNeasy Plant Mini kit (Qiagen, Германия). Подготовку библиотек кДНК на основе полиаденилированных РНК и метагеномное секвенирование осуществляли на платформе Illumina HiSeq 2000 в фирме Genotek (*www.genotek.ru*). Идентификацию РНК вирусного происхождения осуществляли путем сопоставления полученных прочтений с нуклеотидными последовательностями, депонированными в международных базах данных. В результате проведенного анализа в большинстве образцов были обнаружены вирусы, описанные на данной культуре, или новые для нее. Высокая степень покрытия генома у ряда вирусов дает возможность сборки и анализа их полногеномных последовательностей.

Ключевые слова: *вирусы растений, диагностика, метатранскриптомное секвенирование*

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

IDENTIFICATION OF VIRAL INFECTIONS IN COLLECTION PLANTING OF THE NIKITA BOTANICAL GARDENS BY METATRANSCRIPTOME SEQUENCING

A.V. Zakubanskiy[1], S.N. Chirkov[1, 2], O.V. Mitrofanova[2], S.V. Chelombit[2], I.V. Mitrofanova[2]
[1]Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, e-mail: *s-chirkov1@yandex.ru*
[2]Nikita Botanical Gardens – National Scientific Center, Yalta, Russia,
e-mail: *irimitrofanova@yandex.ru*

The lack of viral infections is a prerequisite for use of plants in biotechnology. This work was aimed to diagnosis of viruses in samples of fruit (peach, apricot, persimmon, fig), technical (essential-oil rose, lavender, lavandin), and ornamental (canna, chrysanthemum, clematis, rose) crops from collection plantings of the Nikita Botanical Gardens (NBG). More than eighty viruses of different taxonomic groups were described on these cultures to date. Plum pox potyvirus, ilarviruses and nepoviruses are considered the most detrimental for stone fruit crops. Closteroviruses and emaraviruses are the most frequent in fig. Rhabdovirus infection are common for persimmon. Begomoviruses, ilarviruses, tospoviruses, nepoviruses, carmoviruses, caulimoviruses, potyviruses, carlaviruses, potexviruses, emaraviruses and many other viruses were found in rose and chrysanthemum. *Cucumber mosaic virus* and *Alfalfa mosaic virus* were described on lavender and lavandin. Potyviruses, badnaviruses and cucumoviruses widespread on canna. Nepoviruses, tospoviruses, ilarviruses and tombusviruses widespread on clematis. Also, viroids are the very important pathogens of these crops. *Citrus exocortis viroid* and *Hop stunt viroid* were found on fig. *Citrus viroid* VI, *Apple fruit crinkle viroid* and *Persimmon viroid* were described on persimmon. *Chrysanthemum stunt viroid* and *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid* are considered the most important pathogens of chrysanthemum. The diversity of viral pathogens and viroides as well as ways of their transmission from plant to plant (by vegetative reproduction of plants, mechanical inoculation, insect vectors, often via pollen and seeds) considerably complicates their diagnostics. Meanwhile, the visual analysis of collection plantings of peach, apricot, rose essential oil, canna, chrysanthemum, persimmon, fig, clematis revealed typical symptoms of viral infections on many cultivars of these crops. To identify the virus in symptomatic samples, the method of metatranscriptome sequencing was used, allowing the detection of a pathogen with no using of virus-specific antibodies, primers or oligonucleotide probes. The total RNA from leaf samples was extracted using RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Germany). Preparation of cDNA libraries using polyadenylated RNA and metagenomic sequencing on the Illumina HiSeq 2000 platform were performed using Genotek facilities (www.genotek.ru). Identification of the putative viruses was performed by mapping of the obtained row reads and nucleotide sequences deposited in international databases. In the result of the analysis, many known or novel viruses of some crops were detected. A high degree of genome coverage gives the opportunity of assembling and analyzing whole genome sequence of a number of viruses.

Keywords: *plant viruses, diagnostics, metatranscriptome sequencing*

Aknowlegment
This study was conducted with financial support of the Russian Science Foundation (project № 14-50-00079).

ДНК-МАРКИРОВАНИЕ ИСХОДНОГО МАТЕРИАЛА МНОГОЛЕТНИХ ЗЛАКОВЫХ ТРАВ ДЛЯ СЕЛЕКЦИИ МЕЖРОДОВЫХ И МЕЖВИДОВЫХ ГИБРИДОВ

И.П. Кондрацкая[1] , В.А. Столепченко[2], П.П. Васько[2] , О.В. Чижик[1] , И.Я. Нам[3]
[1]Центральный ботанический сад НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь,
e-mail: *ikondratskaya@mail.ru*
[2]Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию, г. Жодино, Беларусь,
e-mail: *vstolepchenko@mail.ru*
[3]ФГБОУ ВПО «Брянский государственный университет им. акад. И.Г.Петровского, г. Брянск, Россия.

Метод отдаленной гибридизации широко используется в селекции многолетних трав для улучшении таких видов, как овсяница луговая, овсяница тростниковая, райграс пастбищный, райграс многоцветковый, лисохвост луговой, лисохвост вздутый, житняк гребенчатый. Межродовые гибриды по морфологическим признакам имеют промежуточный фенотип между родительскими видами и характеризуются высокими качественными показателями, отличаются быстрым ростом и имеют более высокие показатели продуктивности в первый и во второй годы пользования, устойчивы к неблагоприятным условиям внешней среды. Межродовые гибриды – это перспективный материал для создания новых сортов, совмещающих высокую продуктивность зеленой массы и семян с высоким содержанием протеина и витаминов. Эти гибриды характеризуются долголетием, зимостойкостью и засухоустойчивостью, устойчивы к бактериям, грибным и вирусным заболеваниям. На основе отдаленной гибридизации авторами был создан сорт овсяницы луговой Таямница, получено 3 перспективных сортообразца лисохвоста лугового, ведутся работы по созданию межродовых гибридов житняка гребенчатого. Развитие молекулярных методов исследований позволяют создавать новые тест-системы, с помощью которых стало возможным анализировать генетический полиморфизм генетического материал хозяйственно-ценных растений с целью выявления уровня полиморфизма для создания гибридов с улучшенными характеристиками. Объектом исследования служили: лисохвост луговой сорт Обский, лисохвост вздутый сорт Довский, житняк гребенчатый сорт Петрівський и райграс пастбищный Р38. С целью определения генетического полиморфизма оптимизирована методика выделения ДНК многолетних злаковых трав и проведена ДНК –паспортизация гибридов методом ISSR-PCR. Из 10 протестированных ISSR-праймеров праймеров (IS1 (ag)8yg; IS2 (ga)8g; IS3 (ga)8c; IS4 (ca)8a; IS5 (ca)7rc; IS6 (ag)8(y)t; UBC810(ga)8t; U840 (ga)8yt; HB12 (cac)3gc; B4 (cac)6gg) были отобраны три ISSR-праймера с микросателитными повторами: (ga)8c; (ga)8t; (cac)3gc, обладающие наилучшей разрешающей способностью. Все использованные маркера обеспечили выявление полиморфных фрагментов, было оценено – для родительских форм межвидового гибрида 65 воспроизводимых фрагментов, из них 19 – полиморфные (29,2%) ; для родительских форм межродового гибрида - 71 и 14 соответственно, что составило 19,7% полиморфных фрагментов.

На основе полученных данных были составлены молекулярно-генетические паспорта исследуемых образцов. Результаты данного исследования будут использованы в дальнейшем селекционном процессе. Метод ДНК-паспортизации новых сортов и гибридов является главным инструментом для защиты прав селекционера, а также обеспечивает возможность проверки соответствия созданных сортов многолетних злаковых трав по критериям отличимости, однородности и стабильности (ООС-тест).

Ключевые слова: *межродовые и межвидовые гибриды, ДНК-маркирование*

DNA-MARKING OF STARTING MATERIAL OF PERENNIAL GRASS CROPS FOR SELECTION OF INTERGENERIC AND INTERSPECIFIC HYBRIDS

I.P. Kondratskaya[1], V.A. Stolepchenko[2], P.P.Vasko[2], O.V. Chizhik[1], I.Y. Nam[3]
[1] Central Botanical Garden of NAS of Belarus, Minsk, Belarus,
e-mail: *ikondratskaya@mail.ru*
[2] Scientific Practical Centre of Arable Farming of the National Academy of Sciences of Belarus , Zhodino, Belarus, e-mail: *vstolepchenko@mail.ru*
[3] Bryansk State University named after Academician I.G.Petrovsky, Bryansk. Russia

The method of distant hybridization is widely used in perennial grass breeding for improvement of such varieties as Alopecurus protensis, Alopecurus ventricrus, Lolium perenne, Lolium miltiflorum, Festuca protensis, Festuca arundinacea, Agropýron cristatum. Intergeneric hybrid, which according to their morphological features have intermediate phenotype between parental varieties, they are characterized by high quality indicators. They also differ in fast growth and in higher productivity indicators during the first and the second years of usage, they are resistant to adverse weather conditions.

Interspecific hybrid is a perspective material for creating new varieties, which can combine high green mass productivity and seeds with a high content of protein and vitamins, perennial, hardy, drought-resistant, resistant to bacteria, to fungal and viral diseases. Based on distant hybridization, authors created variety Festuca protensis Tayamnitca, they also developed 3 perspective variety Alopecurus protensis, and the creation of Intergeneric hybrid Agropýron cristatum is underway.

Development of molecular methods of research allowed to create testing systems, with help of which, it became possible to analyze polymorphism of cell genetic material (polymorphism DNA).

The object of the researching was variety Obski Alopecurus protensis, variety Dovski Alopecurus ventricrus, variety Petrivski Agropýron cristatum and variety R38 Lolium perenne.

Assessment of molecular genetic diversity of parental forms of intergeneric and interspecific hybrids was conducted on the basis of ISSR- PCR method. 10 primers IS1 (ag)8yg; IS2 (ga)8g; IS3 (ga)8c; IS4 (ca)8a; IS5 (ca)7rc; IS6 (ag)8(y)t; UBC810(ga)8t; U840 (ga)8yt; HB12 (cac)3gc; B4 (cac)6gg were worked out for molecular genetic analysis. In the course of analyzing three ISSR-primer microsatellites repeats: (ga)8c; (ga)8t; (cac)3gc.were chosen.

All used markers provided the reveal of polymorphic fragments, 65 reproducible fragments were assessed for parental forms of interspecific hybrid, from which 19 were polymorphic (29,2%); 71 reproducible fragments for parental forms of intergeneric hybrid gave 14 polymorphic fragments that was 19,7%.

Based on the obtained data, molecular-genetic passports of researched samples were compiled. Results of this scientific research will be used further in the selection process. Method of DNA-certification of new varieties and hybrids is a main tool for rights protection of breeders, it also provides the possibility of testing accordance of created varieties of perennial grass crops by criteria of distinctness, uniformity and stability (DUS-criteria).

Keywords: *interspecific and intergenetic hybrids, DNA-marking*

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОМПЛЕКСНОГО ПОДХОДА ДЛЯ ОПТИМИЗАЦИИ СЕЛЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССА КАРТОФЕЛЯ: ОПЫТ ЧАСТНОГО СЕЛЕКЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ЦЕНТРА (ООО "ДОКА-ГЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ")

А.Н. Сахарова[1], Е.А. Снигирь[2], Т.П. Супрунова[1]
[1]ООО "Дока-Генные Технологии", с. Рогачево, Дмитровский район, Московская область, Российская Федерация, e-mail: *breedcenter@dokagene.ru*
[2]ООО"ТрансДжин" с. Рогачево, Дмитровский район, Московская область, Российская Федерация, e-mail: *e.snigir@dokagene.ru*

В селекционно-генетическом центре ООО "Дока-Генные Технологии" уже второй год в сотрудничестве с отечественными и зарубежными селекционными компаниями успешно занимаются созданием новых столовых сортов картофеля (*Solanum tuberosum* L.). В селекционной программе - свыше 40 продвинутых селекционных клонов, а также более 100 исходных линий мировой коллекции.

Компания использует комплексный подход для оптимизации селекционного процесса, где наряду с методами традиционной селекции активно используются методы на основе использования ДНК-маркеров (MAS-marker assisted selection).

На всех этапах создания новых сортов проводится скрининг исходных линий, продвинутых селекционных клонов и коллекционных сортов с использованием 17 маркеров на гены/локусы устойчивости к 4 вирусам (PVY, PVX, PVS, PVM), 2 видам нематод (*Globodera rostochiensis, G.pallida),* 2 видам почвенных грибов (*Phytophthora infestans, Verticillium dahliae*). Данная технология позволяет достоверно выявлять доноры и генетические источники различных генов экстремальной устойчивости к основным наиболее вредоносным вирусам, а также карантинным объектам – двум видам цистообразующих нематод, из различных видов картофеля, что значительно сокращает количество изначально вовлекаемых в селекционный процесс клонов, линий, сортов и помогает отслеживать интрогрессию генетического материала в потомстве.

Проводимый скрининг повышает эффективность отбора, уменьшая объём анализируемого материала в предварительном испытании и сокращая селекционный процесс до 7 лет до передачи сорта на госсортоиспытание.

Помимо этого, компания ведет семеноводство вновь создаваемых сортов на как можно более ранних стадиях селекционного процесса. Для получения здорового семенного материала используется культура апикальных меристем, которая в сочетании с химио- и термотерапией позволяет нам получать растения свободные от вирусов. На всех этапах получения оздоровленных растений проводится диагностика на наличие вирусов и бактерий с помощью методов ИФА и ПЦР.

С помощью технологии молекулярного маркирования (SSR-simple sequence repeat) на основании анализа вариабельности микросателлитных локусов составлены «молекулярные паспорта» на каждый вновь созданный сорт картофеля. Каждый «молекулярный паспорт» представлен в виде формул, состоящих из комбинации аллельных вариантов 9-ти микросателлитных локусов. С помощью SSR-маркеров проведено генотипирование всех полученных через культуру меристем безвирусных микроклонов каждого сорта картофеля, что позволяет как осуществлять контроль генетической подлинности и соответствие растений-регенерантов, полученных из культуры апикальных меристем, исходному сорту, так и защитить авторские права селекционера на созданные сорта.

Таким образом, на сегодняшний день отобраны и готовы для передачи на госсортоиспытание четыре наиболее перспективные образца столового картофеля. По каждому образцу получены безвирусные клубни первого полевого поколения 5 клонов.

Ключевые слова: *картофель, селекция, новые сорта, безвирусный семенной материал, молекулярные маркеры*

APPLICATION OF COMPLEX APPROACH FOR OPTIMIZATION OF POTATO BREEDING PROCESS: PRACTICAL BREEDING PROGRAM OF THE PRIVATE COMPANY (DOKAGENE TECHNOLOGIES LLC)

A. Sakharova[1], E. Snigir[2], T. Suprunova[1]
LLC "DokaGene Technologies", Rogachevo, Dmitrovsky district, Moscow region, Russia,
e-mail: *breedcenter@dokagene.ru*
LLC "TransGene", Rogachevo, Dmitrovsky district, Moscow region, Russia,
e-mail: *e.snigir@dokagene.ru*

The Breeding and Genetic Center of the DokaGene Technologies LLC has started own breeding program of development of new table varieties of potato (*Solanum tuberosum* L.) in collaboration with local and foreign breeding companies. We work with more than 40 advanced breeding clones and more than 100 initial breeding lines from CIP collection.

The complex approach is aimed at optimization and acceleration of the potato breeding process. Along with the conventional breeding methods we use marker-assisted selection (MAS) based on utilization of DNA-markers.

Throughout of development of new varieties we use the DNA-markers for screening of the initial breeding material, the advanced breeding clones, and the varieties from our collection for genes/loci of resistance to four viruses (PVY, PVX, PVS, and PVM), two species of nematodes (*Globodera rostochiensis, G.pallida*), and two soil fungi (*Phytophthora infestans, Verticillium dahliae*). Such approach allows to select the desirable lines – the sources of gene extreme resistance to the main viruses and potato cyst nematodes from various wild species of potato. Selection of desirable lines based on genotypes rather than phenotype, analysis of plants at the seedling stage, screening of multiple characters, control the introgression of genetic material into progeny are just some of the advantages of marker-assisted selection.

Application of screening by diagnostic DNA-based markers increases the selection efficiency, decreases the amount of analyzed potato clones during preliminary variety trial and reduces the breeding process up to 7 years to release new varieties.

Beside this, our company produce virus free potato seeds of new developed varieties at the earliest stage of breeding process. To obtain virus-free plant material, the apical meristem culture in combination with chemo- and thermotherapy is used in our company. At all stages of development of virus-free plants ELISA and PCR tests are employed for virus and bacteria detection.

The genotyping analysis of all developed varieties is performed based on variability of nine microsatellites (SSR-simple sequence repeat). DNA-fingerprint of each potato variety was compared with DNA-fingerprint of each virus-free plant regenerated from apical meristem of these varieties to exclude the somaclonal variability of in vitro culture. Application of DNA-fingerprint based on microsatellites allows to protect the author's right on new developed potato varieties.

Currently, the virus-free tubers of the most promising four potato varieties were applied to the State Committee for the Testing of New Varieties of Agricultural Plants.

Keywords: *potato, breeding, new varieties, virus-free seed material,molecular markers*

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ КЛОНОВОГО ПОДВОЯ СЛИВЫ (*PRUNUS DOMESTICA* L.) ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ РАСТЕНИЙ УСТОЙЧИВЫХ К ВИРУСУ ШАРКИ

Т.Н. Сидорова [1,2], С.В. Долгов[1,2]
[1]Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, г.Пущино, России, e-mail: *sidorovat@rambler.ru*
[2]Никитский Ботанический Сад, г. Ялта, пгт Никита

Вирус Шарки (PPV) является серьезным карантинным вирусным заболеванием косточковых плодовых культур, приводящим к большим потерям урожая у сливы, вишни, абрикоса, персика. Отсутствие природных источников устойчивости к данному вирусу делает генетическую инженерию важным альтернативным методом для получения устойчивых растений. В настоящий момент известно несколько биотехнологических подходов получения растений устойчивых к вирусным заболеваниям. При этом наиболее эффективной стратегией является метод РНК-интерференции. Как показывают некоторые исследования, при использовании данной стратегии устойчивость к вирусу не способна передаваться от подвоя к привою. Поэтому для получения эффективной устойчивости в коммерческих садах косточковых плодовых деревьев необходимо иметь как подвой, так и привой, устойчивый к вирусу Шарки. В нашей лаборатории разработан метод генетической трансформации клонового подвоя «Элита-37-27-175» (*Prunus domestica* L.) с использованием листовых эксплантов. Использование соматических тканей для переноса гетерологичных последовательностей позволило получить трансгенные растения с сохранением оригинальных свойств клонового подвоя. Для генетической трансформации использовали вектор pCamPPVRNAi, несущий последовательности части гена PPV-CP, разделенных интроном. Благодаря отсроченному селективному отбору *In vitro* в сочетании с пошаговым повышением концентраций селективного антибиотика гигромицина получены трансгенные линии сливы, присутствие фрагмента PPV-CP у которых подтверждено ПЦР анализом.

Ключевые слова***:*** *Слива, Вирус Шарки, генетическая трансформация, регенерация растений*

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

GENETIC ENGINEERING OF PPV RESISTANCE IN COMMERCIAL PLUM ROOTSTOCK (*PRUNUS DOMESTICA* L.)

T.N. Sidorova[1,2], S.V. Dolgov[1,2]
[1] Branch of the Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia, e-mail: *sidorovat@rambler.ru*
[2] Nikita Botanical Gardens, Yalta, Russia

Plum pox virus (PPV) is the most serious viral disease of stone fruits such as plum, apricot, cherry and peach. The lack of natural resistant germplasms makes genetic engineering an important alternative approach to develop PPV resistance in plants. Several biotechnological approaches could be used; nonetheless the RNA interference is shown to be the most effective disease-control strategy. Transgenic grafted scions of woody plants, however, hardly translocate in rootstock tissues the molecular signaling (siRNA), that is required to induce virus resistance. For this reason the production of PPV resistant rootstock, besides the virus resistant cultivar, is highly recommended. To date, there have not been reports of successful transformation from a commercial plum rootstock. We developed an agrobacterium-mediated protocol for transformation of commercial plum rootstock 'Elita-37-27-175' (*Prunus domestica* L.) using leaf explants. The system enables the efficient plant regeneration with retention of the original rootstock traits of plum plants. pCamPPVRNAi vector containing the self-complementary sequences of fragment of PPV-CP gene separated by an intron to produce a "hairpin" RNA structure was created for transgenic plum generation. Transformed shoots were regenerated using a delayed selection strategy by increased concentration of hygromycin. A number of independent putative transgenic plum plants we produced from morphogenic callus developed on leaf explants within 5-6 month after the inoculation. PCR-analysis confirmed the transgenic status of produced plants by amplification of the fragments of "hairpin"-PPV-CP gene.

Keywords: *Plum, Plum pox virus, genetic transformation, plant regeneration*

Aknowlegment
This study was conducted with financial support of the Russian Science Foundation (project № 14-50-00079).

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ БИОРАЗНООБРАЗИЯ РАСТЕНИЙ РОДИОЛЫ РОЗОВОЙ

Тагиманова Д.С.[1], Хапилина О.Н.[1], Аменов А.А.[1], Данилова А.Н.[2], Календарь Р.Н.[1]
[1]РГП «Национальный центр биотехнологии», г. Астана, Казахстан,
e-mail: *tagds@mail.ru*
[2]РГП «Алтайский ботанический сад», г. Риддер, Казахстан

Одним из перспективных средств для описания биоразнообразия является ДНК-баркодирование с использованием определенных последовательностей как ядерной, так и митохондриальной и хлоропластной ДНК. Традиционно ядерный ген 18S рДНК является главным филогенетическим маркером для многих видов растений. Однако использование этого консервативного гена часто не может обеспечить достаточной вариабельности для разделения близкородственных видов, а, следовательно, надежно определить их таксономическую принадлежность. Ядерный ген 18S рДНК целесообразно использовать для разделения более эволюционно древних родов. Хлоропластный ген *rbcL*, кодирующий большую субъединицу фермента рибулозобифосфат-карбоксилазы, постепенно становится стандартным вторым маркером после 18S, и, как правило, топологии филогенетических деревьев, построенных на основе этих двух маркеров, совпадают.

Более вариабельные спейсерные ITS (*Internal Transcribed Spacer*) и IGS (*InterGenic Spacer*) регионы используют для изучения связей между видами в пределах родов или для анализа популяционного разнообразия. ITS регионы ДНК широко используются в исследованиях о генетическом разнообразии, филогенетики и эволюции вида. Эта область ДНК может быть амплифицирована с использованием универсальных праймеров, и в дальнейшем легко секвенирована в связи с тем, что имеет небольшой размер. Высокий уровень вариабельности делают данный метод идеальным для изучения генетического разнообразия и дифференциации популяций у многих видов.

Целью наших исследований являлось возможность применения праймеров для амплификации участков ITS, rusc, lal, PBS, SOD, для определения участка пригодного для ДНК-штрихкодирования. Материалом служили гербарные образцы растений родиолы розовой. Для формирование ДНК-коллекции использовали CTAB метод (с горячей экстракцией), поскольку при использовании данного метода происходит 100% выделение ДНК из всех генотипов и соотношение A260/280 соответствует качеству, которое необходимо при постановке ПЦР реакции.

Полученные данные свидетельствуют о том, что праймеры ITS 4- ITS5 могут быть использованы для амплификации гена ITS всех изучавшихся растений, причем размеры ампликонов составили около 550 bp, что соответствует ожидаемым результатам.

В процессе амплификации с праймерами к хлоропластному гену rusc были получены продукты, соответствующие ожидаемым, размер которых составил 980 bp.

Анализ результатов амплификации с праймерами к PBS-региону и SOD позволил выявить различия между исследуемыми популяциями.

В настоящее время проводится секвенирование изучаемых участков у растений, изолированных из разных образцов, с целью сравнения последовательностей нуклеотидов у нескольких линий одного вида и у разных видов одного рода.

Ключевые слова: *родиола, генетическое разнообразие, ДНК, амплификация, праймер, молекулярный маркер*

MOLECULAR MARKERS FOR THE STUDY OF BIODIVERSITY PLANT RHODIOLA ROSEA

D.S. Tagimanova[1], O.N. Khapilina[1], A.N. Danilova[2], A.A. Amenov[1], R.N. Kalendar[1]
[1]National Center for Biotechnology, Astana, Kazakhstan, e-mail: *tagds@mail.ru*
[2]Altai Botanical Garden, Ridder, Kazakhstan

One of the most promising tools for the description of biodiversity is a DNA barkodirovanie using specific sequences of both nuclear and mitochondrial and chloroplast DNA. Traditionally, nuclear 18S rDNA gene is the major phylogenetic marker for many plant species. However, this conservative genes often can not provide sufficient variability to separate closely related species, and thus to reliably determine their taxonomic affiliation. Nuclear 18S rDNA gene should be used to separate the more evolutionarily ancient families. Chloroplast gene rbcL, encoding the large subunit of the enzyme carboxylase ribulozobifosfat gradually becomes standard when the second marker 18S, and usually, the topology of the phylogenetic tree constructed based on these two markers coincide.

More variable spacer ITS (Internal Transcribed Spacer) and IGS (InterGenic Spacer) regions are used to study the relationships between species within the genus or for the analysis of population diversity. ITS DNA regions commonly used in studies of genetic diversity, phylogeny and evolution of species. This region of DNA may be amplified using universal primers and subsequently sequenced easily due to the fact that it has a small size. A high level of variability make this an ideal method for the study of genetic diversity and differentiation of populations in many species.

The aim of our study was the possibility of using the primers to amplify ITS areas, rusc, lal, PBS, SOD, for determining the area suitable for DNA barcoding. The material served herbarium specimens of plants Rhodiola rosea. For the formation of the DNA-collection using the CTAB method (hot extraction), because when you use this method, there is 100% recovery of DNA from all genotypes and A260 / 280 ratio corresponds to the quality that is necessary for PCR amplification reaction.

The data indicate that the primers ITS 4- ITS5 can be used for gene amplification of ITS plants studied, the amplicon sizes were approximately 550 bp, which corresponds to the expected results.

In the course of the amplification products with primers were obtained by chloroplast gene rusc, corresponding to the expected size of which amounted to 980 bp.

Analysis of the results of amplification with primers to the PBS-region and SOD revealed differences between the study populations.

The sequencing is currently being studied in plants portions isolated from various samples, in order to compare the nucleotide sequences of several lines from the same species, and among species of the same genus.

Keywords: *Rhodiola, genetic diversity, DNA amplification, primer, molecular marker*

СОЗДАНИЕ БЕЗМАРКЕРНЫХ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ЯБЛОНИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИНДУЦИБЕЛЬНОЙ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ РЕКОМБИНАЗЫ И БИФУНКЦИОНАЛЬНОГО СЕЛЕКТИВНОГО ГЕНА

В.Р. Тимербаев[1,2,3], Т.Ю.Митюшкина[1,2,3], С.В.Долгов[1,2,3]
[1]Никитский ботанический сад – Национальный научный центр, Республика Крым, г. Ялта, Никита, Россия, e-mail: *timerbaev@gmail.com*
[2]Филиал ФГБУН Института биоорганической химии имени академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, г. Пущино, Россия
[3]ФГБНУ ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии, г. Москва, Россия

Присутствие маркерных генов в ГМ растениях вызывает беспокойство в обществе из-за опасений, связанных с рисками для окружающей среды и здоровья человека. Создание трансгенных растений, не содержащих генетического материала бактериального и вирусного происхождения, во многом позволяет снизить напряжённость.

В нашем исследовании для получения безмаркерных трансгенных растений яблони мы использовали векторную систему pMF (Plant Research International, Вагенинген, Нидерланды), содержащий рекомбиназу R из дрожжей *Zygosaccharomyces rouxii* слитую с лиганд-связывающим доменом глюкокортикоидного рецептора, а также бифункциональный селективный ген *CodA-nptII*, позволяющий проводить отбор растений после удаления из генома нежелательной области ДНК за счет негативной селекции на 5-флюороцитозине (5-ФЦ). В качестве смыслового выступает ген суперсладкого белка тауматинаII из тропического растения *Thaumatococcus daniellii* под контролем плодоспецифического промотора гена *E8* томата и терминатора гена *rbcS3A* томата.

Нами было получено три независимых трансгенных линии яблони, которые были тщательно проанализированы методом ПЦР с использованием семи пар праймеров на наличие всех генов из области Т-ДНК и присутствие обоих сайтов рекомбинации. Две из них содержали неполную последовательность Т-ДНК –отсутствовал сайт рекомбинации (RS) у левого бордера. Эти линии были исключены из дальнейших экспериментов, поскольку присутствие обоих сайтов рекомбинации обязательное условие для процесса вырезания. Далее для получения безмаркерных растений яблони мы применили отсроченную стратегию селекции. После активации рекомбиназы в листовыхэксплантах проверенной линии яблони нами было получено более 30 сублиний, растущих на селективной среде с 5-ФЦ. ПЦР-анализ выявил, что все нежелательные гены и последовательности, располагавшиеся между RS сайтами, удалены, тогда как ген интереса с регуляторными последовательностями присутствует во всех полученных растениях.

Таким образом, с использованием вектора, собранного на основе системы pMF нами был разработан протокол для получения безмаркерных растений яблони.

Ключевые слова: *безмаркерные растения, яблоня, Malus x domestica, тауматин II*

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

PRODUCTION OF MARKER-FREE TRANSGENIC APPLE PLANTS USING INDUCIBLE SITE-SPECIFIC RECOMBINASE AND A BIFUNCTIONAL SELECTABLE GENE

V.R. Timerbaev[1,2,3], T.Yu. Mitiouchkina[1,2,3], S.V. Dolgov[1,2,3]
[1]Nikita Botanical Gardens – National Scientific Center, Crimea, Yalta, Nikita, Russia,
e-mail: *timerbaev@gmail.com*
[2]Branch of Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Pushchino,Russia
[3]All-Russia ResearchInstitute of Agricultural Biotechnology, Moscow, Russia

The presence of marker genes in GM plants is of concern in society due to fears associated with risks for the environment and human health. Creation of transgenic plants that do not contain the foreign genetic material, especially bacterial and viral origin largely alleviates the tension.

Here we used the pMF system (Plant Research International, Wageningen, Netherlands) containing of the *Z. rouxii* R recombinase and a *CodA-nptII* bifunctional selectable gene for produce marker-free transgenic applecarrying the super sweet thaumatin II gene from tropical plant *Thaumatococcus daniellii* under control of tomato E8 gene promoter and rbsS3A terminator. We have obtained three independent transgenic lines that have been thoroughly analyzed by PCR for the presence of T-DNA sequences using seven pairs of primers. Two of them contained a partial sequence of the T-DNA – recombination site (RS) near left border was missed. We then used the delayed strategy for the selection of marker-free plants with one checked line. After induction of recombinase activity in leaf explants we have obtained on selective media with 5-fluorocytosinemore than 30sublines, most of them lost their resistance to kanamycin.PCR analysis revealed that all undesirable genes and sequences between RS sites were removed by recombination process while gene of interest with regulatory elements is present in all obtained plants.So, using vector based on pMF system we developed acceptable protocol for production marker-free transgenic apple plants.

Keywords: *marker-free plants, apple, Malus x domestica, thaumatin II*

Aknowlegment
This study was conducted with financial support of the Russian Science Foundation (project № 14-50-00079).

АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ РЕДКОГО И ЭНДЕМИЧНОГО ВИДА *ALLIUM REGELIANUM* НА ОСНОВЕ ДАННЫХ NBS-ПРОФАЙЛИНГА

А.А. Трифонова[1], Е.З. Кочиева[2], А.М. Кудрявцев[3]
[1]Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, г. Москва, Россия, e-mail*: aichka89@mail.ru*
[2]Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии" Российской академии наук, г. Москва, Россия,
e-mail: *ekochieva@yandex.ru*
[3]Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, г. Москва, Россия, e-mail: *kudryav@vigg.ru*

Впервые проведено исследование генетического разнообразия редкого и эндемичного вида *Allium regelianum* A.K. Becker ex Iljin (лук регелевский), произрастающего на юге России, на основании данных анализа полиморфизма последовательностей семейства NBS-LRR генов устойчивости с использованием метода NBS-профайлинга. NBS-профайлинг – это система маркирования полиморфизма семейства генов устойчивости растений с помощью специфичных праймеров, гомологичных основным консервативным мотивам NBS-домена данного семейства генов. В работе были проанализированы 84 образца *A. regelianum*, включая 76 образцов, собранных на территории Волгоградской области сотрудниками Волгоградского регионального ботанического сада, и восемь образцов из других регионов России (Астраханская, Воронежская, Ростовская области, республики Калмыкия и Крым), полученные из гербарных коллекций ГБС им. Цицина РАН и МГУ имени М.В. Ломоносова. В качестве внешней группы для *A. regelianum* были взяты другие представители рода *Allium*, принадлежащие к различным секциям: секция *Allium* – *A. ampeloprasum*, *A. sativum*, *A. porrum*, *A. tuncelianum*, *A. rotundum*; секция *Rhizirideum* – *A. nutans*; секция *Cepa* – *A. altaicum*.

Для анализа полиморфизма последовательностей NBS-LRR генов устойчивости были использованы четыре комбинации праймер/фермент – NBS2/Tru1I, NBS3/Tru1I NBS5/Tru1I и NBS9/Tru1I. Всего было получено 250 фрагментов (67 фрагментов для праймера NBS2, 66 – для праймера NBS3, 56 – для праймера NBS5, 61 – для праймера NBS9) из которых 105 (42%) были полиморфными. Величина коэффициента генетического сходства Дайса варьировала от 0,02 (между двумя образцами *A. regelianum* из одной популяции Волгоградской области, Серафимовичского района) до 0,52 (между образцами *A. regelianum* (Волгограсдкая область, Николаевский район) и *A. nutans*). Анализ методом главных координат показал достаточно слабую генетическую дифференциацию образцов *A. regelianum*, на графике исследуемые образцы, в том числе из разных регионов образуют смешанную группу без подразделения по месту произрастания. *A. ampeloprasum*, *A. sativum*, *A. porrum*, *A. tuncelianum*, *A. rotundum* (секция *Allium*) располагаются на графике рядом с образцами *A. regelianum* (классификация по морфологическим признакам относит вид *A. regelianum* к секции *Allium*), а виды секций *Rhizirideum* и *Cepa* более обособлены от образцов *A. regelianum*.

Таким образом, проведенный NBS-профайлинг позволил выявить и оценить уровень внутривидового полиморфизма последовательностей семейства NBS-LRR генов устойчивости у редкого вида *A. regelianum* и может служить эффективным методом для оценки внутривидового полиморфизма, в том числе и редких видов растений.

Ключевые слова: *Allium regelianum*, *генетическое разнообразие, гены устойчивости*

ANALYSIS OF GENETIC DIVERSITY IN RARE AND ENDEMIC SPECIES *ALLIUM REGELIANUM* A.K. BECKER EX ILJIN WITH THE USE OF NBS-PROFILING

A.A. Trifonova[1], E.Z. Kochieva[2] and A.M. Kudryavtsev[3]
[1]Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, e-mail: *aichka89@mail.ru*
[2]Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, e-mail*: ekochieva@yandex.ru*
[3]Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, e-mail: *kudryav@vigg.ru*

Analysis of genetic diversity in rare and endemic species *Allium regelianum* which grows in the south of Russia based on polymorphism of sequences of NBS-LRR resistant gene family which detected using NBS-profiling, was performed for the first time. NBS-profiling it is the system of detecting polymorphism of NBS-LRR gene family of plant using specific primers, which homologous to conserved motifs of NBS-domain of this gene family. 84 samples of *A. regelianum*, including 76 samples from Volgograd region (provided by Volgograd Regional Botanical Garden) and 8 samples from other regions of Russia (Astrakhan, Voronezh, Rostov Region, Republic of Kalmykia and the Crimea) (obtained from the herbarium collection of Main Botanical Garden named after N.V. Tsitsin RAS and Lomonosov Moscow State University) were used in analysis. Other members of the genus *Allium* from different sections (section *Allium – A. ampeloprasum*, *A. sativum*, *A. porrum*, *A. tuncelianum*, *A. rotundum*; section *Rhizirideum – A. nutans*; section *Cepa – A. altaicum*) was used as external group for *A. regelianum*.

Four combinations primer/ restriction enzymes (NBS2/Tru1I, NBS3/Tru1I NBS5/Tru1I и NBS9/Tru1I) were used to analyze polymorphism of sequences of NBS-LRR resistant genes. A total of 250 fragments (67 fragments for NBS2, 66 for NBS3, 56 for NBS5, 61 for NBS9) were obtained, 105 of which were polymorphic. The Dise similarity indices varied from 0,02 (between two samples of *A. regelianum* from population of Volgograd region, Serafimovichsky area) to 0,52 (between *A. regelianum* (Volgograd region, Nikolaevsky area) and *A. nutans*). Principal coordinate analysis reveals quite weak genetic differentiation of samples *A. regelianum.* Samples of *A. regelianum* from different regions formed mixed group, without geographical separation. *A. ampeloprasum*, *A. sativum*, *A. porrum*, *A. tuncelianum*, *A. rotundum* (section *Allium*) are located next to *A. regelianum* (*A. regelianum* refer to section *Allium* using morphologically classification). Species of sections *Rhizirideum* and *Cepa* more isolated from *A. regelianum.*

Thus NBS- profiling made it possible to identify and assess the level of intraspecific polymorphisms of sequences of NBS-LRR resistant genes in rare species *Allium regelianum.* This method can be effective for evaluate intraspecific polymorphisms, including in rare plant species.

Keywords: *Allium regelianum*, *genetic diversity, resistance gene*

ВЛИЯНИЕ ЦИТОЗИНОВОГО МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК НА ПРОДУКЦИЮ СТИЛЬБЕНОВ В КЛЕТКАХ АМУРСКОГО ВИНОГРАДА *VITIS AMURENSIS* RUPR.

А.П. Тюнин, К.В. Киселев
Федеральное Государственное Учреждение Науки Биолого-почвенный институт Дальневосточного отделения Российской академии наук (ФГБУН БПИ ДВО РАН), г. Владивосток, Россия, e-mail: *tyunin@biosoil.ru*; *kiselev@biosoil.ru*

Метилирование ДНК является важным эпигенетическим фактором контроля экспрессии генов и поддержания стабильности генома. В клетках высших растений метилированию подвергаются цитозиновые нуклеотиды в составе ДНК (Law and Jacobsen, 2010). Метилирование ДНК регулирует экспрессию генов на разных этапах онтогенеза растений, взаимодействуя с ферментами, модифицирующими белки хроматина. Цитозиновое метилирование в составе промоторной области гена и метилирование протеин-кодирующей части гена подавляет генную экспрессию в растительной клетке (Meyer, 2010). В клетках метилирование осуществляется энзиматически – ферментами метилазами, в составе сложных ферментативных комплексов.

Учитывая значимость цитозинового метилирования ДНК в процессе регуляции экспрессии генов, изучение роли данного эпигенетического фактора в регуляции биосинтеза вторичных метаболитов растений, многие из которых обладают ценными фармакологическими свойствами, является перспективным направлением биотехнологии растений. В частности, работы, проведенные на клеточной культуре амурского винограда *Vitis amurensis* Rupr., свидетельствуют в пользу участия системы цитозинового метилирования в регуляции экспрессии генов биосинтеза стильбенов. Стильбены растений рода *Vitis* являются небольшой группой фенольных соединений, структурных производных 3,5,4'-транс-тригидроксистильбена (резвератрола). Резвератрол – ценное биологически активное вещество, известный антиоксидант, обладающий способностью предупреждать развитие злокачественных образований, и имеющий большой потенциал для создания на его основе биологически активных добавок и лекарственных средств (Shankar et al., 2007). Биосинтез резвератрола осуществляется фенилпропаноидным путем (Langcake and Pryce, 1977). Стильбен синтаза (STS, EC 2.3.1.95) – фермент, непосредственно катализирующий реакцию образования резвератрола. В геноме стильбен-продуцирующих растений STS представлен мультигенным семейством (Kiselev, 2011). В геноме *V. amurensis* на данный момент описано 10 экспрессирующихся генов *VaSTS*. Действие ультрафиолета или сигнальной молекулы стресса – салициловой кислоты на клетки *V. amurensis* статистически достоверно увеличивает экспрессию отдельных генов *VaSTS*, что ведет к увеличению уровня содержания резвератрола и его производных. Изучение изменения уровня цитозинового метилирования в составе генов *VaSTS,* в клетках *V. amurensis* при нормальных условиях и под действием упомянутых индукторов биосинтеза стильбенов, выявило обратную зависимость между показателями их экспрессии и содержанием метилцитозина. Таким образом, высокий уровень цитозинового метилирования характерный для генов *VaSTS* со слабым уровнем экспрессии значительно снижается при увеличении экспрессии данных генов под действием индукторов биосинтеза стильбенов на клетки *V. amurensis*. Более того, действие ингибитора цитозинового метилирования - 5-азацитидина на клетки *V. amurensis* приводило к двукратному увеличению продукции резвератрола. Данный процесс сопровождался уменьшением количества метилированных цитозиновых нуклеотидов в составе генов *VaSTS* увеличивших свою экспрессию. Таким образом, воздействие на систему цитозинового метилирования ДНК, можно рассматривать как перспективное направление в области коммерческой биотехнологии растений.

Ключевые слова: *Vitis amurensis Rupr., цитозиновое метилирование ДНК, стильбены, резвератрол, гены STS*

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (14-14-00366).

THE EFFECT OF CYTOSINE DNA METHYLATION ON STILBENES PRODUCTION IN CELLS OF AMUR GRAPE *VITIS AMURENSIS* RUPR.

A.P. Tyunin, K.V. Kiselev
Institute of Biology and Soil Science, Far East Branch of Russian Academy of Sciences (IBSS FEB RAS), Vladivostok, Russia, e-mail: *tyunin@biosoil.ru*; *kiselev@biosoil.ru*

DNA methylation plays an essential role in gene expression regulation and genome stability maintenance. In cells of higher plants methylation occurs mainly at cytosine nucleotide residues (Law and Jacobsen, 2010). DNA methylation is known to regulate gene expression in cooperation with enzymes responsible for chromatin remodeling. Methylation of cytosine nucleotides located within promoter and protein-coding is able to repress gene expression (Meyer, 2010). In plant cells methylation of cytosine nucleotides occurs enzymatically, by ezymes called methylases working as a part of multicomponent complexes.

Considering the significance of cytosine methylation in regulation of gene expression the role of this epigenetic factor in control of plant secondary metabolites production should be preciously described. Thus, studies conducted on cell culture of amur grape *Vitis amurensis* Rupr., evidence involvement of cytosine DNA methylation in stilbene biosynthesis genes regulation. Stilbenes synthesizing by plants of *Vitis* genus is a relatively small group of phenol compounds, based on the structure of 3,5,4'-trihydroxy-*trans*-stilbene (resveratrol). Resveratrol is a naturally occurring phenol that has been reported to exhibit a wide range of important biological and pharmacological properties (Shankar et al., 2007). Resveratrol biosynthesis occurs via the phenylpropanoids pathway (Langcake and Pryce, 1977). Stilbene synthase is the enzyme that directly catalizes the reaction of resveratrol formation. In the genome of stilbene-producing plants mentioned enzyme is represented as a multigene family of closely-related genes (Kiselev, 2011). Moreover, 10 expressing *VaSTS* genes are described for *V. amurensis*. Our experiments observed the significant enhancement in gene expression of certain *VaSTS* genes accompanied with increasing in stilbenes accumulation in *V. amurensis* cells treated with salicylic acid or ultraviolet. In addition, the clear negative correlation was observed between the level of *VaSTS* expression and the level of cytosine methylation within their nucleotide sequences. Hence, high level of cytosine methylation observed in low-expressing *VaSTS* isoforms drastically decreased in response to up-regulation of their expression. Furthermore, treatment of *V. amurensis* cells with the inhibitor of cytosine methylation called 5-azacytidine resulted in twofold enhancement of resveratrol production rate. This process was accompanied with reduction of cytosine methylation level within *VaSTS* genes up-regulated by 5-azacytidine treatment. Then, direct manipulation with the cytosine methylation machinery could be a promising method in field of plant biotechnology.

Keywords: *Vitis amurensis* Rupr., *cytosine DNA methylation, stilbenes, resveratrol, STS genes.*

Aknowlegment
This work was supported by grant 14-14-00366 of Russian Science Foundation.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ И ОЦЕНКИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ЛЕСНЫХ РЕСУРСОВ

Т.П. Федулова, А.М. Кондратьева, С.Г. Ржевский
Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии, г. Воронеж, Россия, e-mail: *labmolgen@mail.ru*

В настоящее время генетические маркеры широко применяются на практике при изучении генетического разнообразия организмов, картировании геномов, локусов количественных признаков. Маркеры ДНК применяются при оценке и генотипировании растительного материала, подборе родительских пар для гибридизации, создании гибридов и селекционно улучшенного посадочного материала, получении патентов на сорта. Использование микросателлитных (SSR) маркеров является одним из самых информативных методов, применяемых при исследовании внутри- и межвидовой изменчивости, а также идентификации и паспортизации перспективных биотипов древесных растений.

SSR-маркеры обладают рядом необходимых для этого требований: Микросателлитные последовательности высокополиморфны вследствие варьирования длины повтора, распространены по всему геному (присутствуют в ядерной, хлоропластной и митохондриальной ДНК). Не зависят от условий окружающей среды. Кодоминантный характер наследования, позволяющий распознать гомо- и гетерозиготные генотипы. При выборе SSR-маркеров также важны низкие затраты и непродолжительное время на проведение анализа, воспроизводимость полученных результатов.

Цель наших исследований заключалась в проведении молекулярно-генетической оценки разноплоидных гибридов тополя белого (*Populus alba* L.), сереющего (*P. canescens* Sm.), перспективных биотипов березы повислой (*Betula pendula* Roth), пушистой *(Betula pubescens* Ehrh.) и гибридной, а также размноженных *in vitro* клонов тополя и осины. Из протестированных микросателлитов отобраны наиболее информативные полиморфные локусы для идентификации биотипов тополя, осины (PMGC2060, PMGC2571, PMGS2679, PMGC2852, PMGC433, WPMS5, WPMS12, WPMS14, WPMS20, ORPM344) и березы (L1.10, L2.3, L3.1, L3.4, L4.4, L5.4, L7.3, L7.4 и Bo.F394).

Результаты исследований показали широкие возможности для использования микросателлитных маркеров. Так доказано отсутствие генетических различий по изученным локусам в исследованных образцах, размноженных микроклонально, и длительно хранящихся *in vitro*. Подтвержена внутриклоновая генетическая однородность размноженных *in vitro* клонов осины, произрастающих в питомнике. Мультилокусные генетические паспорта для исследованных биотипов тополя и осины составлены на основании матриц наличия (1) и отсутствия (0) 34 амплифицированных фрагментов в перечисленных локусах (пример мультилокусного паспорта генотипа тополя – 1011001001100010010101010010100101). Паспорта для генотипов березы основаны на наличии или отсутствии 27 ампликонов и также представлены в виде двоичного кода (например, 001001010010110010100011010).

Отобранные микросателлиты могут быть рекомендованы для проведения молекулярно-генетической паспортизации и идентификации взрослых деревьев и посадочного материала тополя, осины, березы в комплексе с другими типами генетических, морфологических, цитологических маркеров.

Ключевые слова: *Populus*, *Betula*, *SSR, микросателлиты, паспортизация*

USE OF MICROSATELLITE MARKERS FOR IDENTIFICATION AND EVALUATION OF GENETIC DIVERSITY OF FOREST RESOURCES

T.P. Fedulova, A.M. Kondratyeva, S.G. Rzhevsky
All-Russian Research Institute of Forest Genetics, Breeding and Biotechnology, Voronezh, Russia, e-mail: *labmolgen@mail.ru*

Currently genetic markers are widely used in practice in the study of genetic diversity of organisms, genome mapping, quantitative trait loci. DNA markers are used for genotyping and evaluation of plant material, the selection of parental pairs for hybridization, the creation of hybrids and breeding of improved planting material, patenting sorts. Using microsatellites (SSR-markers) is one of the most informative methods for study of intra- and interspecific variability, as well as the identification and certification of advanced biotypes of woody plants.

SSR-markers have a number of the necessary requirements. Microsatellites are high-polymorphic due variation of repeat length, distributed throughout the genome (they are present in the nuclear, chloroplast and mitochondrial DNA), do not depended on the environmental conditions. Co-dominant inheritance allows identifying homo- and heterozygotic genotypes. Also SSR-analysis is characterized by low cost, short time and high repeatability of results.

The aim of our research was to conduct molecular genetic evaluation of heteroploid poplar hybrids (*Populus alba* L. and *P. canescens* Sm.), perspective birch biotypes (*Betula pendula* Roth, *Betula pubescens* Ehrh. and birch hybrids) and micropropagated clones of poplar and aspen. The most informative polymorphic loci of the tested microsatellites to identify biotypes of poplar, aspen (PMGC2060, PMGC2571, PMGS2679, PMGC2852, PMGC433, WPMS5, WPMS12, WPMS14, WPMS20, ORPM344) and birch (L1.10, L2.3, L3.1, L3.4, L4.4, L5.4, L7.3, L7.4 and Bo.F394) were selected.

The results showed wide opportunities for used of microsatellite markers. Interclonal genetic uniformity of micropropagated aspen clones is confirmed. Multilocus genetic passports of poplar and aspen biotypes are based on the presence (1) and absence (0) of 34 amplified fragments of studied loci (for example multilocus genotype passports of poplar – 1011001001100010010101010010100101). Passports of birch genotypes are based on the presence or absence of 27 amplicons and are also represented in binary form (for example, 001001010010110010100011010).

Selected microsatellites can be recommended for molecular genetic certification and identification of mature trees and planting material of poplar, aspen, birch, in combination with other types of genetic, morphological, cytological markers.

Keywords: *Populus, Betula*, SSR, *microsatellites, certification*

АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОМА ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕКЦИИ *ALLIUM* РОДА *ALLIUM* МЕТОДОМ AFLP

М.А. Филюшин
Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии" Российской академии наук, г. Москва, Россия,
e-mail: *michel7753@mail.ru*

Секция *Allium* включает около 120 видов растений, первичным центром происхождения которых считается Центральная Азия и Средиземноморье. К данной секции относятся такие важные овощные культуры как чеснок *A. sativum* и лук-порей *A. porrum*, многие виды данной секции являются редкими и эндемичными.

Для анализа геномного полиморфизма у представителей секции *Allium* методом AFLP был сформирован набор ДНК из 64 образцов, 47 из которых относятся к 16 видам секции *Allium*. Растительный материал видов секции *Allium* был предоставлен доктором Н. Фризеном (Ботанический сад Оснабрюкского университета, Германия). В качестве внешней группы были взяты образцы 8 видов из других секций рода *Allium*, а также 5 видов из других родов порядка Asparagales.

Для проведения AFLP-анализа было отобрано шесть пар AFLP-праймеров с различным числом селективных нуклеотидов. В результате проведенного AFLP-анализа с отобранными праймерными парами для каждого из 64 образцов были получены специфичные AFLP-спектры, число фрагментов на праймерную пару варьировало от 91 до 129. Всего было идентифицировано 613 фрагментов, из них 279 (45,5%) были полиморфными для представителей секции *Allium*.

Рассчитанные по результатам AFLP-анализа генетические расстояния (Nei-Li) между видами секции *Allium* варьировали от 0,034 до 0,11, среднее значение коэффициента генетических расстояний составило 0,07, что свидетельствует о низком уровне межвидового полиморфизма. Генетические расстояния между видами секции *Allium* и видами луков из других секций варьировали от 0,18 до 0,34.

На основе рассчитаных матриц расстояний была построена дендрограмма. На дендрограмме практически все исследуемые виды секции *Allium* сформировали обособленные видовые кластеры с высоким индексом бутстреп-поддержки. Образцы вида *A. sativum* сформировали единый подкластер с *A. longicuspis*, который по результатам проведенных ранее молекулярных исследований считается наиболее вероятным предком современного чеснока. Образцы эндемичного вида *A. tuncelianum* сформировали обособленный кластер, близкий к подкластеру *A. sativum*, что может свидетельствовать о родстве двух этих видов. Образцы *A. ampeloprasum* сформировали единый полиморфный подкластер, базальное положение относительно которого занимает подкластер *A. porrum*, что может подтверждать видовой статус последнего, хотя многие исследователи считают лук-порей подвидом *A. ampeloprasum*.

Таким образом, методом AFLP был проведен анализ полиморфизма генома видов секции *Allium*, в результате проведенного филогенетического анализа были выявлены вероятные предки культурных видов *A. sativum* и *A. porrum*, а также подтвержден таксономический статус некоторых образцов.

Ключевые слова: *секция Allium, Allium sativum, AFLP*

AFLP-ANALYSIS OF SECTION *ALLIUM* SPECIES GENOME POLYMORPHISM

M. A. Filyushin
Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, e-mail: *michel7753@mail.ru*

Section *Allium* comprises about 120 plant species; Central Asia and the Mediterranean region are considered to be their primary center of origin. Such important vegetable crops like garlic (*A. sativum*) and leek (*A. porrum*) belong to this section; many species of this section are rare and endemic.

To study genome polymorphism in the section *Allium* representatives using AFLP, a DNA set of 64 accessions was formed, 47 of which belong to 16 species of the section *Allium*. Plant material was provided by Doctor N. Friesen (from the Botanical garden of Osnabruck University, Germany). 8 species of the other sections of the genus *Allium*, and 5 species from other genera of the order Asparagales were taken as an out-group.

Six primer pairs with different number of selective nucleotides were taken for AFLP-analysis. As a result for each of the 64 studied accessions specific AFLP-patterns were obtained. The number of fragments for each primer pair varied from 91 to 129. In total 613 fragments were identified, of which 279 (45.5%) were polymorphic for section *Allium* representatives.

Genetic distances (Nei-Li) between section *Allium* species calculated from the AFLP data varied from 0,034 to 0,11, average genetic distance coefficient was 0,07, indicating a low interspecific polymorphism level. Genetic distances between section *Allium* species and studied species from other sections varied from 0.18 to 0.34.

On the basis of the obtained AFLP data a phylogenetic tree was constructed. On the dendrogram almost all of the studied section *Allium* species formed separate species clusters with high bootstrap support index. *A. sativum* accessions formed a single subcluster with *A. longicuspis*, which is considered to be the most likely ancestor of modern garlic based on the results of some molecular studies. Endemic species *A. tuncelianum* accessions formed a separate cluster, close to the *A. sativum* subcluster, which may indicate that these two species are closely related. *A. ampeloprasum* accessions formed a single polymorphic subcluster. Basal position to this subcluster takes *A. porrum* subcluster, which could confirm the species status of the latter, although many researchers believe leek to be *A. ampeloprasum* subspecies.

Thus AFLP analysis was used to study genome polymorphism in the Section *Allium* species. As a result of the phylogenetic analysis the likely ancestors of the cultivated species *A. sativum* and *A. porrum* have been identified, and taxonomic status of some accessions was confirmed.

Keywords: *section Allium, Allium sativum, AFLP*

СЕКЦИЯ 5.
SESSION 5.

БИОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ РАСТИТЕЛЬНОГО ГЕНОФОНДА, ПОЛУЧЕНИЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

BIOCHEMICAL STUDIES OF PLANT GERMPLASM; SYNTHESIS AND USAGE OF BIOLOGICAL ACTIVE SUBSTANCES

ПОЛУЧЕНИЕ *IN VITRO* КУЛЬТУР ГРЕЧИХИ ТАТАРСКОЙ С ВЫСОКИМ СОДЕРЖАНИЕМ РУТИНА

А.Н. Акулов[1,2], Е.А. Гумерова[1], Н.И. Румянцева[1,2]
[1]ФГБУН Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, г. Казань, Россия,
e-mail: *nat_rumyantseva@mail.ru*
[2]ФГАОУ ВО "Казанский федеральный университет", г. Казань, Россия,
e-mail: *akulov_anton@mail.ru*

Разработаны методы и подходы, связанные с получением и выращиванием клеточных культур гречихи татарской, которая, значительно превосходит гречиху посевную по общему содержанию фенольных соединений и, в частности, рутина (почти в 200 раз). Все методы, связанные с получением, отбором и выращиванием клеточных культур гречихи, являются оригинальными и были разработаны в нашей лаборатории.

Нами было показано, что морфогенные линии каллусных и суспензионных культур гречихи татарской, в отличие от неморфогенных, отличаются более активным синтезом (4,5 и 22,1 против 1,2 и 3,4 мг/г сух веса), а также более широким спектром фенольных соединений. Нами были идентифицированы галловая, феруловая, *п*-кумаровая кислоты, рутин, эпикатехин, кверцитин, кверцитрин. Содержание рутина в этих культурах составляло 0,47 и 3,52 мг/г сух веса, соответственно. В результате селекции нами были получены каллусные культуры гречихи татарской, обладающие повышенной (9,34 мг/г сух веса) по сравнению с исходными линиями способностью к синтезу фенольных соединений. Было выявлено, что перевод каллусной культуры в суспензионную усиливает фенольный метаболизм и активирует синтез рутина в 2,33 и 7,5 раз в зависимости от линии. В результате модификации питательных сред, а именно, исключения гидролизата казеина при одновременной замене минеральных солей B5 на MS, мы наблюдали увеличение синтеза фенольных соединений и рутина как в каллусных (11,79 и 3,67 мг/г сух веса, соответственно), так и суспензионных культурах (28,68 и 8,35 мг/г сух веса, соответственно). Следует отметить, что суспензионные культуры по сравнению с каллусными отличает высокий пророст биомассы (в 20 раз). Кроме того, отвердители питательных сред – агар-агар и его заменители – достаточно дорогие реактивы, поэтому выращивание клеток растений в виде суспензионных культур значительно снижает себестоимость технологии. В результате проведённой оптимизации нами были получены морфогенные суспензионные культуры гречихи татарской, отличающиеся активным синтезом фенольных соединений, в частности рутина (8,35 мг/г сух веса), хорошим нарастанием биомассы и выращиваемые на средах, не содержащих дорогих компонентов. Поскольку фармацевтически чистый рутин в нашей стране не производится, разработка технологии получения его из культивируемых клеток гречихи татарской может быть удачным предложением по импортозамещению.

Ключевые слова: *гречиха татарская, каллусные культуры, суспензионные культуры, фенольный метаболизм, синтез рутина*

ESTABLISHMENT OF *IN VITRO* TARTARY BUCKWHEAT CULTURES WITH HIGH RUTIN CONTENT

A.N. Akulov[1,2], E.A. Gumerova[1], N.I. Rumyantseva[1,2]
[1]Kazan Institute of biophysics and biochemistry, RAS, Kazan, Russia,
e-mail: *nat_rumyantseva@mail.ru*
[2]Kazan Federal University, Kazan, Russia, e-mail: *akulov_anton@mail.ru*

The methods and approaches connected with obtaining and cultivation of cell cultures of tartary buckwheat which considerably exceeded common buckwheat in total content of phenolic compounds and rutin in particular (almost by 200 times) are developed. All methods of establishment, selection and maintaining of buckwheat cell cultures are original and have been developed in our laboratory.

We have shown that the morphogenic callus and suspension cultures of tartary buckwheat, unlike non-morphogenic ones have more active phenolic synthesis (4.5 and 22.1 against 1.2 и 3.4 mg/g DW), as well as a wider range of HPLC detected phenolic compounds. We have identified among them gallic, ferulic, *n*-coumaric acids, rutin, epicatechin, quercetin and quercitrin. The content of rutin in these cultures was 0.47 and 3.52 mg/g DW, respectively. As a result of selection, we obtained callus cultures of tartary buckwheat with enhanced (9.34 mg / g DW) ability to synthesize phenolic compounds compared with the original lines. It was revealed that the contents of total phenolics and rutin were enhanced in suspension cultures induced from original calluses in 2.33 and 7.5 times, depending on the line. After modification of nutrient media, namely the elimination of casein hydrolysate by simultaneously replacing B5 mineral salts with MS ones, we observed an increased synthesis of phenolic compounds and rutin both in callus culture (11.79 and 3.67 mg/g DW, respectively) and suspension culture (28.68 and 8.35 mg/g DW, respectively). It should be noted that suspension cultures differs from callus cultures in high biomass yield (20 times). In addition, because of the fact that agar or its substitutes are comparatively expensive reagents the cultivation of plant cells as suspension cultures greatly reduces the cost of the technology. As the result of the optimization we obtained morphogenic suspension culture of tartary buckwheat with intensified synthesis of phenolic compounds, in particular rutin (8.35 mg/g DW), high biomass yield and grown on nutrition media containing no expensive components. As the commercial production of pharmaceutical grade rutin is absent in our country, the development of technology for production it from the tartary buckwheat cultured cells can be a good proposal for import substitution.

Keywords: *tartary buckwheat, callus culture, suspension culture, phenolic metabolism, rutin synthesis*

МУКА АМАРАНТОВАЯ ЭКСТРУДИРОВАННАЯ – БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНАЯ ДОБАВКА К ПИЩЕ

Е.И. Алексеева
Центральный ботанический сад НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь,
e-mail: *helena_aleks@mail.ru*

Одним из условий улучшения качества растениеводческой отрасли является поиск и введение в культуру новых видов растений, ранее не использовавшихся или находивших лишь ограниченное применение.

К наиболее перспективным видам нетрадиционного растительного сырья относится амарант, содержащий уникальные по химическому составу полисахаридные, липидные, витаминные компоненты, микро- и макроэлементы, биологически активные вещества

В семенах амаранта содержится 7-8 % жирного масла, которое по жирнокислотному составу близко к кукурузному, но имеет ряд существенных преимуществ. Витамин Е в амарантовом масле находится в особо активной токотриенольной форме, и что еще важнее, в нем содержится до 10 % сквалена, который до недавнего времени получали только из печени глубоководной акулы.

Также большим достоинством амаранта является не только высокий уровень содержания белка, но и его аминокислотный состав. Качество белка амаранта считается очень высоким, из-за значительного содержания незаменимых аминокислот, в частности ценной аминокислоты - лизина (4,3-5,7% к общему белку семян), что в два раза больше, чем у пшеницы и в три раза больше, чем у кукурузы и сорго, и даже сопоставимо по количеству с соей и коровьим молоком.

Крахмал, составляющий до 70% массы амаранта, обладает уникальными свойствами. Размер его зерна в несколько раз меньше, чем, рисового и кукурузного. Благодаря этому крахмал амаранта более предпочтителен в качестве наполнителя при изготовлении колбасных изделий, которые подвергаются замораживанию и последующему размораживанию.

Сотрудниками ВНИИ зерна и продуктов его переработки и компанией «Амафор» (г. Москва), разработана технология измельчения, позволяющая осуществить глубокую переработку зерна амаранта, разделения его на составляющие части, для обеспечения любого необходимого потребителю анатомического и соответственно, биохимического и гранулометрического состава, и последующего использования в готовом к употреблению виде или дальнейшей обработке.

Исследования показали, что больше всего крахмала содержится в муке амарантовой обдирной до 54,3 % и в муке амарантовой сортовой нативной до 76,7%. Именно последняя фракция являлась объектом исследований и дальнейшей обработки на экструдере во ВНИИ крахмалопродуктов.

Во ВНИИ крахмалопродуктов проведены работы по исследованию и получению опытных образцов эктрудированной муки амарантовой сортовой нативной. Были получены экструдированные хрустящие палочки при разном влагосодержании исходного сырья и различной температуре обработки.

При экструзионной обработке происходит частичная денатурация белков, в результате чего их ферментативная атакуемосгь возрастает почти в два раза. Крахмальные зерна полностью разрушаются, их природная упорядочненная структура претерпевает превращения и переходит в аморфную структуру, что подтверждается рентгеноструктурным анализом экструдатов.

Ключевые слова: *амарант, ферментативная атакуемость, белки, биологически активные добавки, сквален*

THE FLOUR AMARANTH EXTRUSION – BIOLOGICALLY ACTIVE ADDITIVE FOR FOOD

H. Alekseeva
Central botanical Gardens of NAS, Minsk, Byelorussia, e-mail: *helena_aleks@mail.ru*

Last years exists the trend of using new perspective types of vegetable raw materials for reception the food products with functional, medical-preventive purpose and additives of high food value. One of such perspective plants for universal using is considered amaranth. It is excels many traditional cultures in contents proteins, irreplaceable amino acids, vitamins, micro and macroelements, biologically active substances, lipids and very valuable medical substance - squalene. Amaranth seed is kept 7-8% fat oil, which composition is similar with corns oil, but has a row essential advantage. Amaranths oil contains before 10% squalene, which before recent time got from liver of the deep-water shark only. Also advantage of the amaranth is not only high level of the contents proteins, but also its amino acid composition. Quality proteins of amaranth is considered very high, because it is contents of irreplaceable amino acid complex. Starch, forming before 70% masses of the amaranth, possesses the unique characteristic. The size its seed in several times less, than, rice and corn. Due to this starch of the amaranth more preferred as filler at fabrication sausage product, which are subjected to the freeze and following thawing.

The researchers of All-Russian Scientific Research Institute of grain and products of its conversion and company "Amafor" (Moscow), are designed technology of the pulverizing amaranth grain, division its on forming parts and for following ready- to- eat or further processing. As a result designed technology is received 18 types of the different products from amaranth seed. Each product differs the percent contents proteins, oil, starch, celluloses, vitamins and micro-elements and finds its using in many branches of food manufacture.The studies have shown that basic quantity of starch is kept in flour amaranth high-quality native before 76,7%. Exactly last faction was shown the object for the following researches and further process was carried out in the laboratory extruder machine in All-Russian Research Institute for Starch Products. Extrusion processing is one of the perspective ecological safe ways of the change the functional features protein-starched complex of amaranth flour, in process which molecules vegetable polimers are subjected to structured and physico-chemical modification without using chemical reagent and formation waste.

The experiment was organized in All-Russian Research Institute for Starch Products on study and reception of the pilot models extruded flour amaranth high-quality native. There are received extrusion chrunch sticks under different moisture contents and different temperature of the processing. Under extrusion processing take place the partial methylated proteins and as the result that their inzume attact increases nearly in two times. Starched grain completely decay, their natural regulating structure suffers the conversions and moves over to amorphous structure, as evidenced by scanning electron microscopy by analysis extrudates.

Thereby, extrusion processing of flour amaranth high-quality native allows to increase the assortment of ecological purity food products of general, functional and medical-preventive maintenance purpose.

Keywords: *amaranth, additives, inzume attact, proteins of amaranth, biologically active additives, squalene*

ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ГЕТЕРОТРОФНЫХ КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУРАХ КЛЮКВЫ

Е.В. Березина, А.А. Брилкина, А.П. Веселов
Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, г. Нижний Новгород, Россия, e-mail: *berezina.kat@gmail.com*

Синтез биологически активных веществ каллусными культурами зависит от минерального, гормонального состава питательной среды, условий освещения и возраста каллуса. Данные по влиянию регуляторов роста на процессы вторичного синтеза в разных культурах весьма противоречивы. Цель работы – выявить влияние гормонального состава среды, возраста каллусов на содержание в них полифенолов. Объектами исследования явились каллусные культуры клюквы болотной (*Oxycoccus palustris* Pers.) и крупноплодной (*O. macrocarpus* (Ait.) Pers., сорта Ранний черный, Стивенс, Ховес).

Каллусы культивировали в темноте на средах Андерсона, содержащих α-нафтилуксусную кислоту (НУК) и кинетин (Кин); НУК и 6-бензиламинопурин (БАП); НУК и 2-изопентениладенин (иП) (по 0.5 мг/л). Содержание суммы растворимых фенольных соединений (СРФС), флавоноидов, катехинов, процианидинов определяли спектрофотометрически (UV-1700 (Shimadzu)).

Суммарное содержание фенольных соединений после 0 пассажа варьировало в пределах от 2 до 15 мг/г сырой массы в зависимости от вида/сорта и гормонального состава среды. При дальнейшем пассировании (каждые 4 недели) культуры характеризовались нестабильной динамикой накопления полифенолов.

В ходе 4 пассажа в течение 7 недель проводили определение содержания метаболитов и динамики роста по сырой и сухой биомассе. Через неделю после пассирования каллусов клюквы болотной уровень полифенолов становился до 8 раз меньше, чем в конце 3 пассажа. Особенно резко снижалось содержание флавоноидов, катехинов. Затем биосинтетическая способность культур на среде с НУК/Кин возрастала, достигая максимума к 5 неделе. Для каллусов клюквы крупноплодной снижение в уровне метаболитов на первой неделе по сравнению с концом предыдущего пассажа было менее значительным. Синтез каллусами полифенолов на средах с НУК/Кин и НУК/БАП практически не менялся в течение 7 недель, а на среде с НУК/иП увеличивался вплоть до 6 недели. Переход к стационарной фазе роста приходился на 4-6 неделю, поэтому перенос каллусов на свежую питательную среду в дальнейшем осуществляли каждые 5 недель.

Изучение биосинтетической активности каллусов в течение 7 недель указало на видовые различия: наиболее интенсивное накопление полифенолов у клюквы болотной отмечено на среде с НУК/иП, а клюквы крупноплодной – на среде с НУК/Кин.

В конце 8 пассажа разброс значений в содержании СРФС составлял от 4 до 11 мг/г сырой массы. Содержание флавоноидов, катехинов, процианидинов стало ниже. Фенольный метаболизм каллусов в течение года исследования оставался нестабильным. Отчасти это связано с изменением длительности пассажей, однако немаловажную роль может играть и появление нового клона или изменение удельного веса клона с определенным уровнем синтеза изучаемых веществ. Генетическая стабильность каллусных культур может быть достигнута даже через несколько лет, поэтому продолжение работ по исследованию содержания полифенолов в каллусах клюквы остается актуальным.

Ключевые слова: *полифенолы, каллусы, клюква*

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №16-34-00529 мол_а.

DYNAMICS OF PHENOLIC COMPOUNDS CONTENT IN HETEROTROPHIC CRANBERRY CALLUS CULTURES

E.V. Berezina, A.A. Brilkina, A.P. Veselov
Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod, Nizhni Novgorod, Russia,
e-mail: *berezina.kat@gmail.com*

Biologically active compounds synthesis in callus cultures depends on mineral and hormonal composition of nutritional medium, lighting conditions and callus age. Data of hormone influence on secondary metabolism of different callus cultures are contradictory. The aim of this study was to reveal an influence of medium hormonal composition and callus age on polyphenols content. The research objects were callus cultures of European (*Oxycoccus palustris* Pers.) and American (*O. macrocarpus* (Ait.) Pers., cv. Early Black, Stevens and Howes) cranberry.

Calluses were cultured under dark conditions on Anderson's media supplemented with α-naphthylacetic acid (NAA) and kinetin (Kin); NAA and 6-benzylaminopurine (BAP); NAA and 2-isopentenyladenine (iP) (in 0.5/0.5 mg/l concentration). Quantitative analysis of total soluble phenolic compounds (TSPC), flavonoids, catechins and procyanidins was conducted spectrophotometrically (Shimadzu UV-1700).

TSPC content after the 0th subculture varied from 2 to 15 mg/g of fresh weight depending on species/cultivar and medium hormonal composition. Further subcultures (every 4 weeks) were characterized with unstable dynamics of polyphenols accumulation.

During the 4th subculture it was determined secondary metabolites content and growth dynamics based on fresh and dry weight measurements within 7 weeks. Phenolics content in European cranberry calluses one week after subculturing was up to 8 times less than at the end of the 3rd subculture. Flavonoids and catechins content decreased dramatically. Then a growth of biosynthetic activity was observed until its maximum on the 5th week. As for American cranberry calluses the decrease in metabolite content after the 1st week as compared to the end of the previous subculture was less noticeable. There were practically no changes in phenolics synthesis on media with NAA/Kin and NAA/BAP within 7 weeks, but metabolite content on medium with NAA/iP was growing up to the 6th week. Callus cultures reached stationary growth phase on the 4th-6th week, that is why all the next subcultures lasted for 5 weeks.

The study of calluses biosynthetic activity during 7 weeks revealed differences between the species: the most intensive polyphenols accumulation in European cranberry calluses was observed on medium with NAA/iP while in American cranberry calluses it was observed on medium with NAA/Kin.

At the end of the 8th subculture the range of TSPC content was 4-11 mg/g of fresh weight. A little decrease in maximum content of flavonoids, catechins and procyanidins was observed. Calluses phenolic metabolism within one-year investigation cycle remained erratic. This can be connected in part with altered subculture duration. Besides an appearance of a new clone or a share change of clone with specific level of polyphenols synthesis could play a significant role. Calluses genetic stability can be reached even after several years that is why further analysis of polyphenols content in cranberry calluses remains urgent.

Keywords: *polyphenols, calluses, cranberry*

Aknowlegment
The reported study was funded by RFBR according to the research project №16-34-00529 мол_а.

БИОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ РЕДКИХ И ИСЧЕЗАЮЩИХ ВИДОВ ЗАПАДНОГО КАВКАЗА

В.Н. Бехтерев[1,2], Т.М. Коломиец[1], В.И. Маляровская[1]
[1]Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт цветоводства и субтропических культур», г. Сочи, Россия, e-mail: *malyarovskaya@yandex.ru*
[2]Сочинский государственный университет, г. Сочи, Россия,
e-mail: *vic-bekhterev@yandex.ru*

Интерес к изучению биохимического состава редких и исчезающих видов растений Западного Кавказа обусловлен необходимостью более глубокого понимания особенностей их физиологии, роли природных химических соединений в повышении устойчивости к неблагоприятным условиям внешней среды. С другой стороны, он связан с поиском биологически активных веществ (БАВ).

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

Целью настоящей работы было исследование биохимического состава иглицы понтийской (*Ruscus ponticus Woronow*), и синеголовника морского (*Eryngium maritimum*) редких и исчезающих видов флоры Западного Кавказа, а также оценка эффективности метода экстракционного вымораживания (ЭВ) [Патент РФ №2303476] в качестве инновационного способа выделения природных органических веществ.

Исследования проводили с использованием высокоэффективной жидкостной и газовой хроматографии, газовой хромато-масс-спектрометрии. В результате установлена возможность повышения селективности выделения целевых природных органических соединений уже на стадии сепарации и экстракции путем применения способа ЭВ в сочетании с центрифугированием [Патент РФ №2564999].

Результаты количественного определения сахаридов в полученных экстрактах *Ruscus ponticus* Woronow методом ВЭЖХ с рефрактометрическим детектированием показал, что углеводный состав органической и водной фазы экстракта иглицы понтийской существенно отличается. Применение экстракционного вымораживания на этапе извлечения целевых компонентов позволил отделять углеводы от остальных фракций БАВ, оставляя сахариды преимущественно в водной фазе: суммарная концентрация фруктозы, глюкозы и сахарозы в водной части (≈ 0,9%), что заметно выше, чем в ацетонитрильной фракции (≈ 0,3%). В отличие от известной технологии выделения сапонинов из корней иглицы, в которой в качестве экстрагента используют водно-спиртовую смесь, получаемые ацетонитрильные экстракты после ЭВЦ упариваются до сухого состояния на порядок быстрее.

При идентификации и определении относительного содержания эндогенных органических веществ в биологических пробах синеголовника был выявлен следующий их состав (14 компонентов): эндо-1,5,6,7-тетраметилбицикло[3,2]гепт-6-ен-3-ол; 2-гидрокси-4-изопропил-7-метокситропан; 3,4-гексадиеналь,2-бутил-2-этил-5-метил; 1-(4-метоксифенил)-1-циклогексанкарбоновая кислота; эремофилен; (-)-α-панасинсен; 2,4,5-трихлорфенил-4-(октилокси)бензоат; 3-метил-2-бутеновой кислоты 2,6-диметилнон-1-ен-3-ин-5-иловый эфир; 3,7,11,15-тетраметил-2-гексадецен-1-ол; этил-пальмитат; фалкаринол; фитол; этил-линоленат; стигмастерол. Из общего количества обнаруженных в этанольных вытяжках органических соединений с наибольшей степенью достоверности идентифицировано два фалкаринол (до 67,1%) и стигмастерол (до 58,2%), ценные для медицины и косметики биологически активных вещества. Использование метода экстракционного вымораживания позволило повысить избирательность выделения ряда природных органических соединений из растительной массы.

Ключевые слова: *иглица понтийская, синеголовник морской, экстракционное вымораживание, хроматография*

BIOCHEMICAL RESEARCH OF RARE AND ENDANGERED SPECIES OF THE WESTERN CAUCASUS

V.N. Bekchterev[1,2], T.M.Kolomiets[1], V.I. Malyarovskaya[1]
[1]Russian research Institute of Floriculture and Subtropical Crops, Sochi, Russia,
e-mail: *malyarovskaya@yandex.ru*
[2]Sochi State University, Sochi, e-mail: *vic-bekhterev@yandex.ru*

From the one hand, interest to biochemical investigations of rare and endangered plant species of the Western Caucasus caused by necessity of deep understanding the role of certain biochemical compounds in their physiology especially in their resistance to environmental stress to preserve their regional biodiversity. From the other hand, biochemical investigations are interesting due to finding out biologically active substances which could be the prototypes of further developed synthetic analogs and medicines.

In this regard, development of new technologies for extraction and concentration of the target organic compounds from plant material is relevant. The most important criteria for extraction methods have to be high efficiency, low thermal and chemical effects on the sample, time and stages saving, and reduction of losses recoverable components as a consequence.

The aim of present research is investigation of biochemical compounds of two endangered species of the Western Caucasus flora *Ruscus ponticus Woronow* and *Erýngium maritimum* and evaluation of efficiency of extraction freezing out method (EF) [Patent RF № 2303476] as innovative way for natural organic compounds extraction.

The results of the quantitative determination of saccharides in extracts of *Ruscus ponticus* Woronow by HPLC with refractometric detection showed that the carbohydrate composition of the organic and aqueous phases was significantly different. Application of freezing out on the stage of target components extraction allowed to separate carbohydrates from the other BAS leaving saccharides mainly in the aqueous phase: the total concentration of fructose, glucose and sucrose in the aqueous portion was about 0,9 %, which is considerably higher than in acetonitrile fraction 0,3 %. In contrast to the well known technology of saponins isolation from Ruscus rhizomes, wherein the extractant is water-alcohol mixture, acetonitrile extracts obtained after freezing out in centrifuge were evaporated to dryness much faster.

The investigations were carried out using high performance high performance liquid chromatography, gas chromatography, gas chromatography-mass spectrometry. Obtained results showed a possibility of increasing of extraction specificity of certain organic compounds in the stages of separation and extraction by using EF together with centrifuging [Patent RF № 2564999]. In the result of identification and determination of endogenous organic compounds in biological samples of *Erýngium maritimum* 14 following specific substances were detected: Endo-1,5,6,7-Tetramethylbicyclo[3.2.0]hept-6-en-3-ol; 2-Hydroxy-4-isopropyl-7-methoxytropone; 3,4-Hexadienal, 2-butyl-2-ethyl-5-methyl; 1-(4-Methoxyphenyl)-1-cyclohexanecarboxylic acid, Eremophilene; (-)-α-Panasinsen; 1.2,4,5-Trichlorophenyl 4-(octyloxy)benzoate; 3-Methyl-2-butenoic acid, 2,6-dimethylnon-1-en-3-yn-5-yl ester; 3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol; Ethyl palmitate; Falcarinol; Phytol; Ethyl linolenate; Stigmasterol. With the highest degree of reliability of the total amount in the ethanol extracts there were identified two organic compounds Falcarinol (to 67.1%) and Stigmasterol (to 58.2%) which are known to be active substances valuable for medicine and cosmetic industry.

Using extraction freezing out method allowed increasing extraction specificity of some natural organic substances from plant biomass.

Keywords: *Ruscus ponticus, Erýngium maritimum, extraction freezing out method, biologically active substances, chromatography*

ВЛИЯНИЕ МАКРОЭЛЕМЕНТОВ НА СОДЕРЖАНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В РАСТЕНИЯХ КЛЮКВЫ В УСЛОВИЯХ *EX VITRO*

А.А. Брилкина, Е.В. Березина, В.Е. Терехин, А.П. Веселов
Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, г. Нижний Новгород, Россия, e-mail: *annbril@mail.ru*

Одним из факторов, влияющих на накопление вторичных метаболитов в растительном организме, является обеспеченность тем или иным минеральным элементом. Дефицит азота, калия, фосфора, серы, бора может являться причиной повышенного уровня фенольных соединений. Цель работы – выявить влияние некоторых макроэлементов на содержание полифенолов в листьях клюквы.

Объектами исследования являлись растения клюквы крупноплодной (*Oxycoccus macrocarpus* (Ait.) Pers., сорта Ранний черный, Стивенс, Ховес), полученные *in vitro* и в течение двух месяцев адаптированные к торфяному грунту в условиях лаборатории. Полив контрольных растений осуществляли водопроводной водой, опытных – растворами Кнопа: полным (NPK) и дефицитными по одному из макроэлементов (NP, NK, PK); pH доводили разбавленной серной кислотой до 4. Каждая группа растений получала одинаковый объем жидкости. По истечении двух месяцев листья фиксировали кипящим 80% спиртом; в спиртовых вытяжках определяли суммарное содержание растворимых фенольных веществ, флавоноидов, катехинов, процианидинов на спектрофотометре UV-1700 (Shimadzu). Также проводили определение pH, содержание калия, подвижной фосфорной кислоты и нитратов в торфе до эксперимента и по его окончании.

Анализ почвы выявил, что двухмесячный полив указанными выше растворами не привел к сдвигу pH торфа. Изменилось содержание макроэлементов в грунте: отмечено повышенное (по сравнению с исходными значениями) содержание калия и фосфора в вариантах, где они присутствовали в составе растворов для полива, а также азота в варианте NPK. Полученные результаты позволяют заключить, что азот извлекался корнями и/или вымывался в вариантах, дефицитных хотя бы по одному из элементов; калий – только в вариантах контроль и NP (т.е. где отсутствовали лишь соли калия); содержание фосфора не менялось (контроль, NK) либо повышалось (PK – в 7 раз, NP и NPK – более, чем в 20 раз). Следовательно, в варианте NPK растения испытывали избыток исследуемых макроэлементов, а в варианте PK на фоне дефицита азота больше нуждались в фосфоре, чем в варианте NP.

Содержание полифенолов в листьях растений клюквы крупноплодной варьировало в зависимости от вида полива и от сорта. Наиболее заметное увеличение концентрации фенольных соединений (особенно флавоноидов – в 8 раз) по сравнению с контролем отмечено у сорта Стивенс при обработке раствором NP. У других сортов рассматриваемый вариант полива не изменял либо незначительно увеличивал содержание полифенолов. Аналогичное (статистически не достоверное) действие на накопление вторичных метаболитов выявлено для раствора PK, однако в случае с сортом Стивенс оно было направлено лишь на катехины и процианидины. Таким образом, дефицит калия на фоне сниженного содержания азота и высокого содержания фосфора в большей степени стимулировал накопление фенольных соединений, чем остальные тестируемые варианты.

Планируется продолжить изучение влияния макроэлементов на накопление полифенолов с использованием растворов, дефицитных по двум элементам.

Ключевые слова: *полифенолы, макроэлементы, клюква*

MACROELEMENTS EFFECT ON PHENOLIC COMPOUNDS CONTENT IN CRANBERRY PLANTS UNDER *EX VITRO* CONDITIONS

A.A. Brilkina, E.V. Berezina, V.E. Terekhin, A.P. Veselov
Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod, Nizhni Novgorod, Russia,
e-mail: *annbril@mail.ru*

One of the factors that affect secondary metabolites accumulation in plant organism is providing with different mineral elements. Nitrogen, potassium, phosphorus, serum and boron deficiency may lead to increased polyphenol level. The aim of this study was to reveal effect of some macroelements on phenolic compounds content in cranberry leaves.

The research objects were American cranberry plants (*Oxycoccus macrocarpus* (Ait.) Pers., cv. Early Black, Stevens and Howes) derived from *in vitro* conditions and adapted to peat in laboratory for two months. Control plants watering was performed with tap water and experimental plants – with Knop solutions: full (NPK) and in short supply of one of macroelements (NP, NK, PK); pH was brought to 4 with diluted sulphuric acid. Each group of plants received equal volume of liquid. Two months later leaves were collected and treated with boiled 80% alcohol. Content of total soluble phenolic compounds, flavonoids, catechins and procyanidins was measured in alcoholic extracts using UV-1700 (Shimadzu) spectrophotometer. Analysis of peat pH, potassium, mobile phosphoric acid and nitrates content before and after the experiment was conducted.

Soil analysis showed that 2-months watering with solutions listed above didn't lead to change of peat pH. On the other hand macroelements content changed. It was observed increased content (compared to initial level) of potassium and phosphorus in variants where they were as components of watering solutions. Besides it was observed increased content of nitrogen in NPK variant. To conclude, nitrogen was removed by roots and/or washed away in variants without at least one element; potassium – only in control and NP variants (i.e. where potassium salts were absent); phosphorus content didn't change (control, NK) or increased (PK – 7 times, NP and NPK – more than 20 times). So, in NPK variant plants received excess of macroelements and in PK variant (nitrogen-deprived) required more phosphorus than in NP variant.

Polyphenols content in American cranberry leaves varied depending on watering type and on cultivar. More observable increase of phenolic compounds concentration (especially flavonoids – 8 times bigger) compared to control was revealed in cv. Stevens treated with NP solution. This variant of watering didn't change or slightly increased polyphenols content in other cultivars. The same (statistically not proven) effect on secondary metabolites accumulation was registered for PK solution, but in cv. Stevens case only catechins and procyanidins were under affection. In conclusion, potassium deficient connected with lowered nitrogen content and high phosphorus content had more stimulating effect on phenolic compounds accumulation than other tested variants.

The research of macroelements effect on polyphenols accumulation will be continued with usage of two elements-deficient solutions.

Keywords: *polyphenols, macroelements, cranberry*

РЕГУЛЯЦИЯ ВТОРИЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА *SAUSSUREA ORGAADAYI IN VITRO*

И.Ф. Головацкая, Н.А. Володина, Е.В. Бойко, А.Е. Чигинцова, А.Н. Видершпан, Ю.В. Медведева
Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск, Россия, e-mail: *golovatskaya.irina@mail.ru*

Растения синтезируют и аккумулируют различные продукты вторичного метаболизма. Продукты специализированного обмена веществ выполняют ряд важных функций, связанных с защитой растений от различных неблагоприятных факторов среды. Они вовлекаются во взаимоотношения растений между собой и другими организмами, участвуют в размножении растений. Соединения вторичного обмена растений находят широкое применение в фармакологической, пищевой, косметической и сельскохозяйственной промышленности. Для получения соединений вторичного метаболизма используют лекарственные растения. Эндемичность и сокращение естественных популяций этих растений в связи с ухудшением экологических условий определяют перспективность использования культивируемых клеток растений *in vitro*.

Целью данной работы было выявление зависимости содержания сапонинов в каллусной культуре клеток *Saussurea orgaadayi* от уровня 28-гомобрассинолида (28-ГБЛ), мелатонина и селената натрия в питательной среде. Клеточная культура редкого лекарственного вида *S. orgaadayi* (V.Khan. and Krasnob.) (Горькуша оргаадай) являлась объектом нашего исследования. Она была получена из изолированных тканей растений на твердой агаризованной среде Мурасиге-Скуга с гормонами 2,4-Д и 6-БАП в условиях *in vitro* (контроль). В питательную среду добавляли 28-гомобрассинолид (28-ГБЛ), мелатонин или селенат натрия («Sigma» США) (опыт). Активное накопление сырой и сухой массы клеточной культуры отметили в контрольном варианте. Интенсивность роста культуры зависела от времени культивирования. Добавление 28-ГБЛ в питательную среду замедляло рост культуры клеток. Негативный эффект 28-ГБЛ на прирост биомассы клеточной культуры увеличивался с повышением его уровня. Изучение биохимического состава каллуса *S. orgaadayi* показало накопление тритерпеновых сапонинов до 0,34% от сухой массы каллуса. Экзогенный фитогормон 28-ГБЛ тормозил рост каллуса и увеличивал содержание исследуемой группы веществ относительно контроля. Уровень сапонинов повышался на 30% или 2-х кратно, соответственно для 0,001 пМ и 0,1 мкМ 28-ГБЛ. Действие селенат-ионов низкой концентрации оказывал негативный эффект на рост и накопление сапонинов. Однако совместное действие гормона и микроэлемента низкой концентрации снижало ингибирующий эффект 28-ГБЛ на рост при сохранении темпов синтеза сапонинов. Добавление 0,001–0,1 пМ мелатонина в питательную среду тормозило образование некроза клеточной культуры, существенно не изменяя ее ростовой индекс. Длительное сохранение жизнедеятельности клеток могло быть обусловлено антиоксидантными свойствами мелатонина, удаляющего свободные радикалы и перекись, тем самым, поддерживающего функционирование компонентов клеток. При введении низких концентраций мелатонина увеличивалось содержание сапонинов в каллусной ткани. Таким образом, было показано, что более раннее завершение клеточного роста каллусной культуры клеток в присутствии 28-ГБЛ приводило к активации вторичного метаболизма. Полученные данные позволяют рекомендовать данный способ выращивания клеточной культуры *in vitro* для увеличения выхода биологически активных веществ.

Ключевые слова: *Saussurea orgaadayi, 28-гомобрассинолид, мелатонин, селен, тритерпеновые сапонины*

REGULATION OF SECONDARY METABOLISM *SAUSSUREA ORGAADAYI IN VITRO*

I.F. Golovatskaya, N.A. Volodina, E.V. Boyko, A.E. Chigintsova, A.N. Vidershpan, Yu.V. Medvedeva
National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia,
e-mail: *golovatskaya.irina@mail.ru*

Plants synthesize and accumulate various products of secondary metabolism. Products of specialized metabolism operate several important functions related to the protection of plants against various adverse environmental factors, engage in mutual relations between plants and other organisms and are also involved in plant breeding. The compounds of secondary plant metabolism are widely used in pharmaceutical, food processing, cosmetic and agricultural industries. For obtainment of the secondary metabolic compounds medicinal plants are used. Due to the deterioration of environmental conditions, the endemicity and reduction of these plants population determine prospects the use of cultured plant cells *in vitro*.

The aim of the study is to determine the dependence of the saponins content in the callus culture of *Saussurea orgaadayi* cells from the level 28-homobrassinolide (28-HBL), melatonin, and sodium selenite in the growth medium. The cell culture of the rare medicinal species *S. orgaadayi* (V.Khan. and Krasnob.) is the object of the study. It was obtained from the isolated plant tissue in the Murashige and Skoog solid agarified medium with hormones 2,4-D and 6-benzyladenine *in vitro* (control). 28-HBL, melatonin and sodium selenate (US «Sigma») were added to the growth medium (experiment). The active accumulation of fresh and dry weight of the cell culture was noted in the control variant. The intensity of the culture growth depended on time of cultivation. Adding 28-HBL in the growth medium slowed down the growth of the cell culture. The negative effect of 28-HBL on the growth of the cell culture biomass increased with the expansion of its level. The study of biochemical composition of callus *S. orgaadayi* showed the accumulation of triterpene saponins up to 0.34% of the dry weight of callus. Exogenous phytohormone 28-HBL inhibited the callus growth and increased the content of the experimental group of substances in comparison to the control group. The level of saponins increased by 30% or two fold, the reafter, to 0.001 pM and 0.1 μM 28-HBL. The action of low-concentrated selenate-ions had a negative effect on the growth and accumulation of saponins. However, the coaction of the hormone and the low-concentrated microelement decreased the inhibitory effect of 28-HBL on the growth maintaining the pace of the saponins synthesis. The addition of 0.001–0.1 pM melatonin in the growth medium inhibited the formation of necrosis cell culture, without significant changes in its index growth. The prolonged preservation of the vital cell activity might be caused by the antioxidant properties of melatonin, which removes free radicals and peroxide, thereby maintaining the function of cell components. With the introduction of melatonin in low concentration the saponins content in the callus tissue increased. Thereby, the earlier completion of cell growth of the callus culture cells in the presence of 28-HBL resulted in activation of secondary metabolism. The data obtained allow recommending this method for *in vitro* cultivation of the cell culture to increase the yield of biologically active substances.

Keywords: *Saussurea orgaadayi, 28-homobrassinolide, melatonin, selenium, saponins*

КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК СИБИРСКИХ ВИДОВ РОДА *ACONITUM* – АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ ИСТОЧНИК СЫРЬЯ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

А.Г. Еникеев, А.А. Семенов
Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск, Россия,
e-mail: *enikeev@sifibr.irk.ru*

Во флоре Восточной Сибири имеется большое число видов лекарственных растений, в течение многих лет, успешно используемых в практике народной медицины для лечения проблемных заболеваний различной этиологии. Вместе с тем, лишь крайне незначительная их часть внесена в Фармакопею РФ. К числу основных причин сложившейся ситуации следует отнести недостаточную изученность химического состава большинства видов и фармакологических свойств уже известных соединений. Значительным тормозом внедрения имеющихся разработок является также ограниченная сырьевая база, исключающая возможность промышленного сбора растений в дикой природе. Кроме того, имеется значительное число видов растений относящихся к исчезающим и эндемичным видам, знакомых лишь узкому кругу ботаников, биотехнологический потенциал которых не изучался. Проблема сырья может быть успешно решена с помощью метода культур клеток и изолированных органов растений, который, в свою очередь, может быть значительно усилен с помощью генно-инженерных технологий.

На примере культур клеток некоторых сибирских видов рода *Aconitum* показана возможность получения как уже известных биологически-активных соединений, так и новых, ранее неописанных в литературе, химических соединений с потенциально высокой биологической активностью.

Ключевые слова: *род Aconitum, культуры клеток, вторичные метаболиты*

CELL CULTURE OF SIBERIAN SPECIES OF *ACONITUM* GENUS AS AN ALTERNATIVE SOURCE OF RAW MATERIALS FOR BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS

A.G. Enikeev, A.A. Semenov
Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk, Russia,
e-mail: *enikeev@sifibr.irk.ru*

The East Siberian flora comprises a large number of curative plants, which have traditionally been used in folk medicine to treat problematic diseases of diverse etiology. However, only very limited number of them has been incorporated in the RF Pharmacopoeia. This is accounted for by the fact that chemical composition of the majority of species and pharmacological properties of the known compounds have not been sufficiently studied. A significant bottleneck for introduction of the existing developments is a restricted raw materials base, which excludes the possibility of industrial-scale collection of plants in wildlife environment. Besides, there is a large number of plant species classed as vanishing or endemic, whose biotechnological potential has not been explored and which are known to a narrow circle of botanists. The problem of raw materials may be successfully resolved via the method of cell culture and isolated plant organs, which, in their turn, may be considerably enhanced through genetic engineering techniques.

Cells of some Siberian species of *Aconitum* genus have been described to exemplify the possibility of obtaining both well-known biologically active compounds and new chemical compounds with potentially high biological activity, which have not been previously described in literature.

Keywords: *Aconitum genus, cell culture, secondary metabolites*

ДУШИЦА ОБЫКНОВЕННАЯ (*ORIGANUM VULGARE* L.) КАК ИСТОЧНИК БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Е.Н. Еремеева
РГАУ-МСХА им. К.А.Тимирязева, г. Москва, Россия, e-mail: *ascatoshka@mail.ru*

В настоящее время из-за воздействия на человека неблагоприятных условий внешней среды в организме образуется избыточное количество свободных радикалов. В связи с этим увеличивается потребность в сырьевых источниках, обладающих антиоксидантной активностью.

Душица обыкновенная (*Origanum vulgare* L.) – многолетнее травянистое растение семейства Яснотковые (*Lamiaceae*), широко используемое в медицине и других отраслях промышленности. Препараты из надземной части душицы действуют успокаивающе на центральную нервную систему, применяются при неврозах, бессоннице, гипертонии и атеросклерозе. Высокая фармацевтическая ценность сырья душицы обусловлена наличием комплекса биологически активных веществ.

Эфирное масло душицы обыкновенной – сложная смесь летучих безазотистых веществ с ароматным запахом, состоит, главным образом, из терпенов и их производных. Душица обыкновенная содержит незначительное количество эфирного масла (в результате проведенных исследований количество эфирного масла в среднем было 0,09-0,1%), но оно имеет широкий абиотический спектр действия, обладает высокой антибактериальной активностью. Благодаря бактерицидному и фунгицидному действиям с успехом может применяться в качестве основы новых лечебно-профилактических препаратов.

Наряду с эфирным маслом трава душицы обыкновенной содержит дубильные вещества – производные многоатомных фенолов, не содержащие азота. Они обладают вяжущим вкусом, оказывают анальгезирующее, бактерицидное, сосудосуживающее действие, понижают секрецию слизи.

Суммарное содержание полифенолов проводили колориметрическим методом с применением реактива Folin-Ciocalteu. В сравнении с другими представителя семейства Яснотковые, выращенными в Московской области, душица обыкновенная оказалась лидером по содержанию полифенолов. В результате анализа суммарное содержание полифенолов находилось в пределах от 6,3% до 7,7%.

Для травы душицы характерно наличие флавоноидов (рутин, кверцетин, лютеолин, цитрин, гесперидин и их гликозиды). Определение содержания суммы флавоноидов проводили спектрофотометрическим методом после реакции с хлоридом алюминия. Суммарное содержание флавоноидов в образцах душицы обыкновенной, выращенной в Московской области, находилось в пределах от 2,62% до 2,79%. Это позволяет рекомендовать душицу для использования в качестве источника флавоноидов.

Содержание розмариновой кислоты в сухом сырье душицы обыкновенной было определено методом ВЭЖХ (высокоэффективной жидкостной хроматографии).

Представленный анализ показывает, что фенольные соединения растений, проявляющие антимикробную, противогрибковую, антипаразитарную и противовирусную активность, представлены полифенолами, флавоноидами и гидроксикоричными кислотами, в частности, розмариновой кислотой. Эти соединения широко распространены в сырье душицы обыкновенной. Таким образом, сырьё душицы обыкновенной можно рекомендовать в качестве полифункционального природного компонента при производстве лекарственных средств, биологически активных добавок к пище и косметической продукции.

Ключевые слова: *душица обыкновенная, биологически активные вещества, эфирное масло, флавоноиды, полифенолы, розмариновая кислота*

OREGANO (ORIGANUM VULGARE L.) AS A SOURCE OF BIOLOGICAL ACTIVE SUBSTANCES

E.N. Eremeeva
Russian State Agrarian University - Moscow Agricultural Academy named after K.A. Timiryazev, Moscow, Russia, e-mail: *ascatoshka@mail.ru*

At the present time excessive amount of free radicals is formed in a human body due to the impact of adverse environmental conditions. That's why the requirements in raw materials, which have antioxidant activity, are increasing.

Oregano (*Origanum vulgare* L.) is a perennial herbaceous plant of the family *Lamiaceae*. It is widely used in medicine and other industries. Medications from the aboveground part of oregano have calming effect on the central nervous system. They are used to treat the neuroses, insomnia, hypertension and atherosclerosis. The high pharmaceutical value of oregano is due to the complex of biologically active substances.

Essential oil of *Origanum vulgare* is a complex mixture of volatile nitrogenous substances with a fragrant smell. Essential oil mainly consists of terpenes and their derivatives. Oregano contains a minor amount of essential oil (in our studies the amount of essential oil was 0,09-0,1%), but it has a wide range of abiotic action and high antibacterial activity. Due to its bactericidal and fungicidal action it can be successfully used as a basis for new therapeutic and preventive drugs.

In addition raw material of *Origanum vulgare* contains tannins (derivatives of polyhydric phenols which do not contain nitrogen). They have an astringent taste, have analgesic, antibacterial, vasoconstrictor effect and reduce the secretion of mucus.

The total polyphenol content was determined colorimetrically using the method of Folin-Ciocalteu reagent. Compared with the other representatives of the family *Lamiaceae*, grown in the Moscow region, oregano was the leader in polyphenols content. The total polyphenol content ranged from 6.3% to 7.7%.

Oregano is characterized by the presence of flavonoids (rutin, quercetin, luteolin, citrine, hesperidin and their glycosides). The amount of flavonoids was determined spectrophotometrically following the reaction with aluminum chloride. The total flavonoid content in *Origanum vulgare* samples, grown in the Moscow region, ranged from 2.62% to 2.79%. It allows to recommend oregano for use as a source of flavonoids.

Rosmarinic acid content in the dry raw material of *Origanum vulgare* was determined by HPLC (high performance liquid chromatography).

The analysis shows that phenolic compounds, which have antimicrobial, antifungal, antiparasitic, and antiviral activity, represented polyphenols, flavonoids and hydroxycinnamic acids, such as rosmarinic acid. These compounds are widely distributed in the raw materials of *Origanum vulgare*. Thus, the raw material of *Origanum vulgare* can be recommended as a multifunctional component in the production of natural medicines, dietary supplements and cosmetic products.

Keywords: *oregano, biologically active substances, essential oils, flavonoids, polyphenols, rosmarinic acid*

НЕКОТОРЫЕ ПОДХОДЫ К РЕГУЛЯЦИИ НАКОПЛЕНИЯ ПОЛИФЕНОЛОВ В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ *IN VITRO* КЛЕТКАХ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ (НА ПРИМЕРЕ *CAMELLIA SINENSIS* L.)

Н.В. Загоскина, Т.Н. Николаева, П.В. Лапшин, Т.Л. Нечаева
ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва, Россия,
e-mail: *biophenol@gmail.com*

Развитие инновационных биотехнологий предполагает все более широкое использование культур клеток и тканей как возможных продуцентов уникальных и фармакологически-ценных вторичных метаболитов высших растений, в том числе и полифенолов. И в этом случае большое внимание уделяется тем видам растений, для которых характерно образование уникальных биологически активных соединений.

Одним из перспективных фенол-накапливающих видов растений является чай (*Camellia sinensis* L.), для которого характерна способность к биосинтезу различных классов фенольных соединений, включая флаваны – вещества с Р-витаминной капилляроукрепляющей активностью. В каллусных культурах, инициированных из молодых флешей чая и выращиваемых в темноте (гетеротрофный каллус), накопление полифенолов было значительно ниже, чем в исходных эксплантах. Выращивание этих культур в световых условиях способствовало повышению их количества. После формирования в клетках хлоропластов (фотомиксотрофный каллус) в составе фенольного комплекса были обнаружены флавонолы (производные кверцетина и кемпефрола), характерные для интактного растения.

Поскольку биосинтетическая способность фотомиксотрофных каллусных культур была ниже таковой исходных эксплантов чая, была предпринята попытка их культивирования на средах с пониженными концентрациями углеводов. И в этом случае обнаружили интересный факт: на средах с более низким (1-2%), по сравнению с контролем (2,5%), уровнем глюкозы содержание фенольных соединений снижалось, однако отмечалось возрастание доли флаванов в их общем балансе. Следовательно, в этом случае происходит активация биосинтеза метаболитов, которые обладают Р-витаминной капилляроукрепляющей активностью. Эти результаты могут иметь важное практическое значение.

Будут также рассмотрены вопросы влияния углеводов питательной среды на накопление полифенолов на начальных этапах перехода каллусных культурах чая от гетеротрофного к фотомиксотрофному типу питания.

Ключевые слова: *Camellia sinensis, культуры in vitro, фенольные соединения, накопление, регуляция, углеводы*

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 14-04-01742).

SOME APPROACHES TO REGULATION FORMATION OF POLYPHENOLS OF CULTIVATED IN VITRO CELLS HIGHER PLANTS (FOR EXAMPLE OF *CAMELLIA SINENSIS* L.)

N.V. Zagoskina, T.N. Nikolaeva, P.V. Lapsin, T.L. Nechaeva
Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia,
e-mail: *biophenol@gmail.com*

Development of innovative biotechnology involves the increasing use of cell and tissue cultures as a potential producers of unique and pharmacologically valuable secondary metabolites of higher plants, including polyphenols. And in this case of great interest such plants, which are characterized by the formation of biologically active compounds.

One of perspective phenol-accumulating plant species is tea (*Camellia sinensis* L.), which is characterized by the capacity for the biosynthesis of various classes of phenolic compounds, including flavans - substances with P-vitamin activity. In the callus cultures initiated from young tea shoots and cultured in the dark (heterotrophic callus), accumulation of polyphenols was significantly lower than in the initial explants. The cultivation of these cultures in the light conditions contributed to the increase of their content. After the formation of chloroplasts (photomixotrophic culture) were found flavonols (quercetin and kaempferol derivatives) that are typical of intact plants.

Since biosynthetic capacity photomixotrophic callus cultures was lower than that of the original explants of tea, their cultivation was carried out at a reduced concentration of carbohydrates environments. In this case also discovered an interesting fact: in media containing a lower (1.2%), glucose levels compared to controls (2.5%) reduced content of phenolic compounds, however, noted an increasing proportion of flavans. Consequently, in this case, are activated the biosynthesis of phenolic compounds which have P-vitamin activity. These results may have important practical significance.

There are also questions of influence of carbohydrates on the accumulation of polyphenols in the transition callus cultures of tea from heterotrophic to photomixotrophic the type of nutrition.

Keywords: *Camellia sinensis*, *in vitro culture, phenolics, accumulation, regulation, carbohydrates*

Aknowlegment
This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (grant 14-04-01742).

СВОЙСТВА И ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ РАСТЕНИЙ В БИОТЕХНОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

А.А. Замятнин (мл.)[1,2]
[1]НИИ молекулярной медицины, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, г. Москва, Россия, e-mail: *aaz@mma.ru*
[2]НИИ ФХБ им. А.А. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва, Россия, e-mail: *zamyat@belozersky.msu.ru*

Нарушения в процессах деградации белков могут являться причиной развития серьезных патологий у человека. Считается, что развитие таких патологий можно предотвратить при помощи заместительной энзиматической терапии, основанной на применении дополнительных протеолитических ферментов. В связи с тем, что причиной таких патологий является неспособность деградома человека обеспечить гидролиз белков-мишеней, для обеспечения эффективной заместительной энзиматической терапии было предложено использовать протеиназы, обладающие недостающими активностями. Протеолитические ферменты, обладающие необходимыми свойствами, обнаруживаются у некоторых организмов, в том числе, у растений. В данной работе показано, что рекомбинантный протеолитический фермент Тритикаин-α из пшеницы (*Triticum aestivum* L) способен активироваться *in vitro* и образовывать каталитически активный фермент, проявляющий коллагеназную и глютеназную активности при кислых и нейтральных значениях pH и температуре человеческого тела. Биохимический анализ, проведенный с помощью флуорогенных пептидных субстратов, а также масс-спектрометрический анализ продуктов гидролиза, катализируемого Тритикаином-α, выявил целый ряд сайтов протеолиза, расположенных в первичных структурах коллагена, а также белков, составляющих глютен. Сайты протеолиза также обнаружены в аминокислотной последовательности 33-звенного пептида, который является продуктом гидролиза α-глиадина и инициирует воспалительные реакции у пациентов, страдающих целиакией. Важно, что Тритикаин-α оказался относительно стабильным в условиях, моделирующих желудочный сок. Таким образом, можно заключить, что Тритикаин-α может быть использован в качестве основы (i) для создания лекарственных препаратов эффективных при терапии целиакии, (ii) для создания препаратов для местного применения при очистке ран, а также (iii) для биотехнологического использования в пищевой промышленности, в том числе, при производстве продуктов, не содержащих глютен.

Ключевые слова: *протеиназы, протеолиз, глиадин, глютенин, коллаген*

PROPERTIES AND PROSPECTS FOR APPLICATIONS OF PLANT PROTEOLYTIC ENZYMES IN BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

A.A. Zamyatnin Jr.[1,2]
[1]Sechenov First Moscow State Medical University, Institute of Molecular Medicine, Moscow, Russia, e-mail: *aaz@mma.ru*
[2]Lomonosov Moscow State University, Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow, Russia, e-mail: *zamyat@belozersky.msu.ru*

Insufficient and/or improper protein degradation results in the development of various human pathologies. Proteolytic enzymes aimed to improve insufficient proteolytic activity were suggested for the treatment of protease deficiency-induced disorders. Since in some cases human degradome is incapable to support degradation of the entire target protein(s), other organisms can be used as a source of proteases exhibiting additional activities distinct from human enzymes, and plants are perspective candidates for this source. Present study revealed that recombinant cysteine protease Triticain-α from wheat (*Triticum aestivum* L) refold *in vitro* into an autocatalytically activated protease possessing glutenase and collagenase activities at acidic or close to neutral pH levels at the temperature of human body. Biochemical characterization of the enzyme using flourogenic peptide substrates and further mass-specrometry analysis of the products of Triticain-α-catalyzed hydrolysis revealed multiple cleavage sites within the sequences of gluten and collagen. A number of cleavage sites were identified, in particular, in the major toxic 33-mer α-gliadin-derived peptide initiating inflammatory responses to gluten in Celiac Disease (CD) patients. Importantly that Triticain-α was found to be relatively stable in the conditions simulating stomach environment. Thus, we are confident that Triticain-α can be used as a basic compound for the development (i) of pharmaceuticals for oral administration aimed at release of the active enzyme into the gastric lumen for CD treatment, (ii) of topically active pharmaceuticals for wound debridement applications, and (iii) for broad biotechnological applications in food production industry, in particular, for the manufacturing of gluten-free foods.

Keywords: *protease, proteolytic cleavage, gliadin, glutenin, collagen*

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ КИСЛОТОУСТОЙЧИВЫХ МИКРОКЛОНОВ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ

О.А. Землянухина[1], Н.Н Черкасова[1], Т.П. Жужжалова[1], В.Н. Калаев[2]
[1]Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара им. А.Л.Мазлумова» (ВНИИСС), Воронежская область, Рамонский р-н, п.ВНИИСС, Россия,
e-mail: *oz54@mail.ru*
[2]Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Воронежский государственный университет» (ФГБОУ ВО «ВГУ»), г. Воронеж, Россия, e-mail: *dr_huixs@mail.ru*

Высокие требования сахарной свеклы к условиям произрастания обуславливают создание устойчивых к кислотности среды растений с использованием селективных сред *in vitro.* В качестве материалов использовали кислотоустойчивые линии сахарной свеклы КУ 2093МС и КУ 2093РФ, полученные из компонентов гибрида Витязь, включающего генотипы с цитоплазматической мужской стерильностью 2093МС (МС-форма) и фертильные по пыльце 2093РФ (РФ-форма). Кислотоустойчивые растения получали в культуре *in vitro* из изолированных зрелых зародышей путем трехкратного пассирования регенерантов на селективной среде Гамборга B_5 с сублетальной кислотностью при pH 3,5 с использованием соли алюминия. На каждом этапе отмечали процент выживаемости эксплантов, индекс длины корня. Биохимические исследования проводили на суммарных ферментативных препаратах из листовых пластинок кислотоустойчивых и контрольных растений. Показано, что при адаптации микроклонов сахарной свеклы двух генотипов к условиям низкого pH происходят достоверные изменения в метаболизме клетки. Увеличиваются активности стрессорного фермента пероксидазы (в 2,4-3,4 раза по сравнению с контролем, как у МС-, так и у РФ-форм) и изоцитратлиазы – высокоспецифичного фермента глиоксилатного цикла, выраженного в сахарной свекле как растения, накапливающего оксалоацетат (в 1,7 раза у МС-растений и в 1,5 раза – у РФ-формы). При этом уменьшается активность митохондриального энзима альтернативной оксидазы NADH-дегидрогеназы (в 1,2 у МС- и в 1,6 раза у РФ-форм). Увеличение активности изоцитратлиазы коррелирует со значительным уменьшением K_M, что предполагает сопровождение адаптации к неблагоприятным условиям растений сахарной свеклы переключением метаболизма на глиоксилатный шунт. Активность ключевого фермента пентозофосфатного цикла глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы увеличивается у МС-формы в 1,2, но уменьшается у РФ-растений в 1,8 раза. Постоянство или снижение активности как МДГ, так и малик энзима могут объясняться выработкой стойкой индуцированной толерантности растений к алюминиевому стрессу за счет, возможно, хелатирования ионов алюминия малатом и их детоксикации. Процесс адаптации к пониженному pH сопровождается изменением изоферментных спектров пероксидазы: у МС-растений появляется зона с R_f 0,228 и исчезает – с R_f 0,593; у РФ-линии появляются зоны с R_f0,228 и 0,593; 1- и 2-эстеразы: у МС-формы появляется новая зона с R_f 0,561; цитохром-***c***-оксидазы: у РФ-линии выявляется новая зона с R_f 0,569 и исчезает с 0,119; малик энзима: у МС-растений появляется изоформа с R_f 0,097. Процесс адаптации у регенерантов сахарной свеклы сопровождается достоверным увеличением количества белка как у МС- (в 1,1 раза), так и у РФ-формы (в 1,4 раза), а уровень метаболического отклика на стресс в значительной степени зависит от исходного генотипа - компонента гибрида сахарной свеклы.

Ключевые слова: *сахарная свекла, индуцированная кислотоустойчивость, активность ферментов, изоферменты*

PHYSIOLOGICAL-BIOCHEMICAL ASPECTS OF SUGAR BEET ACID-RESISTANT MICROCLONES

O.A. Zemlyanuhina[1], N.N. Cherkasova[1], T.P. Zhuzhzhalova[1], V.N. Kalayev[2]
[1]Federal State Budgetary Scientific Institution "The A.L. Mazlumov All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar" (VNIISS), Voronezh region, Ramonsky district, VNIISS, Russia, e-mail: *oz54@mail.ru*
[2]Federal State Budgetary Educational Institution of High Vocational Training "Voronezh State University" (FGBOU VO VGU), Voronezh, Russia, e-mail: *dr_huixs@mail.ru*

Great requirements of sugar beet upon growth conditions call forth development of plants resistant to environment acidity using selective media *in vitro*. As materials for experiments, acid-resistant lines of sugar beet, KU 2093MS and KU 2093RF, obtained from components of the hybrid Vityaz that includes genotypes with cytoplasmic mail sterility 2093MS and fertile pollinator 2093RF have been used. Acid-resistant plants have been obtained under *in vitro* culture from isolated mature embryos by triple transfer of regenerants using Gamborg B_5 selective media with aluminum salt and sublethal acidity at pH 3.5. At each stage, survival ratio of explants, and index of root length have been recorded. Biochemical studies were conducted using total fermentative preparations from leaf blades of acid-resistant and control plants. It has been shown that, with adaptation of sugar beet microclones of two genotypes to conditions of low pH, certain changes in cell metabolism take place. Activity of stress enzyme peroxidase increases 2,4 to 3,4 times (both in MS- and RF-forms) in comparison with the control, and activity of isocitrate lyase – highly specific enzyme of glyoxylate cycle expressed in sugar beet as plant accumulating oxaloacetate – increases 1,7 times in MS-plants and 1,5 times in RF-forms. Besides, there is a decrease (1,2-fold in MS-forms, and 1,6-fold in RF-forms) in activity of mitochondrial enzyme of alternative oxidase – NADH-dehydrogenaze. Increase of isocitrate lyase activity correlates with considerable reduction of Michaelis constant that assumes adaptation of sugar beer plants to adverse conditions being accompanied by metabolism switching to glyoxylate cycle. Activity of the key enzyme of pentose-phosphate cycle – glucose-6-phosphate-dehydrogenaze – increases 1,2 times in MS-form, but becomes 1,8 times lower in the RF-plants. Constancy or decrease in activity of both malate-dehydrogenaze and malic enzyme can be accounted for development of stable induced tolerance of plants to aluminium stress, probably, due to chelation of aluminium with the help of malate and their detoxication. Process of adaptation to lowered pH is accompanied by change of peroxidase isozyme spectra: in MS-plants, zone with R_f 0,228 appears and zone with R_f 0,593 disappears, and in RF-line, zones with R_f 0,228 and 0,593 appear. For 1 and 2-esterase, new zone with R_f 0,561 appears in MS-form. For cytochrome-***c***-oxidase, new zone with R_f 0,569 appears and zone with R_f 0,119 disappears in RF-line. For malic enzyme, an isoform with R_f 0,097 appears in MS-plants. Process of adaptation in sugar beet regenerants is accompanied by reliable increase of protein quantity both in MS-form (1,1 times) and RF-form (1,4 times), and level of metabolic response to stress substantially depends on initial genotype – component of a sugar beet hybrid.

Keywords: *sugar beet, induced acid-resistant, enzyme activity, isozymes*

ЦИТОЛОГИЧЕСКИЙ И БИОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РАСТЕНИЙ-РЕГЕНЕРАНТОВ КАПУСТЫ БЕЛОКОЧАННОЙ (*BRASSICA OLERACEA* L.), ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ РЕПРОДУКТИВНЫХ ОРГАНОВ *IN VITRO*

Р.Н. Киракосян, Е.А. Калашникова
ФГБОУ ВО Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева, г. Москва, Россия, e-mail: *mia41291@mai.ru*, *kalash0407@mail.ru*

В результате цитологических исследований нами показано, что регенеранты капусты белокочанной, полученные *in vitro* из репродуктивных органов, имели разный уровень плоидности (n, 3n, 5n). В нашей работе применяли новый универсальный метод приготовления препаратов хромосом растений - «SteamDrop». Известно, что изменение генома растений сопровождается значительными изменениями в их физиологических и биохимических функциях. Уровень плоидности относится к числу важных цитогенетических характеристик клеток, определяющих физиологические и биохимические особенности растений. В ряде случаев отмечалась прямая взаимосвязь между уровнем плоидности растительных тканей и их способностью к образованию различных классов фенольных соединений. В свою очередь, уровень накопления фенольных соединений в определенной степени служит «критерием» потенциальной устойчивости клеток/растений к стрессовым факторам окружающей среды.

Впервые для капусты белокочанной было изучено суммарное содержание растворимых фенольных соединений, а также флаванов и флаванолов в листьях растений-регенерантов, имеющих разный уровень плоидности клеток (n, 2n, 3n, 5n). Экспериментально установлено, что с увеличением уровня плоидности уменьшается синтез фенольных соединений: у растений-регенерантов гаплоидных форм (n) он сохраняется на более высоком уровне по сравнению с диплоидными (2n), что, вероятно, свидетельствует об изменении фенольного метаболизма. Также впервые из растительной биомассы гаплоидных и диплоидных растений-регенерантов капусты белокочанной *in vitro* получены растительные экстракты, которые оказывают слабое ингибирующее действие (от 10 до 30%) на жизнеспособность клеток линии M HeLa (рак шейки матки человека). Однако наибольший цитотоксический эффект проявляется у экстрактов гаплоидных растений.

Ключевые слова: *уровень плоидности, накопление фенольных соединений, экстракты, in vitro*

CYTOLOGICAL AND BIOCHEMICAL ANALYSIS OF REGENERATED PLANTS OF CABBAGE (*BRASSICA OLERACEA* L.), OBTAINED FROM THE REPRODUCTIVE ORGANS *IN VITRO*

R.N. Kirakosyan, E.A. Kalashnikova
FSBEI HE Russian Timiryazev State Agrarian University, Moscow, Russia,
e-mail: *mia41291@mai.ru*, *kalash0407@mail.ru*

As a result of cytological studies, we have shown that the regenerated plants of cabbage, obtained in vitro from the reproductive organs, had different levels of ploidy (n, 3n, 5n). In our study we used a new universal method for preparation of chromosomes of plants "SteamDrop". It is known that changing the genome of plants is accompanied by significant changes of their physiological and biochemical functions. The level of ploidy is an important cytogenetic characteristics of cells that determine the physiological and biochemical characteristics of plants. In some cases there is a direct correlation between the ploidy level of plant tissues and their ability to form different classes of phenolic compounds. In turn, the level of accumulation of phenolic compounds to some extent serves as a "criterion" potential resistance of cells/plants to stressful environmental factors.

For the first time for cabbage was studied the total content of soluble phenolic compounds, as well as flavans and flavanols in the leaves of different ploidy level of regenerated plants cells (n, 2n, 3n, 5n). It is experimentally established, that with increase of the ploidy level the synthesis of phenolic compounds decreases: to plants-regenerants of haploid forms (n) it remains at a higher level compared to the diploid (2n), which probably indicates a change of the phenolic metabolism. Also for the first time from plant biomass of haploid and diploid regenerated plants of cabbage in vitro were obtained the plant extracts, which exert a weak inhibitory effect (from 10% to 30%) on viability of cell line M-HeLa (human cervical cancer). However, the greatest cytotoxic effect was in the extracts of haploid plants.

Keywords: *ploidy level, the accumulation of phenolic compounds, extracts, in vitro*

СОДЕРЖАНИЕ СТИЛЬБЕНОВ В РАСТЕНИЯХ СЕМЕЙСТВА ВИНОГРАДНЫЕ

К.В. Киселев, А.С. Дубровина, О.А. Алейнова
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Биолого-почвенный институт Дальневосточного отделения Российской академии наук, г. Владивосток, Россия, e-mail: *kiselev@biosoil.ru*

Растения являются источниками широкого спектра ценных биологически активных веществ, которые чаще всего относят к продуктам вторичного метаболизма. Среди вторичных метаболитов растений особое место занимает небольшая группа фенольных соединений – стильбены. Стильбены являются природными фитоалексинами, которые представляют собой соединения с двумя бензольными кольцами, имеющими структуру C6-C2-C6. Стильбены встречаются в нескольких неродственных видах растений из семейств Бобовые (Fabaceae, например, арахис), Сосновые (Pinaceae, ель), Виноградные (Vitaceae, виноград).

Биосинтез стильбенов лучше всего изучен у представителей семейства Виноградные, где стильбены являются производными резвератрола. Резвератрол существует в двух изомерных формах (*trans*- и *cis*-), но наиболее часто в растениях встречается *trans*-резвератрол или *t*-резвератрол, эта форма обладает большей биологической активностью по сравнению с *cis*-резвератролом. *T*-резвератрол – мощный антиоксидант, который обладает способностью предупреждать развитие злокачественных образований и имеет большой потенциал для создания на его основе биологически активных добавок и лекарственных средств. *T*-резвератрол в клетках винограда в результате дальнейших модификаций может превращаться в другие стильбены, например, в виниферины (окисление), птеростильбен (метилирование) или пицеид (гликозилирование).

Хотя процесс биосинтеза стильбенов у винограда изучен довольно хорошо, наблюдаются разночтения в качественном и количественном составе стильбенов ценных сортов культурного винограда, а также слабо изучен состав стильбенов у дикорастущих представителей Виноградных. Целью нашей работы стало обобщение качественного и количественного состава стильбенов в ценных сортах культурного винограда и сравнение этих данных с нашими данными о спектре и количестве стильбенов в дикорастущем винограде *Vitis amurensis* Rupr.

Показано, что в листьях, черешках и ягодах винограда *V. amurensis* присутствуют шесть основных стильбенов, концентрация которых превышала 0.01 mg/g сухой биомассы (DW) в каких либо из анализируемых проб. В состав шести основных стильбенов вошли *cis*-пицеид (до 0.257 mg/g DW), *t*-пицеид (до 0.055 mg/g DW), *t*-ε-виниферин (до 0.122 mg/g DW), *cis*-ε-виниферин (до 0.031 mg/g DW), *t*-резвератрол (до 0.121 mg/g DW), и *t*-δ-виниферин (до 0.019 mg/g DW). Наибольшее содержание стильбенов и уровень экспрессии генов биосинтеза стильбенов были характерны для листьев, собранных в октябре, что говорит о том, что листья винограда основные органы биосинтеза стильбенов среди проанализированных нами. В целом осенние пробы *V. amurensis* содержали в 2-3 раза больше стильбенов, чем летние пробы. Тотальное содержание стильбенов в осенних листьях доходило до 0.6 mg/g DW. Содержание стильбенов возрастало в 1.5 раза после обработки ультрафиолетом за счет сильного увеличения содержания *t*-резвератрола. Полученные данные по стильбенам в диком винограде *V. amurensis* были сравнены с содержанием стильбенов в культурном винограде.

Ключевые слова: *виниферин, пицеид, резвератрол, фитоалексины*

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (№ 14-14-00366).

STILBENE ACCUMULATION IN THE VITACEAE PLANTS

K.V. Kiselev, A.S. Dubrovina, V.S. Khristenko, O.A. Aleynova
Institute of Biology and Soil Science, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia, e-mail: *kiselev@biosoil.ru*

Stilbenes are natural compounds occurring in a number of unrelated plant families, including Fabaceae (peanut), Pinaceae (pine), or Vitaceae (grape). A considerable number of stilbene structures are based on the structure of resveratrol (3,5,4′-trihydroxy-*trans*-stilbene), which is the key precursor in the stilbene biosynthesis. Resveratrol exists in two isomeric forms (*trans*- and *cis*-), but *trans*-resveratrol (or *t*-resveratrol) is widely occurring in plants and is known to display higher biological active properties in comparison with *cis*-resveratrol.

T-resveratrol is synthesized via the phenylpropanoid pathway. Stilbene synthase (STS, EC 2.3.1.95) directly catalyzes the reaction of resveratrol formation condensing three molecules of malonyl-CoA and one molecule of cumaryl-CoA to form the stilbene backbone. *T*-resveratrol may be metabolized to form other stilbenes, such as viniferins via oxidation of resveratrol by polyphenol oxidase; pterostilbene via methylation of resveratrol by resveratrol O-methyltransferase; or piceid via resveratrol glycosylation by glucosyltransferases.

T-resveratrol is an important phytoalexin protecting plants against microbial pathogens and possessing valuable pharmacological properties. Therefore, it is important to understand the regulation of stilbene biosynthesis in the grapevine and other stilbene sources. Unfortunately, there is insufficient information about stilbene accumulation in *Vitaceae* species, e.g. about stilbene contents, stilbene diversity, and transcription levels of the stilbene pathway genes in various grapevine organs and tissues.

The wild grape *V. amurensis* Rupr. is a highly cold- and disease-resistant grapevine species, as compared with other *Vitaceae* species, and is known as an important source of stilbenes. While a number of stilbenic compounds were identified in the leaves, stems, and roots of *V. amurensis*, the content of the individual stilbenes was not measured. This study aims to investigate stilbene spectrum, stilbene content and expression of stilbene biosynthesis pathway genes in different organs of wild-growing *V. amurensis* both in natural conditions and after UV-C elicitation. The results obtained show that the leaves, petioles, berry skins, and seeds of *V. amurensis* contained six stilbenes: *cis*-piceid, *t*-piceid, *t*-ε-viniferin, *cis*-ε-viniferin, *t*-resveratrol, and *t*-δ-viniferin. We showed that these stilbenes were actively synthesized in the grapevine leaves and berry skins collected in the autumn (0.249-0.39 mg/g DW), and the tissues actively expressed *STSs* genes. UV-C treatment increased the content of all detected stilbenes and expression of the stilbene biosynthesis pathway genes.

Keywords: *viniferin, piceid, resveratrol, phytoalexins*

Aknowlegment
This work was supported by a grant from the Russian Science Foundation (№ 14-14-00366).

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА *ATRAPHAXIS PUNGENS* (BIEB.) JAUB. & SPACH И *ATRAPHAXIS FRUTESCENS* (L.) C. KOCH

Д.К. Костиков, Т.А. Кукушкина, Е.В. Банаев
Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, г. Новосибирск, Россия,
e-mail: *dim.kostickov@yandex.ru*

Растения рода *Atraphaxis* L. проявляют антибактериальную и антиоксидантную активность, используются как красильные, дубильные, масличные, кормовые и медоносные растения. Полезные свойства растений рода *Atraphaxis* обусловлены комплексом биологически активных веществ (БАВ). В надземных и подземных органах идентифицированы флавонолы, флаваны, флавоны, антрахиноны, фенолкарбоновые кислоты и их производные. Однако содержание биологически активных веществ в растениях рода *Atraphaxis* мало изучено.

Atraphaxis frutescens (L.) C. Koch (курчавка кустарниковая) – кустарник до 70 см высотой. Ветки тонкие, неколючие. Растет в степных котловинах горных районов, переносит засоление почв, ксерофит или ксерофит–петрофит. Распространен в Сибири, Европе, Средней Азии, Монголии и Китае. *Atraphaxis pungens* (Bieb.) Jaub. & Spach (курчавка колючая) – кустарник до 80 см. Ветви толстые, на концах колючие. Произрастает в сухих каменистых степях и песчаных массивах, ксерофит-петрофит, олиготроф, солеустойчив. Распространён в Сибири, Средней Азии, Монголии, Китае, Индии и Корее.

Цель работы – исследование состава и содержания биологически активных веществ в надземных органах *A. frutescens* и *A. pungens* из природных популяций Сибири.

Материал для изучения БАВ собран в 11 популяциях *A. frutescens* и 15 популяциях *A. pungens* в Новосибирской, Омской областях, Алтайском крае, Республиках Тыва, Хакасия, Бурятия в фазе плодоношения растений в 2014-2015 гг.

Оценка содержания БАВ в органах надземной части *A. pungens* и *A. frutescens*, произрастающих на территории Сибири, проведена впервые. Выявлено, что в листьях, соцветиях и стеблях курчавки содержатся ценные группы БАВ: флавонолы, дубильные вещества, катехины, протопектины, пектины, сапонины и каротиноиды. Анализ содержания БАВ в отдельных органах растений показал, что у *A. pungens* высоким содержанием флавонолов, дубильных веществ, катехинов, протопектинов и сапонинов характеризуются листья или соцветия, каротиноидов – листья, а пектинов – соцветия. У *A. frutescens* содержание веществ распределилось по органам следующим образом: флавонолов, дубильных веществ, пектинов, протопектинов и сапонинов больше содержится в листьях или соцветиях, каротиноидов – в листьях, а катехинов – в соцветиях.

Содержание практически всех исследованных веществ выше у *A. pungens*.

Высоким содержанием флавонолов отличается *A. pungens* из окр. г. Кызыл (Респ. Тыва) (до 10 % в листьях), а катехинов в листьях *A. pungens* из окр. с. Фыркал (Респ. Хакасии) (до 3,92 %). Дубильных веществ (до 34,3 %) и протопектинов (до 11,29 %) более всего в соцветиях растений, произрастающих близ с. Июс (Респ. Хакасия).

A. frutescens также характеризуется различным характером накопления БАВ: в листьях высокое содержание каротиноидов (до 273,14 мг%) отмечено у растений из окр. с. Шекпээр (Респ. Тыва), пектинов (до 3,41 %) – из окр. д. Камышовая (Респ. Хакасия), сапонинов (до 26,38 %) – из окр. с. Петровка (Алтайский край).

Ключевые слова: *Atraphaxis pungens, A. frutescens, Сибирь, биологически активные вещества*

BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES *ATRAPHAXIS PUNGENS* (BIEB.) JAYB. & SPACH AND *A. FRUTESCENS* (L.) C. KOCH.

D.K. Kostikov, T.A. Kukushkina, E.V. Banaev
Central Siberian Botanical Garden of SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: *dim.kostickov@yandex.ru*

The plants of genus *Atraphaxis* L. exhibit antioxidant and antibacterial activity. They are used as dyeing, tanning, oil, fodder and melliferous plants. The complex of biologically active substances causes useful properties plants of genus *Atraphaxis*. Flavonols, flavans, flavones, anthraquinones, phenolcarboxylic acids and their derivatives are identified in organs of *Atraphaxis*. However, the content of biologically active substances in plants of genus *Atraphaxis* is studied little.

Atraphaxis frutescens (L.) C. Koch – shrub to 70 cm in height. Branches are thin and not prickly. It grows in the steppe hollows of mountain areas, transfers salinization of soils, xerophyte. It distributed in Siberia, Europe, Central Asia, Mongolia and China. *Atraphaxis pungens* (Bieb.) Jaub. & Spach – shrub to 80 cm in height. Branches are thick and prickly on the ends. It grows in dry rocky steppes and sandy massifs, xerophyte, oligotroph, salt-resistant. It distributed in Siberia, Central Asia, Mongolia, China, India and Korea.

The aim of this study is a comparative study of the composition and content of biologically active substances in the aboveground organs *A. frutescens* and *A. pungens* from natural populations of Siberia.

The material for the study of biologically active substances collected in 11 populations of *A. frutescens* and 15 populations of *A. pungens* in Novosibirsk and Omsk regions, the Altai Krai, the Republic of Tyva, Khakassia and Buryatia in fruiting phase of the plant in 2014-2015 years.

Assessment of the content of bioactive substances in the organs of the aboveground part of *A. pungens* and *A. frutescens*, growing in Siberia, is carried out for the first time. Revealed that the leaves, stems and inflorescences of *Atraphaxis* contain valuable groups of biologically active substances: flavonoids, tannins, catechins, protopectins, pectins, saponins and carotenoids.

Leaves and inflorescence *A. pungens* are characterized by a high content of flavonoids, tannins, catechins, saponins and protopectins. Carotenoids were found more in the leaves, and pectins – in the inflorescences. In organs of *A. frutescens* substances distributed as follows: flavonoids, tannins, pectins, saponins and protopectins more contained in the leaves and inflorescences, carotenoids – in the leaves, and catechins – in the inflorescences.

The content of practically all studied substances is higher in *A. pungens*.

A. pungens from the environs of Kyzyl is characterized by a high content of flavonoids (10.0% in the leaves), and *A. pungens* from the surroundings of village Fyrkal – catechins (3,9 % in the leaves). Tannins (34,3 %) and protopectins (11,3 %) were contained more in the inflorescences of the plants, growing near the village Iyus.

A. frutescens is also characterized by various nature of the accumulation of the biologically active substances: the high content of carotenoids (273,1 mg%) is noted in the leaves of the plants from the surroundings of village Shekpeer, pectins (to 3,4 %) – from the environs of village Kamyishovaya, saponins (26,38 %.) – from the surroundings of village Petrovka.

Keywords: *Atraphaxis pungens*, *A. frutescens*, *Siberia, biologically active substances*

ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ЛИСТЬЕВ *SPIRAEA BETULIFOLIA* PALL. И *SPIRAEA BEAUVERDIANA* SCHNEID.

В.А. Костикова[1], Т.А. Полякова[2], Д.К. Костиков[1]
[1]Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, г. Новосибирск, Россия;
e - mail: *serebryakovava@mail.ru*
[2]Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, г. Москва, Россия,
e-mail: *tat-polyakova@yandex.ru*

Растения рода *Spiraea* L. широко распространены на территории Азиатской России. Наименее изученными и, в то же время, спорными в таксономическом отношении являются виды секции *Calospira* C. Koch. *S. betulifolia* Pall. (спирея берёзолистная) произрастает на Дальнем Востоке России (ДВР), в Восточной Сибири, Северо-Восточном Китае и Японии. Ареал *S. beauverdiana* Schneid. (спирея Бовера) охватывает весь ДВР, кроме юга Приморского края, Восточную Сибирь, Китай, Корею и Северную Америку. Эти виды чрезвычайно полиморфны, в местах их совместного произрастания в Хабаровском крае и на Сахалине встречается целый ряд переходных форм, вероятно, гибридного происхождения.

В листьях и соцветиях *S. betulifolia* и *S. beauverdiana* нами обнаружены фенольные соединения с высокой биологической активностью: кумарины, дубильные вещества, флавоноиды, фенолкарбоновые кислоты. Из литературных данных также известно, что в этих спиреях найдены алкалоиды, аскорбиновая кислота и каротиноиды. Листья и соцветия *S. betulifolia* проявляют антибактериальную, фитонцидную и антиоксидантную активность, на Чукотке используются как суррогат чая. Известно, что *S. betulifolia* имеет кормовое значение. Несмотря на это, фитохимическая характеристика *S. betulifolia* и *S. beauverdiana* остаётся неполной.

Целью настоящего исследования являлось сравнительное изучение состава фенольных соединений из листьев близкородственных видов *S. betulifolia* и *S. beauverdiana*.

Материалом для изучения флавоноидов и фенолкарбоновых кислот в экстрактах из листьев *S. betulifolia* (Еврейская автономная область, окр. пос. Облучье) и *S. beauverdiana* (Магаданская область, окр. г. Магадан) послужили сборы из природных популяций в фазе плодоношения растений. Этанольные извлечения, полученные экстракцией на водяной бане 40 % спиртом, анализировали на жидкостном хроматографе «Agilent 1200» с диодноматричным детектором. Вещества идентифицировали методом сравнения времени удерживания пиков веществ на хроматограммах анализируемых образцов с временами удерживания пиков стандартных образцов и УФ спектров.

Состав и содержание фенольных соединений в экстрактах из листьев у двух близкородственных видов рода *Spiraea* различен. Выявлено 22 соединения фенольной природы, причём в листьях *S. betulifolia* содержится 17 фенольных соединений, а в листьях *S. beauverdiana* – 18. В экстрактах из листьев спирей обнаружены кислоты – хлорогеновая, *n*-кумаровая и коричная, флавонолы – кверцетин, кемпферол, рутин, гиперозид и астрагалин. Основными веществами листьев *S. betulifolia* являются гиперозид, неидентифицированное соединение № 17 (t_R, мин = 43,7 – время выхода вещества; λ_{max}, нм = 220, 310) и № 20 (t_R, мин = 46 мин; λ_{max}, нм = 220, 280, 315); а листьев *S. beauverdiana* – гиперозид, кверцетин, хлорогеновая и *n*-кумаровая кислоты, а также неидентифицированное вещество № 8 (t_R = 24 мин).

Ключевые слова: *Spiraea betulifolia*, *S. beauverdiana*, *флавоноиды, фенолкарбоновые кислоты, ВЭЖХ*

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-34-00106 мол_а.

PHENOLIC COMPOUNDS OF LEAVES *SPIRAEA BETULIFOLIA* PALL. AND *SPIRAEA BEAUVERDIANA SCHNEID.*

V.A. Kostikova[1], T.A. Polyakova[2], D.K. Kostikov[1]
[1]Central Siberian Botanical Garden of SB RAS, Novosibirsk, Russia;
e - mail: *serebryakovava@mail.ru*
[2]Vavilov Institute of General Genetics of RAS, Moscow, Russia,
e-mail: *tat-polyakova@yandex.ru*

Plants of the genus *Spiraea* L. are widespread on the territory of Asian Russia. Species of section *Calospira* C. Koch are the least studied and, at the same time, controversial in taxonomical relations. *S. betulifolia* Pall. grows in the Russian Far East, in Eastern Siberia, Northeastern China and Japan. The area of *S. beauverdiana* Schneid. covers the entire Russian Far East, except the south of the Primorsky Krai, East Siberia, China, Korea and North America. These species are exceedingly polymorphic and form the whole row of transition forms of possible hybrid origin in the places of common vegetation in Khabarovsk krai and Sakhalin.

Phenolic compounds with high biological activity: coumarins, tannins, flavonoids, phenolcarboxylic acids are found by us in the leaves and inflorescences of *S. betulifolia* and *S. beauverdiana*. It is also known from the literature that alkaloids, ascorbic acid and carotenoids are found in these species *Spiraea*. Leaves and inflorescences of *S. betulifolia* exhibit antibacterial, phytoncidic and antioxidant activity, used as a substitute for tea on Chukotka. However the phytochemical characteristic of *S. betulifolia* and *S. beauverdiana* remains incomplete.

The aim of this study is a comparative study of the composition of phenolic compounds from the leaves of the closely related species *S. betulifolia* and *S. beauverdiana*.

The material for the study of flavonoids and phenolcarboxylic acids in the extracts from the leaves of *S. betulifolia* (Jewish Autonomous Region, near the settlement Obluchye) and *S. beauverdiana* (Magadan region, near the town Magadan) was collected from natural populations in the fruiting phase of plants. The ethanol extract obtained by extraction of 40 % alcohol on water bath and analyzed on the liquid chromatograph «Agilent 1200» with diode array detector. The substances identified by the method of comparison the retention time of the substances peaks on the chromatograms of the analyzed samples with retention times of the peaks of standard samples and UV spectrum.

The composition and content of phenolic compounds in the extracts from the leaves of two closely related species of the genus *Spiraea* is different. Twenty two phenolic compounds were found; the leaves of *S. betulifolia* contain 17 phenolic compounds, and the leaves of *S. beauverdiana* – 18. Chlorogenic, *n*-coumaric and cinnamic acids, flavonols quercetin, kaempferol, rutin, astragalin and hyperosid have been found in extracts from the leaves of *Spiraea*. The main substance of the leaves of *S. betulifolia* – hyperosid, unidentified compound № 17 (t_R, = 43.7 min; λ_{max}, nm = 220, 310) and № 20 (t_R, min = 46 min; λ_{max}, nm = 220, 280, 315), and of the leaves of *S. beauverdiana* – hyperosid, quercetin, chlorogenic and *n*-coumaric acids and unidentified substance № 8 (t_R = 24 min).

Keywords: *Spiraea betulifolia*, *S. beauverdiana*, *flavonoids, phenolcarboxylic acids, HPLC*

Aknowlegment
The reported study was funded by RFBR according to the research project № 16-34-00106 мол_а.

ПОЛУЧЕНИЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ АФИЛОФАРОИДНЫХ ГРИБОВ, ВЫЗЫВАЮЩИХ БУРУЮ И БЕЛУЮ ГНИЛЬ ДРЕВЕСИНЫ

В.П. Курченко, Н.В. Сушинская, И.А. Багманян
Белорусский государственный университет, биологический факультет, г. Минск, Беларусь, e-mail: *kurchenko@tut.by*

Трутовые грибы широко распространены в средней полосе и являются перспективным возобновляемым источником для получения биологически активных веществ: меланинов, гликанов, хитина. Уже сейчас в пищевой и фармацевтической промышленности стран юго-восточной Азии нашли широкое применение представители этой группы грибов: *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum, Lentinus edodes, Fomitopsis officinalis*. В отечественной медицине при лечении болезней желудочно-кишечного тракта, злокачественных новообразований, поражений кожи и слизистых применяются препараты на основе чаги – *Inonotus obliquus f. sterilis*, основным компонентом которых является меланин. Актуальным является поиск новых источников получения биологически активных соединений из трутовых грибов.

Целью работы являлась оптимизация условий получения меланинов из плодовых тел трутовых грибов, сравнение их физико-химических свойств, а также определение возможных путей их практического использования.

В качестве объекта исследования использовали, собранные на древесине березы, плодовые тела 8 видов трутовых грибов, вызывающих бурую гниль: *Fomitopsis pinicola* (Sw.) P. Karst. (трутовик окаймленный), *Piptoporus betulinus* (Bull.) P. Karst. (березовая губка) и белую гниль: *Fomes fomentarius* (L.) Fr. (трутовик настоящий), *Trametes gibbosa* (Pers.) Fr. (траметес горбатый), *Hapalopilus nidulans* (Fr.) P. Karst. (гапалопилус гнездовой), *Trichaptum biforme* (Fr.) Ryvarden (трихаптум двоякий), *Inonotus obliquus* (Ach. ex Pers.) Pilát (трутовик скошенный, чага), *Stereum hirsutum* (Willd.) Pers. (стереум жестковолосистый). Меланины из плодовых тел трутовиков выделялись методом щелочной экстракции с последующим их осаждением соляной кислотой. Проведено сравнительное исследование элементного состава меланинов с помощью рентгенофлуоресцентной спектрометрии на приборе ElvaX (США), электронного парамагнетизма – на спектрометре «Varian E-112» (США), термический анализ проводили на «TA – 4000 Mettler Toledo» (Швейцария), спектрофотометрические измерения проводили на «Cary 50 Bio» (Австралия).

В результате проведенных исследований установлены оптимальные условия получения водорастворимых меланинов из трутовых грибов. Меланины, выделенные унифицированным методом из грибов, вызывающих бурую и белую гнили древесины березы и других субстратов, проявили значительные отличия. Полученные меланины обладают уникальными физико-химическими свойствами, которые обуславливают их фотопротекторную, генопротекторную, сорбционную и другие активности. Генерализованное поглощение в широком диапазоне длин волн в сочетании с антиоксидантными свойствами обеспечивает значительное уменьшение токсического действия УФ-излучения. Высокое содержание парамагнитных центров позволяет меланинам дезактивировать природные радикалы, образующиеся в ряде физических и химических процессов за счет большой электронно-абсорбционной емкости этих соединений. Обратимое окисление-восстановление хинон-гидрохиноновых структур позволяет меланинам участвовать в электронообменных окислительно-восстановительных и радикальных процессах. Способность к эффективному комплексообразованию с ионами тяжелых металлов объясняется наличием у этих биополимеров большого количества функциональных групп.

Ключевые слова: *трутовые грибы, меланин, фотопротектор, генопротектор, антиоксидант*

PREPARATION AND USE OF BIOLOGICAL ACTIVE SUBSTANCES OF APHYLLOPHOROID FUNGUS CAUSING BLACK AND WHITE ROTTEN WOOD

V.P. Kurchenko, N.V. Sushinskaja, I.A. Bagmanyan
Belarusian State University, Faculty of Biology, Minsk, Belarus, e-mail: *kurchenko@tut.by*

Polypores are widely distributed in the middle zone and can be viewed as promising renewable source for the production of biologically active substances: melanin, glycans, chitin. Already in the food and pharmaceutical industry of South East Asia are widely used specimens of this group of fungi: *Ganoderma applanatum, Ganoderma lucidum, Lentinus edodes, Fomitopsis officinalis*. In domestic medicine in the treatment of diseases of the gastrointestinal tract, malignant tumors, skin and mucosal lesions formulations on the basis of fungus - *Inonotus obliquus f. sterilis* are applied. The main component of that formulations is melanin. Urgent is the search for new sources of bioactive compounds from bracket fungi.

The goal of investigation was to optimize the conditions for melanin obtaining from the fruiting bodies of bracket fungi, to compare physical and chemical properties of isolated preparations, as well as the identification of possible ways for their practical usage.

For the investigation we used fruiting bodies of 8 kinds of bracket fungi that cause brown rot: *Fomitopsis pinicola* (Sw.) P. Karst. (Tinder fringed), *Piptoporus betulinus* (Bull.) P. Karst. (Birch sponge) and white rot: *Fomes fomentarius* (L.) Fr. (Polypore real), *Trametes gibbosa* (Pers.) Fr. (Trametes hunchback), *Hapalopilus nidulans* (Fr.) P. Karst. (Gapalopilus nidicolous), *Trichaptum biforme* (Fr.) Ryvarden (trihaptum two-fold), *Inonotus obliquus* (Ach. Ex Pers.) Pilát (tinder beveled, Chaga), *Stereum hirsutum* (Willd.) Pers. (Stereum rigidly piliferous).

Fruiting bodies were collected on the wood of birch. Melanin from conks was isolated by alkaline extraction with subsequent precipitation with hydrochloric acid. A comparative study of the elemental composition of melanin with the help of X-ray fluorescence spectrometry ElvaX device (USA), electronic paramagnetism was studied with the help of spectrometer «Varian E-112" (US), thermal analysis was carried out on «TA - 4000 Mettler Toledo» (Switzerland), spectrophotometric measurements were performed on «Cary 50 Bio» (Australia).

The studies established the optimal conditions for producing water-soluble melanin of bracket fungi. Melanin was isolated by unified method from conks of fungi that cause brown and white rot of birch wood, and other substrates. Obtained melanin showed significant differences in properties. In general, isolated melanins have unique physical and chemical properties that stipulate its' photoprotective, gene protective, sorption and other activities. Generalized absorption in a wide wavelength range in combination with antioxidant properties provides a significant reduction of toxic effects of UV radiation. High concentrations of paramagnetic centers allows to deactivate the natural melanin radicals generated in a number of physical and chemical processes because of the expense of a large electron-absorption capacity of these compounds. Reversible redox of quinone-hydroquinone structures allows melanin to participate in redox and radical processes. The efficient ability to form complexes with heavy metal ions due to the presence of these biopolymers is stipulated by a large number of functional groups.

Keywords: *pore fungi, melanin, photoprotectors, geneprotectors, antioxidants*

ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ЭФИРНОГО МАСЛА *SATUREJA LAXIFLORA* C. KOCH, ПРОИЗРАСТАЮЩЕГО В АБХАЗИИ

Н.В. Марко
ФГБУН «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН», г. Ялта, Россия, e-mail: *nataly-marko@rambler.ru*

Природа Кавказа выделяется значительным флористическим разнообразием: флора сосудистых растений Колхиды насчитывает 3596 видов, относящихся к 932 родам, 169 семействам (Читанава, 2007). Состав и особенности флоры Колхиды определяется положением на стыке формирования разных генетических флор: умеренной и субтропической. В силу эколого-географических особенностей здесь сформировалась растительность, включающая виды аридного Средиземноморья, влажной Колхиды, суровых условий новороссийских бореев и своеобразие высокогорья. Северная часть Черноморского побережья Кавказа относится к той же ботанико-географической провинции (St-N проф. Кузнецова), что и горная часть Крыма, по своим характеристикам близка к условиям Южного берега Крыма, что будет способствовать успеху при интродукции новых видов и образцов.

В ходе экспедиции на Черноморское побережье Кавказа в Абхазии нами был определен вид чабера рыхлоцветкового (*Satureja laxiflora* C. Koch), произрастающего в приморской полосе и в предгорьях, а так же выращиваемого местным населением и используемого в качестве пряности. В Абхазии пряно-ароматические растения чабера называют «ацибра», летом на рынках довольно часто продают его наземную массу в измельченном виде или собранную в пучки.

Наземная часть растений была срезана в окрестностях г. Сухум, в фазу массового цветения (конец июля), высушена для транспортировки в лабораторию. Эфирное масло добывали из воздушно-сухого сырья, высушенного в течение 20 дней, методом гидродисциляции по Гинзбергу. Время отгонки 1 час. Компонентный состав эфирного масла определяли с помощью хроматографа Agilent Technology 6890 с масс-спектрометрическим детектором 5973.

Установлено, что в воздушно-сухом сырье *S. laxiflora* содержится 1,86% эфирного масла. хроматографический анализ компонентного состава эфирного масла показал, что в нем содержится 27 компонентов. Доминирующими компонентами эфирного масла являются: монотерпеновый фенол – карвакрол – 62,7%, а также монотерпены: γ-терпинен – 23,0%, α-терпинен – 3,34%, β-мирцен – 1,84%; туйен – 1,4%; ароматическое соединение - р-цимен – 3,31%. Остальные компоненты содержатся в минорных количествах, менее 1,0%

Таким образом, растения вида *S. laxiflora,* растущие в Абхазии имеют достаточно высокое количество эфирного масла и могут использоваться не только как пряные, но и как эфиромасличные. Эфирное масло этих растений карвакрольного типа, с высоким количеством карвакрола, представляет интерес для медицины.

Представители вида *S. laxiflora* будут интродуцированы в Никитский ботанический сад как перспективные эфиромасличные растения с высоким содержанием биологически активных веществ.

Ключевые слова: *компонентный состав эфирного масла, чабер, Абхазия, Satureja laxiflora, интродукция*

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 14-5000079).

Выражаем благодарность заместителю директора по научной работе Института ботаники Абхазкой академии наук, к.б.н. Гуланян Татьяне Александровне за помощь в сборе семян и растительного сырья *Satureja laxiflora.*

CHEMICAL COMPOSITION OF ESSENTIAL OIL *SATUREJA LAXIFLORA* C. KOCH, GROWING IN ABKHAZIA

N.V. Marco
Nikita Botanical Gardens - National Scientific Centre, Yalta, Russia,
e-mail: *nataly-marko@rambler.ru*

Nature Caucasus allocated considerable floristic diversity: Colchis flora of vascular plants includes 3596 species belonging to 932 genera, 169 families (Tchitanava, 2007). The composition and characteristics of Colchis flora determined by the position at the intersection of formation of different genetic flora temperate and subtropical. Due to ecological and geographical features are formed vegetation, including species of arid Mediterranean, damp Colchis, harsh Boreas Novorossiysk and originality of the highlands. The northern part of the Black Sea coast belongs to the same botanical-geographical province (St-N prof. Kuznetsova) that mountainous part of Crimea, its characteristics close to those of the southern coast of Crimea, which will contribute to success in the introduction of new species and specimens.

During the expedition to the Black Sea coast in Abkhazia we determined the kind of savory - *Satureja laxiflora* C. Koch, native to the coastal strip and in the foothills, as well as cultivated by the local population and used as a spice. In Abkhazia, aromatic plants savory called "atsibra" summer markets often sell it to the ground mass in powdered form or in bundles.

Aboveground part of plants has been cut in the vicinity of Sukhumi, in the phase of mass flowering (end of July), dried for transport to the laboratory. Essential oil extracted from the air-dry raw materials, dried for 20 days by hydrodistillation by Ginsberg. The distillation for 1 hour. Component composition of essential oil was determined by Agilent Technology 6890 chromatograph with a mass spectrometer detector 5973.

It was found that the air-dry raw material *S. laxiflora* contains 1.86% essential oil. Biochemical analysis of the component composition of the essential oil revealed that it contained 27 components. The dominant components of essential oils are: monoterphene phenol - carvacrol - 62.7%, and monoterpenes: γ-terpinene - 23,0%, α-terpinene - 3.34%, β-myrcene - 1.84%, tuyen - 1.4%; aromatic compound - p-cymene - 3.31%. The remaining components in minor amounts, less than 1.0%

Thus, the plant of the species *S. laxiflora*, growing in Abkhazia have a sufficiently high amount of essential oil and can be used not only as a spice but also as an essential oil. The essential oil of these plants such as carvacrol, with a high amount of carvacrol, is of interest to medicine.

Representatives of the species *S. laxiflora* be introduced into the Nikita Botanical Gardens as promising plant essential oil with a high content of biologically active substances.

Keywords: *component composition of essential oil*, *savory*, *Abkhazia, Satureja laxiflora, introduction*.

Aknowlegments
This work was supported by the Russian Science Foundation (grant № 14-5000079).

We express our gratitude to the Deputy Director for Research of the Institute of Botany of the Abkhazian Academy of Sciences, Ph.D. Ghulanian Tatiana Alexandrovna for assistance in collecting seeds and vegetable raw materials *Satureja laxiflora*.

ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ НА ОБРАЗОВАНИЕ МИКРОБНЫХ БИОПЛЕНОК

Ю.А. Маркова[1,2], М.А. Живетьев[1], Е.В. Кочерыгина[2], И.А. Граскова[1]
[1]Сибирский институт физиологии и биохимии растений, Иркутск,
e-mail: *juliam06@mail.ru*
[2]Иркутский национальный исследовательский технический университет, г. Иркутск,
e-mail: *juliam06@mail.ru*

Вероника дубравная (*Veronica chamaedrys* L.) – многолетнее травянистое растение из семейства норичниковых (Scrophulariaceae) с обширным ареалом от Западной Европы до Восточной Сибири. Вероника популярна в народной, тибетской и китайской медицине. Стебли вероники применяются как вяжущее, ранозаживляющее, противопростудное средство, и содержат сапонины, аскорбиновую кислоту, каротины, флавоноиды, кумарины, дубильные вещества, горечи.

Был изучен количественный и качественный состав фенольных соединений (ФС) вероники дубравной в тканях листьев, соцветий и стеблей. Пробы отбирались в течение суток в 9, 15 и 21 ч в июне, августе и сентябре на юго-восточном побережье оз. Байкал. Выбор времени суток для отбора был обусловлен наиболее заметными изменениями в суточном ходе температур атмосферного воздуха. Общее содержание ФС определяли спектрометрическим методом с помощью реактива Фолина-Дениса при длине волны 720 нм. Качественный состав изучали методом ВЭЖХ.

Общее содержание ФС в соцветиях вероники было выше, чем в листьях, при этом, как правило, максимальное количество наблюдалось в 9 часов утра с последующим уменьшением в течение дня, как в соцветиях, так и в листьях.

При изучении качественного состава ФС в тканях вероники было установлено наличие 33-44 соединений, количество которых варьировало в зависимости от времени сбора и органа растения. В июне их спектр оказался выше в листьях (34-44), чем в соцветиях (34-36). Причем наибольшее разнообразие ФС чаще всего приходилось на 9 и 21 ч, что, вероятно, связано с реакцией растений на снижение температуры.

Очевидно, что для более полного проявления лекарственных свойств, сбор *Veronica chamaedrys* должен быть приурочен к утреннему или вечернему времени суток в зависимости от срока сбора.

Действие метанольного экстракта вероники дубравной после выпаривания досуха и разведения в воде было протестировано на образование биопленок грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* и *Pectobacteruim carotovorum*. Установлено, что экстракты вероники стимулировали образование биопленок исследуемыми видами, что согласуется с данными других исследователей о стимуляции образования биопленок низкими разведениями фенольных соединений.

Кроме того, было показано, что на формирование биопленок большое влияние оказывает среда культивирования, и в первую очередь – наличие и вид источника углерода. Разведение экстракта дистиллированной водой приводило к усилению оптической плотности биопленок, в то время как разведение его забуференным физиологическим раствором с добавлением 5 г/л глюкозы приводило к заметному ингибированию возникновения биопленок исследуемых видов бактерий. Таким образом, раствор, используемый для разведения высушенного экстракта, играет существенную роль в эффективности воздействия этого экстракта на формирование биопленок.

Ключевые слова: *лекарственные растения, Veronica chamaedrys, фенольные соединения, биопленки, Escherichia coli, Pectobacteruim carotovorum*

THE EFFECT OF HERBAL EXTRACTS ON THE FORMATION OF MICROBIAL BIOFILMS

Y.A. Markova[1,2], M.A. Zhivetyev[1], E.V. Kocherygina[2], I.A. Graskova[1]
[1]Siberian Institute of physiology and biochemistry of plants, Irkutsk,
e-mail: *juliam06@mail.ru*
[2]Irkutsk national research technical University, Irkutsk, e-mail: *juliam06@mail.ru*

Veronica chamaedrys is a perennial herbaceous plant of the figwort family (Scrophulariaceae) with an extensive range from Western Europe to Eastern Siberia. Veronica is popular in folk, Tibetan and Chinese medicine. The stems of Veronica are used as astringent, wound healing, cough remedy, and contain saponins, ascorbic acid, carotenes, flavonoids, coumarins, tannins, bitterness.

It was studied quantitative and qualitative composition of phenolic compounds (PCs) of *Veronica chamaedrys* in the tissues of the leaves, flowers and stems. Samples were taken during a day at 9, 15 and 21 hours in June, August and September on the South East coast of lake Baikal. The choice of time of day for sampling was due to the most significant changes in the daily temperature of atmospheric air. The total content of PCs was determined by spectrometric method using reagent Folin-Denis at a wavelength of 720 nm. The qualitative composition was studied by HPLC.

Total content of PCs in the Veronica's inflorescences was higher than in leaves, thus, as a rule, the maximum number was observed at 9 a.m. with a subsequent decrease during the day as in the inflorescences and leaves.

In the study of the qualitative composition of PCs in the tissues of Veronica was found 33-44 connections, the number of which varied depending on the time of collection and the plant organ. In June, their range was higher in the leaves (34-44) than in the inflorescences (34-36). With the largest variety of PCs most often accounted for 9 and 21 h, which is probably due to the reaction of plants to low temperatures.

Obviously, for a more complete manifestation of the healing properties, collection of *Veronica chamaedrys* should be confined to the morning or evening time of day depending on the collection period.

The effect of methanolic extract of *Veronica chamaedrys* after evaporation to dryness and breeding in the water was tested for biofilm formation of gram-negative bacteria *Escherichia coli* and *Pectobacteruim carotovorum*. Established that extracts of Veronica stimulated the biofilm formation of the studied species, which is consistent with the data of other researchers about the stimulation of the formation of biofilms in low dilutions of phenolic compounds.

In addition, it was shown that the biofilms formation is greatly influenced by the culture medium, and in the first place – the presence and type of carbon source. Dilution of the extract with distilled water increased the optical density of the biofilms, while its dilution with phosphate buffered saline with the addition of 5 g/l of glucose resulted in a marked inhibition of appearance of the studied biofilms of bacteria.

Thus, the solution used for dilution of the dried extract, plays a significant role in the effectiveness of the impact of this extract on the formation of biofilms.

Keywords: *medicinal plants (drug plants), Veronica chamaedrys, phenolic compounds (PCs), biofilms, Escherichia coli, Pectobacteruim carotovorum*

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ЛАВАНДИНА, ПРОИЗРАСТАЮЩЕГО В УСЛОВИЯХ ЮЖНОГО БЕРЕГА КРЫМА

В.Д. Работягов, А.Е. Палий
ФГБУН «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН», г. Ялта, Россия, e-mail: *onlabor@yandex.ru*

Лавандин *Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel (Lamiaceae) является межвидовым гибридом лаванды узколистной (*Lavandula angustifolia* Mill.) и лаванды широколистной (*Lavandula latifolia* Medic.). Растение широко используется в декоративном озеленении, медицине, парфюмерии. Эфирное масло имеет цветочно-фруктовое направление запаха, его основными компонентами являются монотерпеновые сложные эфиры (линалилацетат, геранилацетат, борнилацетат, терпенилацетат) и монотерпеновые спирты (линалоол, гераниол, терпениол). В растительном сырье лавандина также содержатся флавоноиды, гидроксикоричные кислоты и кумарины.

В ГБУ РК «НБС – ННЦ» ведутся многолетние работы по интродукции и селекции лавандина, в результате которых были получен целый ряд хозяйственно-ценных сортов и гибридов.

Целью настоящего исследования являлось изучение качественного и количественного состава терпеновых и фенольных соединений перспективного аллогаплоиднго гибрида лавандина 101-75, произрастающего в условиях Южного берега Крыма.

В результате проведенных исследований установлено, что урожайность данного образца лавандина составляла 165-170 ц/га, массовая доля эфирного масла из соцветий - 3,8% от сырой массы. При хроматографическом разделении эфирного масла идентифицировано 50 компонентов. Критерием парфюмерных достоинств эфирного масла лавандина является высокое содержание монотерпеновых спиртов и сложных эфиров, среди которых основное место принадлежит линалилацетату. Существенно отрицательное влияние на аромат эфирного масла оказывают камфора и 1,8-цинеол. Массовая доля монотерпеновых спиртов в эфирном масле исследуемого образца лавандина составляла 55,8%, сложных эфиров – 17,4%. Основными компонентами являлись линалоол (52,2%) и линалилацетат (16,2%). Данный образец лавандина характеризовался низким суммарным содержанием камфоры и 1,8-цинеола 11,6%.

Содержание фенольных веществ определяли в водно-этанольном экстракте, приготовленном из воздушно-сухого растительного сырья. Экстракцию проводили 70%-ным этанолом при соотношении сырья и экстрагента – 1 : 10 настаиванием в течение 10 суток при комнатной температуре. Выявлено, что в водно-этанольном экстракте лавандина содержится 1148 мг/дм^3 фенольных соединений. При помощи метода высокоэффективной жидкостной хроматографии обнаружено 13 компонентов, из которых 8 идентифицировано.

Фенольные соединения данного образца лавандина представлены гидроксикоричными кислотами: хлорогеновой, розмариновой, *п*-кумаровой, 4-О-кофеилхинной, а также флавноидами: пиноцембрином, гликозидами апигенина и лютеолина. Содержание флавоноидов в экстракте (607 мг/100г) превышало содержание гидроксикоричных кислот (455 мг/100 г). Преобладающими компонентами являлись *п*-кумаровая кислота (202 мг/100г) и гликозид апигенина (196 мг/100г).

Таким образом, аллогаплоидный гибрида лавандина 101-75 содержит высокие концентрации летучих соединений, доминирующими из которых являются линалоол и линалилацетат, а также гидроксикоричные кислоты и флавоноиды, что показывает целесообразность культивирования данного образца для создания различных видов продукции (пищевой, косметической и лечебно-профилактической).

Ключевые слова: *Lavandula x intermedia, эфирное масло, терпеновые соединения, фенольные вещества*

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 14-5000079).

BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS IN LAVANDULA GROWING IN THE CONDITIONS OF THE SOUTH COAST OF CRIMEA

V.D. Rabotyagov, A.E. Paliy
Nikita Botanical Gardens - National Scientific Centre, Yalta, Russia,
e-mail: *onlabor@yandex.ru*

Lavandin (*Lavandula* x *intermedia* Emeric ex Loisel) (Lamiaceae) is an interspecific hybrid of lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.) and *Lavandula latifolia* Medic. The plant is widely used in ornamental gardening, medicine and perfume industry. The essential oil has a floral-fruity odor, its main components are monoterpene esters (linalyl acetate, geranilatsetat, bornylacetate, terpenilatsetat) and monoterpene alcohols (linalool, geraniol, terpeniol). Lavandin plant feedstock also contains flavonoids, hydroxycinnamic acids and coumarins.

In FSBIS "NBG - NSC" long-term works on Lavandin introduction and breeding resulted in selection of a number of commercially valuable cultivars and hybrids have been maintained.

The aim of this study was to evaluate the qualitative and quantitative composition of terpene and phenolic compounds in promising allohaploid Lavandin hybrid 101-75 grown in the conditions of Southern coast of Crimea.

It was found that the crop yield of the studied Lavandin specimen was 165-170 c/ha, the mass fraction of the essential oil in inflorescence - 3.8% of the fresh weight. In the chromatographic separation of the essential oil 50 components were identified. The criterion for perfume virtues of Lavandin essential oil is the high content of monoterpene alcohols and esters, among which the main place belongs to linalyl acetate. Camphor and 1,8-cineol had a significantly negative effect on the essential oils aroma. Mass fraction of monoterpene alcohols in the essential oil of tested Lavandin sample was 55.8%, ester - 17.4%. The main components were linalool (52.2%) and linalyl acetate (16.2%). This Lavandin sample is characterized by low total content of camphor and 1,8-cineol - 11.6%.

The content of phenolic compounds was determined in water-ethanol extract prepared from air-dried plant feedstock. Extraction was carried out with 70% ethanol, extractant: feedstock - 1: 10 infusion for 10 days at room temperature. It was revealed that water-ethanol extract of Lavandin had 1148 mg/dm^3 of phenolic compounds. Using HPLC 13 components were found and 8 of them were identified.

Phenolic compounds of this Lavandin sample were represented by hydroxycinnamic acids: chlorogenic, rosemary, p-coumaric, 4-O-kofeilhinnoy and flavnoids: pinocembrin, apigenin glycosides and luteolin. The content of flavonoids in the extract (607 mg/ 100g) exceeded the content of hydroxycinnamic acids (455 mg/ 100 g). The predominant components were p-coumaric acid (202 mg / 100g) and apigenin glucoside (196 mg / 100g).

Thus, allogaploid Lavandin hybrid 101-75 contains high concentrations of volatile compounds, the dominant ones are linalool and linalyl acetate, as well as hydroxycinnamic acids and flavonoids that indicates expedience of its culture for creating various kinds of products (food, cosmetics, therapeutic and prophylactic).

Keywords: *Lavandula x intermedia, essential oils, terpene compounds, phenolic compounds*

Aknowlegment
This study was funded by a research grant № 14-50-00079 of the Russian Science Foundation.

ИЗУЧЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ЛИСТЬЕВ АМАРАНТА *(A. PANICULATUS)* И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Г.Г. Соколенко
ФГБОУ ВО «Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I», г. Воронеж, Россия, e-mail: *galigri@mail.ru*

В последние годы усилился поиск так называемых «ресурсных видов», обладающих высокими адаптационными способностями и практической значимостью. Перспективным видом растительного сырья с антиоксидантными свойствами являются растения рода *Amaranthus.* Во всех частях амаранта содержится большое количество аминокислот, микроэлементов, витаминов, биологически активных веществ, обладающих антиоксидантными свойствами. Он отличается большой продуктивностью биомассы, высокими адаптационными свойствами, приспособлен к произрастанию практически на всей территории России. Из зеленой массы амаранта наибольшей биологической ценностью и содержанием антиоксидантных веществ обладают листья, они представляют интерес для получения функциональных продуктов.

Изучена антиоксидантная активность листьев *A. paniculatus* и условия получения экстрактов с высокой антиоксидантной активностью, разработаны технологии функциональных напитков с их использованием. При исследовании зависимости антиоксидантной активности экстрактов амаранта от способов заготовки, методов экстракции и сроков хранения, установлено, что максимальные значения антиоксидантной активности имели водные экстракты, полученные способом настоев из свежих листьев амаранта, заготовленных в фазе цветения. Она была на 8,5% выше, чем при использовании замороженных листьев и на 46 % – сушеных. Хранение экстрактов при 4°С позволяет сохранить антиоксидантную активность в течение 4 месяцев на достаточно высоком уровне. Проведены исследования по применению листьев амаранта для получения функциональных напитков – сывороточного кваса и пива. Установлено стимулирующее влияние экстракта амаранта на размножение и физиологическую активность рас хлебопекарных и пивных дрожжей *S. cerevisiae*. Показано, что при сбраживании молочной сыворотки, содержащей 1% экстракта, накопление биомассы хлебопекарных дрожжей на 13% выше контроля, а его содержание в пивном сусле повышло на 19% биомассу *S. cerevisiae W 34/70*. Пивные дрожжи лучше флокулировали, по сравнению с контролем упитанность дрожжевых клеток была на 10% выше, а процент мертвых клеток ниже в 2,3 раза.

Разработаны технологии функциональных напитков – сывороточного кваса с экстрактом амаранта и пивного напитка «Амарантный». Выявлено, что содержание водного экстракта листьев амаранта в среде сбраживания не только повышает биологическую ценность напитков, но и улучшает их органолептические свойства. Сывороточный напиток имел освежающий кисло-сладкий вкус, аромат свежеиспеченного хлеба, отсутствовал трудно устраняемый сывороточный привкус.Разработанная технология пивного напитка «Амарантный» с применением сухих листьев *A. paniculatus,* позволяет получить напиток с высокими органолептическими свойствами, с повышенной высотой пены, более высокой пеностойкостью по сравнению с контрольным сортом, обогащенный антиоксидантными соединениями, витаминами, полноценным белком, пектином и другими биологически активными соединениями амаранта. Пивной напиток «Амарантный» отличался гармоничным вкусом с мягкой хмелевой горечью, чистым свежим запахом, появился слегка ощутимый аромат лайма, имел цвет с выраженным золотистым оттенком.

Таким образом, применение экстрактов листьев амаранта позволит расширить ассортимент функциональных напитков с улучшенными вкусовыми показателями и полезными свойствами.

Ключевые слова: *амарант, A. paniculatus, антиоксидантная активность, дрожжи, функциональные напитки*

STUDY AMARANTH LEAVES *(A. RANICULATUS)* ANTIOXIDANT ACTIVITY AND THEIR USE IN THE FOOD INDUSTRY

G. Sokolenko
The Peter I Voronezh State Agrarian University, 394087, Voronezh, Russia,
e-mail: *galigri@mail.ru*

In recent years has intensified "resource types" which have high adaptation ability and practical significance. A prospective view of plant material with antioxidant properties are the plants of the genus *Amaranthus.* In all parts of the *Amaranth* contains numerous amino acids, trace elements, vitamins, biologically active substances with antioxidant properties. It is distinguished by a large biomass productivity, high absorptive properties, adapted to growth on almost the whole territory of Russia. Amaranth green mass of greatest biological value and contents of antioxidant substances have leaves, they are of interest to obtain functional products.

Investigated antioxidant activity *A. paniculatus* leaves and conditions for obtaining extracts with high antioxidant activity, developed technologies of functional drinks using them. In the study of the dependence of antioxidant activity of extracts of Amaranth from harvesting, extraction methods and retention periods, determined that the maximum values of the antioxidant activity of aqueous extracts were obtained by way of infusions of fresh leaves of amaranth, harvested at the flowering stage. It was 8,5% higher than when using frozen leaves and 46% – dried. Storing of extracts (4°C) allows to save the antioxidant activity for 4 months at a high enough level. Studies on application of amaranth leaves to obtain functional beverages-whey drink and beer. Installed a stimulatory effect of amaranth extract on reproduction and physiological activity of strains bakery and yeast *S. cerevisiae*. It is shown that fermentation of whey, containing 1% extract, yeast biomass accumulation on 13% higher than the control and its content in the beer wort at 19% of the biomass of *S. cerevisiae* W 34/70. Brewer's yeast is better flocculated, as compared with control chubs up yeast cells was 10% higher, and had dead cells below in 2,3 times.

Developed technology of functional drinks-whey with amaranth extract and beer drink "Amarantnyi". It was revealed that the content of an aqueous extract of the amaranth leaves in wednesday fermentation improves biological value drinks, and also improves its organoleptic properties. Whey drink had a refreshing sour-sweet flavour, the aroma of freshly baked bread, absent hard curable whey flavor. The developed technology of beer drink «Amarantnyi" using dried leaves *A. paniculatus*, allows you to get a drink with high organoleptic properties, with the increased height of the foam, higher beer foam standing compared to the control variety, enriched with antioxidant compounds, vitamins, high-grade protein, pectin and other biologically active compounds of amaranth. Beer drink "Amarantnyi" distinguished and harmonious taste with a mild hop bitterness, clean fresh smell, appeared slightly perceptible aroma of lime had a color with a pronounced golden shade.

Thus, the use of extracts of amaranth leaves will expand the range of functional beverages with improved taste and useful properties.

Keywords: *amaranth, A. paniculatus, antioxidant activity, yeast, functional beverages*

ВЛИЯНИЕ МЕТИЛЖАСМОНАТА НА СИНТЕЗ ФУРОСТАНОЛОВЫХ ГЛИКОЗИДОВ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ДИОСКОРЕИ ДЕЛЬТОВИДНОЙ

М.Т. Ханды[1], Д.В. Кочкин[2], А.М. Носов[2]
[1]Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова, г. Якутск, Россия, e-mail: *handy_89@mail.ru*
[2]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, г. Москва, Россия, e-mail: *dmitry-kochkin@mail.ru*

Метилжасмонат (MJ) выполняет ряд сигнально-регуляторных функций в растительной клетке, одной из которых является активация вторичного метаболизма. Во многих публикациях показано действие MJ на культуру клеток высших растений, при этом жасмонаты часто являются индукторами образования в клетках *in vitro* вторичных метаболитов в случае их исходно низкого содержания или отсутствия в клетках. В то же время в доступной литературе практически нет данных о влиянии жасмонатов на интенсивность вторичного метаболизма в клетках *in vitro* при относительно высоком уровне содержания в них вторичных метаболитов. В данной работе представлены результаты действия метилового эфира жасминовой кислоты на биосинтетические и ростовые характеристики суспензионной культуры клеток *Dioscorea deltoidea* штамм ИФР-ДМ-0,5 – суперпродуцента стероидных гликозидов.

В качестве объекта исследования использовали суспензионную культуру клеток *D. deltoidea*, штамм ИФР-ДМ-0,5 линия 2У. Суспензионную культуру выращивали на модифицированной среде MS с добавлением 2,4-Д и кинетина при температуре 26±0,5°С. Рост и физиологическое состояние культуры характеризовали, определяя сырую и сухую массу, а также жизнеспособность клеток. Качественное и количественное содержание фуростаноловых гликозидов в сухой биомассе определяли методом ВЭЖХ (прибор Agilent 1200 Series; колонка Pecosphere 3CR C18, детекция по поглощению при 203 нм.) Элюирование осуществляли в изократическом режиме при соотношении ацетонитрил : вода (24 : 76, по объему). Количественное содержания S- и R-изомеров дельтозида и протодиосцина определяли по стандарту R-протодиосцина чистотой 98 %. Метилжасмонат в среду добавляли в середине экспоненциальной фазы роста в двух концентрациях – 100 и 300 мкМ на литр суспензии.

По анализу ростовых характеристик выявлено, что добавление MJ ухудшает рост клеток *in vitro*. Индекс роста в экспериментальных вариантах не превышал 2, тогда как в контроле – 6. При этом жизнеспособность культуры клеток при добавлении 100 мкМ MJ оставалась на достаточно высоком уровне (более 70%) и достоверно не отличалась от контроля, тогда как жизнеспособность клеток в варианте с добавлением 300мкМ MJ ежедневно снижалась в среднем на 2-3%, что приводило к полной гибели популяции к 21 суткам культивирования.

Показано, что MJ в концентрации 300 мкМ повышает общее содержание фуростаноловых гликозидов в сухой биомассе на 32% (относительно контроля). Стоит отметить, что в большей степени увеличивается продуктивность S-протодиосцина (44мг/л суспензии – контроль и 49 мг/л – эксперимент MJ, 300 мкМ). Однако, действие элиситора продолжалось не более 2х суток. Ранее краткосрочный эффект повышения синтеза гликозидов жасмонатами был показан на культуре клеток женьшеня и тиса.

Таким образом, MJ повышает биосинтез стероидных гликозидов в штамме сверхпродуценте – культуре клеток *D.deltoidea.* Однако, жасмонат действует краткосрочно и снижает показатели роста клеток *in vitro*.

Ключевые слова: *культура клеток, Dioscorea deltoidea, стероидные гликозиды, протодиосцин, дельтозид, метилжасмонат*

EFFECT OF METHYL JASMONAT ON FUROSTANOL GLYCOSIDE PRODUCTION IN DIOSCOREA DELTOIDEA CELL CULTURE

M.T. Khandy[1,2], D.V. Kochkin[2], A.M. Nosov[2]
[1]M. K. Ammosov North-Eastern Federal University, Yakutsk, Russia,
e-mail: *handy_89@mail.ru*
[2]M.V.Lomonosov Moscow State University , Moscow, Russia,
e-mail: *dmitry-kochkin@mail.ru*

Methyl jasmonate (MJ) is a volatile organic compound used in plant defense and many diverse developmental pathways such us secondary metabolism. In more early research focused primarily on MJ induction effect on low content or does not content secondary metabolite in plant cell culture than its role in producing strains. In the present work, MJ effect on *Dioscorea deltoidea* suspension culture (a furostanol glycosides superproducer) result presents.

The experiment was carried out on *D. deltoidea* suspension culture strain IPP-DM-0.5 line 2U. The suspension culture was grown a modified MS medium supplemented with 2,4-D and kinetin at 26 ± 0,5 ° C. The cell culture growth and physiological condition was characterized by determining the wet and dry weight, and the cell viability. The qualitative and quantitative content furostanol glycoside in the dry biomass was determined by HPLC (Agilent 1200 Series instrument. Column: Pecosphere 3CR C18, detection by absorbance at 203 nm.) Elution is performed in isocratic mode at a ratio of acetonitrile: water (24: 76, by volume). The protodioscin and deltoside S- and R-isomers quantitative content determined by standard R-protodioscin purity 98%. Methyl jasmonate was added to the medium at the mid exponential growth phase at two concentrations - 100 and 300 mM per liter of suspension.

We found that the MJ decreases cell *in vitro* growth characteristics. Index growth in experimental embodiments does not exceed 2, while in the control - 6. The viability cell culture was a high level (over 70%) after the addition of 100 mM MJ as well as control. Whereas the viability cell was decreased on average by 2-3% daily in the experiment with 300 mM MJ and resulting in a total loss of the population to 21 days of culture.

It is shown that at a concentration of 300 MJ mM increases furostanol glycoside total in dry biomass of 32% (relative to control). The S-protodioscin productivity was increased more than the other (44mg / l suspension of - monitoring and 49mg / l - Experiment MJ, 300 mM). However, the elicitor effect lasted no more than 2 days. Previously, short-term effect of increasing the synthesis of glycosides jasmonate was shown in ginseng and yew cell cultures.

Thus, MJ enhances biosynthesis of steroid glycosides in the superproducer strain – *D. deltoidea* culture cells. However, one is the short-term effect and MJ reduces the growth rate of cells *in vitro*.

Keywords: *cell culture, Dioscorea deltoidea, steroidal glycosides, protodioscin, deltoside, methyl jasmonate*

БИОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ *TOMOPHAGUS* И *GANODERMA* МАКРОМИЦЕТНОЙ ФЛОРЫ ВЬЕТНАМА И РОССИИ, ПОЛЕЗНЫЕ В ТАКСОНОМИЧЕСКОМ ПЛАНЕ

О.М. Цивилева[1], Т.Ф. Нгуен[2], М.П. Чернышова[1], Н.А. Юрасов[3], А.Н. Петров[4], В.В. Верхотуров[5]

[1]Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, г. Саратов, Россия, e-mail: *tsivileva@ibppm.sgu.ru*

[2]Южный институт экологии Вьетнамской академии наук и технологий, г. Хошимин, Вьетнам, e-mail: *npthao.tnsv@gmail.com*

[3]Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского», г. Саратов, Россия, e-mail: *nik-yurasov@yandex.ru*

[4]Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Иркутский государственный университет», г. Иркутск, Россия, e-mail: *petrov@mail2k.ru*

[5]Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Иркутский национальный исследовательский технический университет», г. Иркутск, Россия, e-mail: *biovervv@mail.ru*

Макробазидиомицеты семейства Ganodermataceae - высшие грибы, известные своей чрезвычайно высокой ценностью в фундаментальном биологическом, фармакологическом, социо-экономическом аспектах. Способные к обитанию в жарких и влажных условиях субтропических и тропических регионов, многочисленные виды Ganodermataceae характерны для Вьетнама.

Лекарственные грибы-базидиомицеты, представители родов *Tomophagus* и *Ganoderma*, получены в результате полевых исследований на территории нескольких Национальных парков Вьетнама. В работе изучены виды *Ganoderma colossus, G. neojaponicum, G. lucidum, G. applanatum* и *T. cattienensis,* находящиеся в коллекции Гербария Южного Института Экологии (г. Хошимин, Вьетнам). Еще три коллекционных штамма *Ganoderma*, происходящие из Европейского и Сибирского регионов, использованы для сравнения. Основываясь на Index Fungorum и анализе литературы, использовали названия видов *Ganoderma colossus* (Fr.) C.F. Baker и *Tomophagus cattienensis* Tham & Moncalvo 2012.

Исследованы макро- и микроскопические, культуральные признаки при твердофазной и жидкофазной ферментации, применимые в качестве факторов дополнительной идентификации и характеризации. Выявлены особенности липидного пула низкомолекулярных химических составляющих мицелия, потенциально значимые в таксономическом плане.

Низкомолекулярную химическую составляющую мицелия и культуральной жидкости характеризовали методами газовой хроматографии в вариантах газовой хроматографии с масс-селективным детектированием и газожидкостной хроматографии. Обнаружены параметры жирнокислотного состава мицелия отдельных видов, интересные в таксономическом плане. Только *G. neojaponicum* характеризовался высоким содержанием жирной кислоты с нечетным числом атомов углерода $C_{15:0}$ и присутствием гидроксикислоты $C_{2\text{-OH } 16:0}$. Исключительно у *G. cattienensis* найдена 3-гидроксикислота $C_{3\text{-OH } 14:0}$. Обнаружение 3-гидрокси-соединений ($C_{3\text{-OH } 12:0}$ и $C_{3\text{-OH } 14:0}$, причем только у двух указанных видов) необычно для высших грибов и представляет интерес для хемосистематики.

Существенные количественные различия между жирнокислотными профилями глубинного мицелия изученных видов обосновывают направление отбора активного природного продуцента, отличающегося разнообразием гидроксикислот, моно- и полиеновых жирных кислот, при этом велико влияние географического происхождения объектов исследования.

Ключевые слова: *макромицеты, Tomophagus, Ganoderma, микроструктуры мицелия; культуральные характеристики, химический состав, газохроматографический анализ*

BIOCHEMICAL STUDIES OF *TOMOPHAGUS* AND *GANODERMA* FROM VIETNAMESE AND RUSSIAN MACROMYCETES FLORA APPLICABLE TO TAXONOMIC PROBLEMS

O.M. Tsivileva[1], T.P. Nguyen[2], M.P. Chernyshova[1], N.A. Yurasov[3], A.N. Petrov[4], V.V. Verkhoturov[5]
[1]Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, 13 Prospekt Entuziastov, Saratov, Russia, e-mail: *tsivileva@ibppm.sgu.ru*
[2]Southern Institute of Ecology, Vietnam Academy of Science and Technology, Ho Chi Minh city, Vietnam, e-mail: *npthao.tnsv@gmail.com*
[3]N.G. Chernyshevskii Saratov State University, Saratov, Russia, nik-yurasov@yandex.ru
[4]Irkutsk State University, Irkutsk, Russia, e-mail: *petrov@mail2k.ru*
[5]Irkutsk National Research Technical University, Irkutsk, Russia, e-mail: *biovervv@mail.ru*

Macrobasidiomycetes from the family Ganodermataceae are known to be extremely important mushrooms in fundamental biological, medicinal, socio-economic aspects. These mushrooms are among those fungi that can thrive under hot and humid conditions and are usually found in subtropical and tropical regions. There are numerous Ganodermataceae species that are native to Vietnam.

Medicinal basidiomycetes, the representatives of *Tomophagus* and *Ganoderma* genera, were collected in field studies from different sites of Vietnamese National Parks. The species explored in this communication were *Ganoderma colossus, G. neojaponicum, G. lucidum, G. applanatum,* and *T. cattienensis,* deposited at the Herbarium of Southern Institute of Ecology (Ho Chi Minh city, Vietnam). Three additional herbarium strains of *Ganoderma* from European and Siberian regions have been implemented in the present framework for the purposes of comparison. Through Index Fungorum and literature survey, the names *Ganoderma colossus* (Fr.) C.F. Baker and *Tomophagus cattienensis* Tham & Moncalvo 2012 were used throughout this work.

The macro- and microscopic details, cultural features on solid and liquid fermentation capable of serving as the supporting identification and characterization factors, were explored. The peculiarities of lipidic pool of low-molecular chemical constituents of mycelium, which could likely be significant for taxonomic differentiation, were elucidated.

Low-molecular-weight constituents of the mycelia are characterized by means of the gas chromatography coupled with mass spectrometric detection, and gas-liquid chromatography techniques as variants of gas chromatographic analysis. The peculiarities of fatty-acid composition of several species' mycelia are quite interesting for taxonomy studies. Thus, only *G. neojaponicum* is characterized by the high level of fatty acid with an odd number of carbon atoms $C_{15:0}$ along with the presence of $C_{2\text{-OH } 16:0}$ hydroxyacid. Exclusively *G. cattienensis* shows the presence of 3-hydroxyacid $C_{3\text{-OH } 14:0}$. Finding the 3-hydroxyacids ($C_{3\text{-OH } 12:0}$ and $C_{3\text{-OH } 14:0}$, therewith in only two species just mentioned) is uncommon for higher fungi, and could be useful for chemosystematics.

The remarkable quantitative differences between the fatty-acid profiles of the submerged mycelia of the species under study substantiate the line of selection of the active natural producer characterized by a variety of hydroxy-, mono-, and polyenic unsaturated fatty acids, therewith the different geographic sampling of fungal objects being of rather decisive importance.

Keywords: *macromycetes, Tomophagus, Ganoderma, mycelial microstructures; culture characteristics, chemical composition, gas-chromatographic analysis*

ПРЕДСТАВИТЕЛИ СЕМЕЙСТВА *MYRTACEAE* L. КАК ИСТОЧНИК АНТИМИКРОБНЫХ СРЕДСТВ

Н.В. Цыбуля
Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, г. Новосибирск, Россия,
e-mail: *ntsybulya@yandex.ru*

Сезонная антимикробная активность летучих выделений миртовых и масляных экстрактов их листьев на тест-объектах изучена недостаточно. Цель работы – изучить количественные и качественные показатели антимикробной активности некоторых видов миртовых в отношении тест-объектов для выявления новых перспективных источников лекарственного сырья и фитонцидотерапии.

Сравнивали антимикробную активность масляных экстрактов и летучих выделений интактных растений и листьев представителей 7 родов 11 видов. Использовали метод «опарения» летучими выделениями: листьев – штриховых посевов микробных тестов в чашках Петри (оценка в 4-х балльной шкале) и дистанционный метод оценки антимикробной активности интактных растений в специальных боксах. Чувствительность тест-объектов к масляным экстрактам определяли диско-диффузным методом. Масляные экстракты листьев получали с учетом методических указаний. В качестве микробных тест-объектов использовали патогенные и условно-патогенные грамположительные и грамотрицательные бактерии и дрожжеподобные грибы (всего 8 видов).

Исследованные представители сем. *Myrtaceae* подавляли рост всех грамположительных бактерий. Наиболее высокие показатели антимикробной активности обнаружены у летучих выделений листьев *Eucaliptus camaldulensis* и *Metrosideros excelsa, Callistemon linearis*. Близкую к ним активность проявили *Agonis flexiosa, Myrtus communis* и два вида рода *Psidium*. Наиболее широким спектром антимикробного действия обладали масляные экстракты листьев *E. camaldulensis*, *M. excelsa* и *M. communis* они подавляли рост шести из восьми протестированных тест-микробов. В отношении грамотрицательных бактерий антимикробная активность масляных экстрактов была различной: ни один образец не проявил активности к *Pseudomonas aeruginosa*, но все проявили значительную активность в отношении бактерий *Escherichia coli* и *Enterococcus faecalis.* Летучие соединения исследованных образцов листьев показали высокую активность к стафилококку и умеренную к грибам. В отношении бактерии *E. coli* активность менялась в течение года: отсутствовала или была низкая в весеннее-летнее время и возрастала в осенне-зимний период.

Все исследованные образцы листьев миртовых проявили антимикробную активность к грамположительным тест-объектам. Масляные экстракты листьев показали значительную активность в отношении бактерий *Escherichia coli* и *Enterococcus faecalis,* однако не проявили активности к грибам *Candida albicans* (кроме *Myrtus communis* и *Psidium guajava).* Изученные образцы миртовых представляют собой потенциальный источник сырья для получения антимикробных препаратов, а также для внедрения в интерьерное озеленение с целью усиления санирующей роли растений.

Ключевые слова: *Myrtaceae, антимикробная активность, летучие выделения растений, масляные экстракты листьев, тест-микробы*

REPRESENTATIVES OF *MYRTACEAE* L. FAMILY AS A SOURCE OF ANTIMICROBIAL SUBSTANCES

N.V. Tsybulya
Central Siberian Botanical Garden, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia, e-mail: *ntsybulya@yandex.ru*

Seasonal antimicrobial activity of the volatile emissions of myrtle plants and oil extracts of their leaves has been insufficiently studied with respect to test objects. Goal of work is to study the quantitative and qualiltative indices of antimicrobial activity of some species of *Myrtaceae* L. family with respect to test objects in order to reveal new promising sources of herbal medicines and phytoncide-based therapy.

Antimicrobial activities of oil extracts and volatile emissions of intact plants and leaves of the representatives of 7 genera, 11 species were compared. Hatched plating samples of microbial tests in Petri dishes were treated with volatile emissions from leaves, and score-based (0 to 4) evaluation of growth inhibition was carried out. The method based on remote evaluation of antimicrobial activity of intact plants in special boxes was also used. The sensitivity of test objects to oil extracts was determined using the disc diffuse method. Oil extracts of leaves were obtained according to recommendations. Pathogenic and conventionally pathogenic gram-positive and gram-negative bacterial and yeast-like fungi (8 species as a total) were used as microbial test objects.

The studied representatives of *Myrtaceae* family suppressed the growth of all gram-positive bacteria. The highest antimicrobial activity was discovered for the volatile emissions of the leaves of *Eucaliptus camaldulensis* and *Metrosideros exselsa, Callistemon linearis*. Close activity was also exhibited by *Agonis flexiosa, Myrtus communis* and two species of the *Psidium* genus. The widest range of antimicrobial action was exhibited by the oil extracts of the leaves of *E. camaldulensis*, *M. exselsa* and *M. communis*: they suppressed the growth of six microbial species (among 8 tested species). The antimicrobial activity of oil extracts with respect to gram-negative bacteria was diverse: none of the samples was active against *Pseudomonas aeruginosa* but all samples exhibited substantial activity against *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* The volatile compounds emitted by leaves demonstrated high activity against staphylococcus and moderate activity against fungi. The activity against *E. coli* varied during the seasons: it was absent or low in spring and summer, and increased in autumn and winter.

A general trend was discovered: all the studied samples of myrtle leaves exhibited antimicrobial activity against gram-positive microbial test objects. Oil extracts of leaves exhibited substantial activity against *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis,* however, they did not demosntrate activity against *Candida albicans* fungi (except *Myrtus communis* and *Psidium guajava).* The studied representatives of myrtle plants are a potential source of raw material to obtain new antimicrobial preparations; they may also be introduced in indoor planting for the purpose of strengthening the sanifying role of plants.

Keywords: *Myrtaceae, antimicrobial activity, volatile emissions from plants, oil extracts of leaves, test microbes*

БИОСИНТЕЗ ФИТОЭКДИСТЕРОИДОВ В КУЛЬТУРЕ *HAIRY ROOT* ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *SILENE* L.

А.А. Эрст[1], Т.В. Железниченко[1], Л.Н. Зибарева[2], А.А. Бадулина[2], О.В. Ковзунова[3]
[1]ФГБУН Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, г. Новосибирск, Россия,
e-mail: *annaerst@yandex.ru*
[2]ФГАОУ ВПО НИ Томский государственный университет, г. Томск, Россия,
e-mail: *zibareva.lara@yandex.ru*
[3]ГНУ Центральный ботанический сад НАН Беларуси, г. Минск, Республика Беларусь,
e-mail: *olga-kopa@mail.ru*

Семейство Гвоздичных является богатым в отношении количества видов, способных синтезировать экдистероиды, высокого содержания и широкого экдистероидного профиля. Однако оно многочисленно и еще недостаточно изучено, чем и привлекает внимание многих исследователей. В настоящее время по литературным и нашим экспериментальным данным экдистероиды обнаружены более чем в 150 видах рода *Silene* L., 12 - в *Lychnis* L. и ряд видов в других родах (Зибарева, 2003; Zibareva et al., 2004). Ни в одном из других семейств не выявлено такое множество экдистероидсодержащих видов. Наиболее часто встречающимися являются 20-гидроксиэкдизон (20Е), полиподин В, 2-дезокси - производные 20Е, экдизона, витикостерона Е, интегристерона А. Актуальным является как поиск растительных продуцентов, так и способов получения биомассы для изучения процессов метаболизма, в том числе с помощью альтернативных биотехнологических методов.

Культура *hairy root* – устойчивая биотехнологическая система, которая сохраняет клеточную и тканевую специализацию, что важно для поддержания постоянного уровня биосинтеза вторичных метаболитов, способная к росту без использования экзогенных регуляторов роста. Эффективность использования данной системы показана для таких экдистероидсинтезирующих растений как *Ajuga turkestanica* (Cheng et al., 2008), *Ajuga reptans* (Matsumoto, Tanaka, 1991), *Serratula tinctoria* (Delbeque et al., 1995). Целью данной работы явилось исследование биосинтеза фитоэкдистероидов культуры *hairy root* представителей рода *Silene*.

Результаты исследования показали, что разработанный способ и подобранные условия культивирования *in vitro* способствовали синтезу экдистероидов в *hairy roots* представителей рода *Silene*. Методом ВЭЖХ обнаружен ряд как неполярных, так и средне полярных экдистероидов. Кроме того, вследствие присутствия в питательной среде элиситора в процессе биосинтеза образуется более разнообразный состав экдистероидов. Содержание мажорного экдистероида – 20Е превышало его уровни в каллусных культурах. Таким образом, культура *hairy root* видов рода *Silene* является перспективной системой для изучения путей биосинтеза фитоэкдистероидов и механизмов его направленного регулирования.

Ключевые слова: *Silene, hairy root, фитоэкдистероиды, ВЭЖХ*

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 15-54-04083 Бел_мол_а.

PRODUCTION OF PHYTOECDYSTEROIDS BY HAIRY ROOT CULTURES OF SPECIES OF *SILENE* L.

A.A. Erst[1], T.V. Zheleznichenko[1], L.N. Zibareva[2], A.A. Badulina[2], O.V. Kovzunova[3]
[1]Central Siberian botanical garden of SB RAS Novosibirsk, Russia,
e-mail: *annaerst@yandex.ru*
[2]National research Tomsk state university, Tomsk, Russia, e-mail: *zibareva.lara@yandex.ru*
[3]SSI Central botanical garden NAS of Belarus, Minsk, Republic of Belarus,
e-mail: *olga-kopa@mail.ru*

Many species of the family Caryophyllaceae are able to synthesize ecdysteroids with high content and wide ecdysteroid profile. However, this family is numerous and still not been sufficiently studied, and this attracted the attention of many researchers. The literature and our experimental data shows that ecdysteroids found in more than 150 species of the genus *Silene* L., 12 - *Lychnis* L. and species of other genera (Zibareva, 2003; Zibareva et al., 2004). The most common are 20-hydroxyecdysone (20E), polipodin B, 2-deoxy-20E and ecdysone, viticosteron E, integristeron A. The search for a phytoecdysteroid-producing plant and methods for biomass producing for the study of metabolic processes, including alternative methods of biotechnology, are intensively developing.

Hairy root cultures - sustainable technology system that preserves cell and tissue specialization, which is important to maintain a constant level of biosynthesis of secondary metabolites, the ability to grow without the use of exogenous growth regulators. The efficiency of this system is shown for such ecdysteroid-synthesizing plants like *Ajuga turkestanica* (Cheng et al., 2008), *Ajuga reptans* (Matsumoto, Tanaka, 1991), *Serratula tinctoria* (Delbeque et al., 1995). The aim of this work was to study the biosynthesis phytoecdysteroids hairy root cultures of the genus *Silene*.

The results showed that the developed method and selected *in vitro* culture conditions are promoted the synthesis of ecdysteroids in the hairy roots of the genus *Silene*. A number of both polar and medium polar ecdysteroids are detected by HPLC. In addition, a more diverse composition of ecdysteroids is synthesized by the presence in the medium of elicitor. The content of major ecdysteroid - 20E exceeded its levels in callus cultures. Thus, the hairy root cultures of species of the genus *Silene* are a promising systems to explore ways phytoecdysteroids biosynthesis and directional regulation mechanisms.

Keywords: *Silene, hairy root, phytoecdysteroids, HPLC*

Aknowlegment
The reported study was partially supported by RFBR, research project No. 15-54-04083 Bel_mol_a.

СЕКЦИЯ 6.
SESSION 6.

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ РАЗВИТИЯ И УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ

PHYSIOLOGICAL ASPECTS OF PLANTS DEVELOPMENT AND RESISTANCE

СТРУКТУРНЫЕ И МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ВЕГЕТАТИВНЫХ ОРГАНАХ *CANNA* × *HYBRIDA* HORT В СВЯЗИ С ПОРАЖЕНИЯМИ ВИРУСНЫМИ ПАТОГЕНАМИ

В.А. Браилко, А.Е. Палий, О.А. Гребенникова, С.В. Челомбит, С.Н. Чирков, И.В. Митрофанова
ФГБУН «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН», г. Ялта, Россия,
e-mail: *valentina.brailko@yandex.ua*

Род *Canna* L. объединяет около 50 видов многолетних травянистых растений семейства *Cannaceae* Juss, порядок *Zingiberales* Nakai. В Никитском ботаническом саду (НБС) первые растения канны были интродуцированы в 1815 г., а в настоящее время коллекция канны садовой включает 26 сортов селекции НБС и 23 зарубежных культивара.

Существенной проблемой использования канны в озеленении является ее тотальное поражение вирусными патогенами. На протяжении последнего десятилетия широкое распространение вирусных инфекций у канны отмечено как в странах СНГ, так и странах Европы, в США, Израиле, Австралии, на Дальнем Востоке. Помимо потери декоративных качеств: некрозных и хлорозных пятен на листьях и соцветиях, поражения вызывают нарушения в функциональном состоянии растительного организма в целом. В связи с этим, целью данной работы было определение анатомических и физиолого-биохимических изменений, которые возникают в вегетативных органах некоторых сортов *Canna×hybrida* hort в связи с проявлением симптомов вирусных заболеваний.

Исследования были проведены на двух сортах канны садовой зарубежной селекции – ‘Президент’ (группа Крози) и ‘Суевия’ (группа орхидеевидные). Растения произрастали в условиях закрытого грунта (в теплице) при соответствующем агротехническом уходе. Оздоровленные безвирусные растения были получены методом клонального микроразмножения *in vitro* в лаборатории биотехнологии и вирусологии НБС. Канны с проявлением вирусной инфекции были выращены из корневищ коллекционного насаждения НБС. Возраст культиваров – 2-3 года.

В результате проведенных физиолого-биохимических исследований выявлен ряд структурных особенностей в вегетативной сфере некоторых сортов канны садовой в связи с проявлением симптомов вирусных заболеваний: увеличение толщины аэренхимы и линейных размеров клеток адаксиальной эпидермы, уменьшение толщины хлоренхимы в основном за счет губчатой паренхимы, изменения в распределении устьиц. На фоне анатомических изменений отмечены различия в водном режиме изученных сортов. О деградации фотосинетического аппарата при поражении вирусными заболеваниями может также свидетельствовать факт снижения уровня относительной фотосинтетической активности и увеличения уровня флуоресценции хлорофилла вследствие повреждений пластидных комплексов хлоренхимы. В биохимическом составе изученных сортов канны садовой также установлены достоверные различия между здоровыми и пораженными растениями: уменьшение содержания пролина и аскорбиновой кислоты и увеличение концентрации фенольных соединений, снижение активности каталазы и увеличение активности супероксиддисмутазы и полифенолоксидазы.

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

Ключевые слова: *канна садовая, ex vitro, фотосинтетический аппарат, водный режим, пролин, фенольные соединения, аскорбиновая кислота, окислительно-восстановительные ферменты*

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

CHANGES IN STRUCTURE AND METABOLISM OF *CANNA × HYBRIDA* HORT VEGETATIVE ORGANS UNDER THE DAMAGES OF VIRAL PATHOGENS

V.A. Brailko, A.E. Paly, O.A. Grebennikova, S.V. Chelombit, S.N. Chirkov, I.V. Mitrofanova
Nikita Botanical Gardens - National Scientific Centre, Yalta, Russia,
e-mail: *valentina.brailko@yandex.ua*

Canna L. genus (Cannaceae Juss family, order Zingiberales Nakai) includes about 50 species of perennial herbaceous plants. In Nikita Botanical Gardens (NBG), the first *Canna* plants were introduced in 1815 and now *Canna* collection includes 26 NBG selections and 23 foreign cultivars.

A significant problem of *Canna* use in ornamental gardening is its total damage by viral pathogens. Over the last decade, widespread of *Canna* viral infections has been noticed in the CIS and European countries, the USA, Israel, Australia and in the Far East countries. Together with the loss of decorative qualities: necrotic and chlorotic spots on leaves and inflorescences, viral damages cause disturbances in the functional state of the plant organism. In this context, the aim of this work was to determine the anatomical, physiological and biochemical changes that occur in the vegetative organs of some *Canna × hybrida* hort cultivars due to the appearance of viral diseases symptoms.

Studies were carried out on two foreign *Canna* cultivars - 'President' (Crozet group) and 'Sueviya' (Group of orchid-flowered cultivars). The plants grew in a greenhouse with an appropriate agriculture care. Improved virus-free plants were obtained by clonal micropropagation *in vitro* in the Laboratory of Biotechnology and Virology NBG. *Canna* plants with visible viral infection were grown from the rhizomes of NBG collection plot. The age of cultivars was 2-3 years.

As a result of physiological and biochemical studies a number of special structural features in the vegetative sphere of studied *Canna* cultivars was noticed as an appearance of viral diseases symptoms: aerenchyma thickening and enlargement of cell linear dimensions in adaxial epidermis, chlorenchima thinning mainly through the spongy parenchyma, changes in stomata distribution. At the background of anatomical changes differences in the water regime of the studied cultivars were noticed. Reducing of relative photosynthetic activity and an increase in chlorophyll fluorescence due to the damages of plastid complexes in chlorenhima could indicate photosynthetic apparatus degradation due to viral diseases. Biochemical composition of the studied *Canna* cultivars also revealed significant differences between healthy and infected plants: decrease in proline and ascorbic acid content and increase of phenolic compounds` concentration, reducing of catalase activity and increasing of superoxide dismutase and polyphenol oxidase activity.

Thus, changes in physiological and biochemical parameters were stronger in the infected *Canna* plants cultivar President than in Sueviya cultivar that may be due to President relatively low resistance to this stress factor.

Keywords: *Canna, ex vitro, leaf anatomy, photosynthetic apparatus, water regime, proline, phenolic compounds, ascorbic acid, redox enzymes*

Aknowlegment
This study was funded by a research grant № 14-50-00079 of the Russian Science Foundation.

ВЛИЯНИЕ УМЕРЕННОГО ОСМОТИЧЕСКОГО СТРЕССА НА ДИНАМИКУ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ВОДНОГО ОБМЕНА И АКВАПОРИНОВ У РАСТЕНИЙ ЯЧМЕНЯ

Д.С. Веселов[1], Г.В. Шарипова[1], M. Katsuhara[2], T. Furuichi[2], С.Ю. Веселов[3], Г.Р. Кудоярова[1]
[1]ФГБУН Уфимский Институт биологии РАН, г. Уфа, Россия, e-mail: *veselov@anrb.ru*
[2]Institute of Plant Science and Resource, Okayama University, Japan,
e-mail: *kmaki@rib.okayama-u.ac.jp*
[3]ФГБОУ ВО "Башкирский государственный университет", г. Уфа, Россия,
e-mail: *respectableman@yandex.ru*

Было изучено влияние умеренного осмотического стресса на водный обмен и локализацию аквапоринов растений ячменя (*Hordeum vulgare* L., сорт Прерия). Исследования проводились в лабораторных условиях в водной культуре. Семена проращивали в темноте в течение 2-3 суток на дистиллированной воде с добавлением 10^{-5} M $CaCl_2$, при температуре 24˚C. Трехсуточные проростки пересаживали на 10 % среду Хогланда-Арнона-I и выращивали при освещенности 18 клк и 14 часовой продолжительностью светового дня. Водный дефицит создавали с помощью 6% раствора полиэтиленгликоля (ПЭГ 6000). Иммуногистохимическую локализацию HvPIP2;1 и HvPIP2;5 аквапоринов определяли, как описано ранее [Веселов и др., 1999] с использованием специфических антител.

Дефицит воды в почве – один из наиболее важных неблагоприятных факторов для растений. Изучение адаптивных реакций, обеспечивающих поддержание водного баланса в растениях в условиях засухи, привлекает внимание многих исследователей. При этом основные усилия сосредоточены на изучении механизмов ограничения потерь воды путем закрытия устьиц. Вместе с тем, водный баланс зависит от соотношения скорости потери и поглощения воды. Открытие водных каналов аквапоринов повысило интерес к изучению поглощения воды при ее дефиците. Тем не менее, данные о вкладе пропускной способности аквапоринов в гидравлическую проводимость довольно противоречивы. В нашей работе мы попытались оценить в одной серии экспериментов одновременно динамику ряда показателей, определяющих водные отношения, у растения ячменя, оказавшихся в условиях дефицита воды.

На второй день после добавления ПЭГ в питательную среду транспирация снижалась почти в 2 раза, а гидравлическая проводимость в 2 раза (рассчитывали по формуле:$L=T/(\Psi s-\Psi l)m$, где T – транспирация, m - вес корней, Ψs и Ψl – водный потенциал питательного раствора и листа соответственно [модифицировано по Bunce, Ziska, 1998]). Затем эти показатели водного обмена возрастали, что совпадало с накоплением осмотически активных веществ в корнях растений. Выявлен низкий уровень окрашивания на аквапорины в начале действия дефицита воды, вызванного осмотическим стрессом, и повышение окрашивания при более продолжительной инкубации на растворе с ПЭГ, что совпало по времени с аналогичными изменениями гидравлической проводимости.

Таким образом, нами показано, что растение активно реагирует на присутствие осмотически активных веществ в питательной среде, приводящее к снижению доступности воды. Под влиянием дефицита воды активность аквапоринов и гидравлическая проводимость сначала резко снижается, что приводит к уменьшению транспирации и повышению водоудерживающей способности корней. Затем способность растения проводить воду возрастает за счет активации водных каналов, что происходит на фоне осмотической регуляции, обеспечивающей поддержание тургора листьев и водоудерживающей способности корней.

Ключевые слова: *дефицит воды, гидравлическая проводимость, аквапорины*

INFLUENCE OF MODERATE WATER STRESS ON WATER RELATIONS AND AQUAPORINES IN BARLEY

D.S. Veselov[1], G.V. Sharipova[1], M. Katsuhara[2], T. Furuichi[2], S.Yu. Veselov[3], G.R. Kudoyarova[1]
[1]Ufa Institute of Biology RAS, Ufa, Russia, e-mail: *veselov@anrb.ru*
[2]Institute of Plant Science and Resource, Okayama University, Japan,
e-mail: *kmaki@rib.okayama-u.ac.jp*
[3]Bashkir State Universiry, Ufa, Russia, e-mail: *respectableman@yandex.ru*

The influence of a moderate osmotic stress on water metabolism and localization of aquaporins barley plants (*Hordeum vulgare L*, variety Preriya) was studied. The experiments were conducted in laboratory conditions in a water culture. Seeds are germinated in the dark for 2-3 days in distilled water with the addition of 10^{-5} M $CaCl_2$, at a temperature 24˚ C. Three-day seedlings were transplanted on 10% of the medium Hoagland-Arnon-I and grown under illumination of 18 klux and 14 hours of continuous daylight. Water deficit created by using of 6% solution of polyethylene glycol (PEG 6000). Immunohistochemical localization HvPIP2;1 and HvPIP2;5 aquaporins was determined as described previously [Veselov et al., 1999] using specific antibodies.

Water deficit in the soil is one of the most important negative factors for plants. The study adaptive responses that maintain water balance in plants under drought conditions attracted the attention of many researchers. However, the main focus is on the study of mechanisms which limit of water loss by closing the stomata. However, the water balance depends on the ratio of the rate water loss and absorption. The discovery of water channel aquaporins increased interest in the study of the absorption of water at water deficit. However, data about influence of aquaporins on the hydraulic conductivity is quite contradictory. In our study we tried to evaluate in a same series of experiments the dynamic of the water relations in barley plants at water deficit.

On the second day after the addition of PEG in the medium transpiration decreased almost 2-fold and hydraulic conductivity in 2 times (calculated using the formula: $L = T/(\Psi s-\Psi l)\ m$, where T - transpiration, m - weight of roots, Ψs and Ψl - water potential of nutrient solution and leaf respectively [modified by Bunce, Ziska, 1998]). Then these parameters increased which coincided with the accumulation of osmotically active substances in plant roots. Low level of staining on aquaporins in the beginning of the effects of water shortage caused by osmotic stress was detected. Then, staining increased which coincided with the same hydraulic conductivity changes.

Thus, we have shown that the plant reacts to the presence of osmotically active substances in the nutrient medium resulting in decrease in water availability. Water deficiency dramatically reduces the activity of aquaporins and hydraulic conductivity which leads to a decrease in transpiration and increased water-holding capacity of roots. Then ability of plants to hold water increases due to activation of water channels that takes place under of osmotic regulation, ensuring the maintenance of turgor of leaves and water-holding capacity of the roots.

Keywords: *water deficit, hydraulic conductivity, aquaporins*

РОЛЬ ФИТОГОРМОНОВ В ИНДУКЦИИ СИСТЕМНОЙ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ К *SEPTORIA NODORUM* BERK. ПОД ВЛИЯНИЕМ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ И ЭТИЛЕНА

С.В. Веселова, Г.Ф. Бурханова, Т.В. Нужная, И.В. Максимов
ФГБУН Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, г. Уфа, Россия, e-mail: *veselovasv75@mail.ru*

Показано, что при инфицировании патогенами растения активируют несколько гормональных сигнальных систем, имеющих множество синергических и антагонистических взаимодействий. Салицилат (СК)- и этилен-зависимые защитные ответы растений при патогенезе – два сигнальных пути, проявляющих антагонизм. Так этилен участвует в регуляции защитных реакций растений против некротрофов, а СК – против биотрофов. Однако, влияние этилена на СК-путь неоднозначно и остается не до конца изученным. Наряду с СК и этиленом, в последнее время, важную роль в регуляции взаимодействия между фитопатогенами и растениями также отводят цитокининам (ЦК), абсцизовой (АБК) и индолилуксусной (ИУК) кислотам. Однако механизм влияния и взаимодействия фитогормонов роста и развития при патогенезе изучен недостаточно, а имеющиеся немногочисленные данные противоречивы.

Наши исследования показали, что предпосевная обработка семян пшеницы СК и обработка листьев 1-метилциклопропеном (1-МЦП) (ингибитором связывания этилена с его рецепторами) как в отдельности, так и совместно увеличивала устойчивость растений пшеницы к септориозу, скорее всего, за счет усиления генерации H_2O_2, повышения активности ПО и ингибирования активности КАТ, что проявлялось в уменьшении зон поражения. При этом в инфицированных растениях обработанных СК и 1-МЦП мы наблюдали повышение содержания ЦК и снижение содержания ИУК и АБК, а также было обнаружено накопление транскриптов изученных генов, кодирующих защитные белки (PR-1, PR-2, PR-3, PR-9). Напротив, обработка листьев этиленпродуцентом этефоном (2-хлорэтилфосфоновой кислотой) (ЭТ) приводила к резкому снижению устойчивости пшеницы к инфекции, что проявлялось в обширных зонах поражения с хлорозами, как предполагается за счет снижения генерации H_2O_2, увеличения активности КАТ и ингибирования активности ПО. Кроме того, мы обнаружили снижение уровня мРНК изученных *PR*-генов, увеличение содержания ИУК и АБК и не обнаружили накопление ЦК в обработанных ЭТ инфицированных листьях пшеницы. Интересно, что обработка ЭТ после СК не приводила к значительному снижению устойчивости пшеницы, хотя ингибирующий эффект ЭТ на реакции, индуцированные СК, проявлялся на начальной стадии заражения в подавлении генерации H_2O_2 и активности ПО.

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о негативной роли этилена в формировании устойчивости растений пшеницы к возбудителю септориоза гемибиотрофному грибу *S. nodorum* через антагонистическое воздействие на формирование СК-зависимых защитных реакций: генерацию H_2O_2, накопление транскриптов *PR*-генов и увеличение содержания ЦК в листьях.

Ключевые слова: *системная устойчивость, фитогормоны, пшеница, Septoria nodorum*.

Исследование частично выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 14-04-97079-р_поволжье_а.

THE EFFECTS OF PHYTOHORMONES IN THE INDUCTION OF SYSTEMIC RESISTANCE OF WHEAT PLANT TO THE *SEPTORIA NODORUM* BERK. INFLUENCED BY SALICILIC ACID AND ETHYLENE

S.V. Veselova, G.F. Burkhanova, T.V. Nuzhnaya, I.V. Maksimov
Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Centre, Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia, e-mail: *veselovasv75@mail.ru*

It has been shown that plants infected with pathogens activate several hormonal signaling systems having a plurality of synergistic and antagonistic interactions. Salicylate (SA)- and ethylene-dependent defense responses under pathogenesis are two signal pathways manifesting antagonism. However, the effect of ethylene on salicylate pathway is ambiguous and unclear. Along with the SA and ethylene an important role in the regulation of the interaction between pathogens and plants also confer cytokinins (CK), abscisic (ABA) and indoleacetic (IAA) acids. However, the mechanism of influence and interaction of phytohormones of growth and development in the pathogenesis has not been studied, and the few available data are contradictory.

Our research showed that pre-sowing treatment with SA and treating leaves with 1-methylcyclopropene (1-MCP) (ethylene inhibitor binding to its receptors) either alone or in composition increased resistance of wheat plants to hemibiotrophic fungus *Septoria nodorum* due to increased generation of H_2O_2, elevation of peroxidase (PO) and inhibition of catalase (CAT) activity manifested in a decline in the zones of affection. Moreover treatment of wheat plants with SA and 1-MCP led to an increase in the content of the CK and the decrease in the content of IAA and ABA, and also an increase in the transcript level of genes encoding PR-proteins (PR-1, PR-2, PR-3, PR-9). On the contrary, treating leaves with ethephone (chemical precursor of ethylene) (2-chloroethylphosphonic acid) (ET) resulted in a decline in wheat resistance to infection, manifested in vast zones of damage with chlorosis which is likely to be due to decreased generation of H_2O_2, increased CAT activity and inhibition of PO. Furthermore, decrease the level of mRNA studied *PR*-genes and reduction the content of CK and also increase in the content of IAA and ABA have been found in the treated with ET and infected wheat leaves. Interestingly, ET treatment after that with SA did not lead to significant decreased wheat resistance, although in the early stages of infection ET inhibited reactions induced by SA, which is likely to be due to suppression of H_2O_2 generation and PO activity.

Thus, our results indicate the negative role of ethylene in resistance of wheat plants to the pathogen *Septoria nodorum* through an antagonistic effect on the formation of SA-dependent defense responses: the generation of H_2O_2, accumulation of transcripts *PR*-genes and increase the CK content in the leaves.

Keywords*: systemic resistance, phytohormones, wheat, Septoria nodorum*.

Aknowlegment
The study carried out in part with the financial support of the RFBR within the framework of a research project № 14-04-97079-r_povolzhe_a.

МЕХАНИЗМЫ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЭНДОФИТНЫХ БАКТЕРИЙ, ПОВЫШАЮЩИХ ПРОДУКТИВНОСТЬ И УСТОЙЧИВОСТЬ БОБОВЫХ РАСТЕНИЙ

С.Р. Гарипова[1], Н.В. Иванчина[1], Д.В. Гарифуллина[2], О.В. Маркова[1], Р.М. Хайруллин[3]
[1]ФГБОУ ВО Башкирский государственный университет, г. Уфа, Россия, ул. Заки Валиди, 32, 450076, e-mail: *garisveta@rambler.ru*
[2]ФГБУ Россельхозцентр, филиал по Республике Башкортостан, г. Уфа, Россия, ул. Рихарда Зорге, 19/2, 450059, e-mail: *shavaleevadv@mail.ru*
[3]Институт биохимии и генетики УНЦ РАН, г. Уфа, Россия, пр. Октября, 71, 450054, e-mail: *krm62@mail.ru*

Важным резервом адаптивных возможностей растений является формирование симбиотических взаимоотношений с микроорганизмами, способствующими повышению устойчивости растения-хозяина к стрессовым условиям среды. В нашей работе были изучены бактериальные эндофиты клубеньков гороха и фасоли, среди которых помимо ризобий встречались представители *Pseudomonas*, *Serratia*, *Bacillu*s и др., активирующие рост проростков и подавляющие in vitro развитие фитопатогенных грибов. Уменьшение распространения корневых гнилей у растений отмечалось и при инокуляции бактериями, не обладающими антагонистической активностью к фитопатогенам. Предполагается, что ведущую защитную роль в этом играет индуцированная устойчивость растений, вызванная бактериальными сигналами фитогормональной природы. Продукция индолов, цитокинин- и гиббереллин-подобных соединений была обнаружена у большинства коллекционных штаммов. Отмечены специфичные ответные реакции растений на плотность разных штаммов в инокулюме, которые обусловлены количественным и качественным составом бактериальных фитогормонов. Инокуляция семян гороха и фасоли отдельными бактериальными ассоциациями и штаммами способствовала увеличению длины корней и побегов, повышению степени их ветвистости, стимуляции клубенькообразования, устойчивости к патогенам, увеличению продуктивности в полевых условиях. Выявлены особенности сорт-штаммовых взаимодействий, связанные с экологической пластичностью генотипов растений.

Ключевые слова: *эндофитные бактерии, бобовые растения, фитогормоны, устойчивость, продуктивность*

MECHANISMS OF PHYSIOLOGICAL ACTIVITY OF ENDOPHYTIC BACTERIA THAT IMPROVE THE PRODUCTIVITY AND THE RESISTANCE OF LEGUMINOUS PLANTS

S.R. Garipova[1], N.V. Ivanchina[1], D.V. Garifullina[2], O.V. Markova[1], R.M. Hairullin[3]
[1]Bashkir State University, Ufa, Russia, ul. Zaki Validi, 32, 450076,
e-mail: *garisveta@rambler.ru*
[2]Russian Agricultural Centre, the Republic of Bashkortostan branch, Ufa, Russia, 450059, ul. Rihard Zorge, 19/2, e-mail: *shavaleevadv@mail.ru*
[3]Institute of Biochemistry and Genetics, Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia, pr. Oktybrya, 71, e-mail: *krm62@mail.ru*

The symbiotic relationships with microorganisms promoted the resistance of the plant host to the stressful environmental conditions are an important reserve of adaptive capacity of plants. In our research the bacterial endophytes of pea and bean nodules were studied, and including the rhizobia, the representatives of *Pseudomonas, Serratia, Bacillus et al.* were identified. They activated seedling growth and inhibited the development of phytopathogenic fungi in vitro. The reducing of root rots of plants also was observed at the inoculation with bacteria not having the antagonistic activity toward pathogens. The main protective role is assumed to have related with the induced resistance of plants caused by the bacterial signals of phytohormonal nature. The most of the collection strains have been found to produce the indoles, cytokinin- and gibberellin-like compounds. The specific responses of plant to the density of different strains in the inoculum were proposed to have caused by the quantitative and qualitative composition of bacterial phytohormones. Inoculation of pea and bean seeds with the certain associations and strains promoted the lengthening of roots and shoots, the increasing of their branching, the enhancing of the nodule activity and the resistance to pathogens, the raising of vegetative and generative productivity in the field experiments. The features of strain-variety interactions were revealed to have associated with the ecological plasticity of plant genotypes.

Keywords: *endophytic bacteria, pea, bean, plant hormones, resistance, productivity*

ВЛИЯНИЕ КАДМИЯ НА ОБРАЗОВАНИЕ И ЛОКАЛИЗАЦИЮ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ПРОРОСТКАХ *LINUM USITATISSIMUM* L., КУЛЬТИВИРУЕМЫХ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Е.А. Гончарук, Ю.А. Горчакова, А.С. Воронков
ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва, Россия,
e-mail: *goncharuk.ewgenia@yandex.ru*

Увеличение содержания поллютантов, в том числе и кадмия, в почвенном растворе оказывает значительное влияние на многие физиологические процессы в растениях, включая фотосинтез, дыхание, продуктивность и устойчивость. К числу соединений, защищающих клетки от стрессовых воздействий, относятся фенольные соединения (ФС) – одни из наиболее распространенных в растительных тканях вторичных метаболитов.

К важнейшим культурам промышленного назначения относятся растения льна, характеризующиеся высокой устойчивостью к действию кадмия. Интересно было проследить за изменениями в накоплении в них ФС, используя для этого культивируемые в условиях *in vit*ro молодые проростки.

Стерильные проростки льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.) сорта Ленок культивировали на питательной среде Мурасиге-Скуга в условиях факторостата при температуре 24°C и 16-час. фотопериоде. В опытном варианте к питательной среде добавляли кадмий (15 и 25 мг/л). В обоих случаях проростки анализировали на 30-й день (виргинильные проростки, соответствующие физиологическому состоянию растений льна в онтогенетической фазе «быстрого роста»). В этанольных экстрактах спектрофотометрическим методом определяли суммарное содержание ФС, а также содержание фенилпропаноидов (ФП) и флавоноидов (ФЛ). Для изучения локализации ФС использовали гистохимические методы и световую микроскопию.

Выращивание проростков льна на средах с кадмием сопровождалось накопление в них ФС, что в большей степени проявлялось в присутствии более высокой его концентрации. Содержание ФП, представляющих собой биогенетически более ранние ФС, незначительно увеличивалось по сравнению с контролем при действии 15 мг/л кадмия и снижалось на 15% в присутствии 25 мг/л кадмия. Что касается ФЛ, основных компонентов фенольного комплекса зеленых тканей растений, то действие металла не приводило к значительным изменениям в их содержании. По всей видимости, поступление кадмия в проростки льна приводит в основном к изменениям в биосинтезе ФП, которые не только участвуют в их защите, но и служат предшественниками в биосинтезе лигнанов, образование которых характерно для растений льна.

Изучение распределения ФС в тканях проростков льна методом световой микроскопии, показало, что в контрольных условиях они локализуются в кутикуле, слое клеток, примыкающих к эпидермису, а также межклеточном пространстве клеток коровой паренхимы. При действии металла отмечалась «грануляция» содержимого некоторых клеток слоя кутикулы, дающих реакцию на ФС, а также усиление интенсивности их окраски, что свидетельствует об увеличении содержания этих вторичных метаболитов в стрессовых условиях.

Ключевые слова: *Linum usitatissimum*, *лен, проростки in vitro, кадмий, фенольные соединения, накопление, локализация*

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 14-04-01742).

INFLUENCE OF CADMIUM ON FORMATION AND DEPOSITION OF PHENOLIC COMPOUNDS IN SEEDLINGS *LINUM USITATISSIMUM* L., CULTIVATED *IN VITRO*

E.A. Goncharuk, Y.A. Gorchakova, A.S. Voronkov
FGBUN Institute of Plant Physiology K.A. Timiryazev Academy of Sciences, Moscow, Russia, e-mail: *goncharuk.ewgenia@yandex.ru*

Increasing the content of pollutants including cadmium in soil solution has a significant impact on many physiological processes in plants, including photosynthesis, respiration, productivity and resistance. Among the compounds that protect cells against stress factors include phenolic compounds (PhC) - one of the most spread secondary metabolites of plant tissues.

Among the most important crops for industrial use flax plants are characterized by high resistance to the action of cadmium. It was interesting to consider the changes in the accumulation of them the PhC by the way of using the seedlings cultured *in vitro* conditions.

Sterile seedlings flax (*Linum usitatissimum* L.) variety Lenok cultured on medium nutrition Murashige and Skoog in the conditions of a temperature of 24 °C and 16-hour. photoperiod. In conditions of scientific research, to nutrition solution was added cadmium (in a ratio of 15mg/l and 25mg/l). In both cases, the seedlings were analyzed on day 30 (virginal seedlings corresponding flax plants in the developmental phase of "rapid growth"). The ethanol extracts were determined by spectrophotometric method the total PhC content, and the phenylpropanoids (PhP) and flavonoids (FL) content. To study the PhC localization were using histochemical methods and light microscopy.

Cultivation of flax seedlings in cadmium present is accompanied with PhC accumulation that was shown more considerably with a high concentration of cadmium. Contents of PhP, which are biogenetically earlier PhC slightly increased compared with the control under the action of 15 mg / l of cadmium and decreased by 15% in presence of 25 mg / l of cadmium. What about to FL, main components of a phenolic complex of green plant tissues, the effect of the metal does not lead to significant changes in their content. Apparently, cadmium uptake by flax seedlings generally leads to changes in the biosynthesis of PhP are not only involved in their protection, but also serve as precursors in the biosynthesis of lignans, which are characterized by the formation of the flax plants.

Study of PhC distribution in the flax seedlings tissue using light microscopy techniques showed that under control conditions they are located in the cuticle, the cell layer adjacent to the epidermis and intercellular space parenchyma cells. When metal action marked "granulation" the contents of the some cuticle cells that give response to the PhC, as well as increased the intensity of their color, indicating an increase in the content of these secondary metabolites in the stress conditions.

Keywords: *Linum usitatissimum*, *flax seedlings, in vitro, cadmium, phenolic compounds accumulation, localization*

Aknowlegment
This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (grant 14-04-01742).

К ВОПРОСУ О МОРОЗОСТОЙКОСТИ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ СЕМЕЙСТВА OLEACEAE В УСЛОВИЯХ ЮЖНОГО БЕРЕГА КРЫМА

Т.Б. Губанова
ФГБУН «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН», г. Ялта, Россия, e-mail: *gubanova-t@rambler.ru*

Растения из семейства *Oleaceae* достаточно широко представлены в коллекции Никитского ботанического сада (НБС). Виды родов *Jasminum (J. premianum, J. nudiflorum), Ligustrum (L. compactum, L. lucidum, L. delavea*) и сорта *Olea europea* являются перспективными декоративными и плодовыми культурами. С одной стороны климатические условия ЮБК позволяют использовать субтропические растения как в зеленом строительстве, так и в плодоводстве а с другой – погодные условия зимнего периода в отдельные годы могут вызывать значительные повреждения у этих растений. Агрометеостанцией «Никитский ботанический сад» выявлена тенденция увеличения вероятности наступления стихийных гидрометеорологических явлений, опасных для ряда субтропических культур (понижение температур воздуха до -10°С и ниже). Поэтому определение потенциальной морозостойкости субтропических видов на ЮБК является актуальным для решения задач интродукции и селекции. В качестве объектов исследований нами были выбраны указанные ранее виды родов *Jasminum* и *Ligustrum*, а также сорта и формы *O. europea*: Никитская, Крымская звезда – селекции НБС, Раццо Асколано, Кареджиоло – интродуценты средиземноморского происхождения, а так же две интродукционные формы (Армения, Туркменистан) и подвид маслины европейской *O. europea subsp. cuspidata*. Степень морозостойкости интенсивность и особенности повреждений определяли с помощью метода искусственного промораживания в контролируемых условиях при воздействии температуры -12°С в течение 15 часов. Опыты по искуственному промораживанию однолетних побегов проводили в самый холодный на ЮБК период с максимальной вероятностью снижения температуры воздуха до -10°С и ниже (конец января – начало февраля). Установлено, что представителей рода *Olea* морозостойкость в пределах однолетнего побега понижается в ряду побег – терминальная почка – лист. У большинства сортов повреждение листьев в пределах однолетнего побега носит акропетальный характер, а побега – базипетальный. Морозные повреждения листовых пластинок проявляются ввиде краевых некрозов или некрозов межжилкового пространства. У сортов с низкой морозостойкостью отмечены повреждения черешка, что в дальнейшем приводит к дефолиации. Без повреждений указанный режим промораживания перенесли интродукционные формы, что свидетельствует об их высокой низкотемпературной устойчивости. У сортов Никитская и Крымская звезда отмечена минимальная степень обмерзания листьев: 16 и 7% соответственно. Минимальная морозостойкость листьев оказалась у сорта Кареджиоло (повреждено 90%), однако, при этом не выявлено обмерзания почек и побегов. У сортов Раццо и Асколано повредились не только листья, но и побеги и почки. Слабая устойчивость к отрицательным температурам отмечена и у подвида *O. europea subsp. cuspidata* – 70% листьев 5-7 см. апикальных частей побегов. Касательно видов рода *Jasminum,* относительно более морозостойким оказался *J. nudiflorum,* у которого выявлены единичные случаи обмерзания апикальной части побегов. В то время как у *J. premianum* морозные повреждения побегов достигали 10-15 см. Среди видов рода *Ligustrum* низкотемпературная устойчивость снижалась в порядке *L. lucidum, L. delavea, L. compactum.* Типичным морозным повреждением листовых пластинок у видов рода *Ligustrum* следует считать развитие краевых некрозов и в отдельных случаях повреждение центральной жилки.

Ключевые слова: *семейство Oleaceae, морозостойкость, Южный берег Крыма*

TO THE PROBLEM OF FROST RESISTANCE IN SOME SPECIES OLEACEAE FAMILY ON THE SOUTHERN COAST OF THE CRIMEA

T.B. Gubanova
Nikita Botanical Gardens - National Scientific Centre, Yalta, Russia,
e-mail: *gubanova-t@rambler.ru*

Plants of the Oleaceae family are well represented in the collection Nikita Botanical Gardens (NBG). Species *Jasminum* (*J. premianum*, *J. nudiflorum*), *Ligustrum* (*L. compactum*, *L. lucidum*, *L. delavea*) and *Olea europea* cultivars are promising ornamental and fruit plants. On the one hand climatic conditions of the Sothern coast of the Crimea (SCC) allow to use subtropical plants in ornamental gardening and horticulture and on the other hand - winter weather conditions in certain years can cause significant damage in these plants. Agro-meteorological station "Nikita Botanical Garden" found out a tendency to increase the likelihood of extreme weather events that are dangerous for a number of subtropical crops (air temperature decrease to -10°C and below). Therefore, identification of potential frost-rsistance of subtropical species on SCC is very important for solving the problems of introduction and breeding. Objects of the research were above mentioned species from genera *Jasminum* and *Ligustrum* together with *O. europea* cultivars: Nikitskaya, Krymskaya Zvezda – bred in NBG, Ratstso Askolano, Karedzhiolo – cultivars of Mediterranean origin and two introduced forms (Armenia, Turkmenistan) and *O. europea* subsp. *cuspidata*. The grade of frost-resistance, damage intensity and characteristics were studied by the method of artificial freezing in controlled conditions at the temperature of -12°C for 15 hours. Experiments on artificial freezing of annual shoots were carried out in the coldest period on SCC with the maximum probability of reducing the air temperature to -10°C and lower (late January – early February). It was determined that in the studied *Olea* species and cultivars frost-resistance of annual shoot reduced in a line shoot - terminal bud - leaf. In most cultivars leaf damages of annual shoot wrre acropetal and shoot damages - basipetal. Frost damages of the leaf blades appeared as marginal necrosis or necrosis of interveinal space. In the cultivars with low frost resistance petiole damages, which further leads to defoliation, were noticed. Introduced forms did not have any damages under those freezing regime that indicated their high low-temperature hardiness. In the cultivars Nikitskaya and Krymskaya Zvezda minimum frost damages on leaves were noticed - 16 and 7%, respectively. The lowest frost-resistance of leaves was found in Karedzhiolo cultivar (damaged 90%), however, no frost damages of buds and shoots were revealed. In the cultivars Ratstso and Askolano not only leaves but also shoots and buds were damaged. Low frost resistance was also noticed in *O. europea* subsp. *cuspidata* - 70% of the leaves and 5-7 cm shoot tips were damaged. As for *Jasminum* species, relatively frost-resistant was *J. nudiflorum*, which demonstrated single cases of shoot tips frost damages. While at *J. premianum* frost damages of shoots were up to 10-15 cm. Among the studied *Ligustrum* species low temperature resistance decreased in the line *L. lucidum*, *L. delavea*, *L. compactum*. Typical frost damage on leaf lamina in *Ligustrum* species was the development of marginal necrosis and in some cases, damages of the central vein.

Keywords: *family Oleaceae, frost, southern coast of Crimea*

РАСТЕНИЯ КАРТОФЕЛЯ *IN VITRO* КАК МЕТОД ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РОЛИ АПОПЛАСТНОЙ ИНВЕРТАЗЫ В УСТОЙЧИВОСТИ ХОЛОДОСТОЙКИХ РАСТЕНИЙ К ГИПОТЕРМИИ

А.Н. Дерябин, Т.И. Трунова
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, г. Москва, Россия,
e-mail: *anderyabin@mail.ru*

Выращиваемые *in vitro* растения картофеля находятся в строго контролируемых по освещенности, фотопериоду, температуре, влажности воздуха и другим параметрам условиях и, в отличие от растений *in vivo*, представляют удобные инструмент и модель для изучения действия различных стресс-факторов, а также углеводного метаболизма и процесса клубнеобразования (в силу возможности направленной модификации углеводного состава среды выращивания). Культура *in vitro* предоставляет возможность исследовать метаболические процессы в широком диапазоне действия абиотического стресс-фактора, избегая отрицательного воздействия окружающей среды. В связи с этим, для установления роли апопластной инвертазы в формировании устойчивости холодостойких растений к гипотермии использовали нетрансформированные растения картофеля (*Solanum tuberosum* L. cv. Désirée) и линию с изменённым углеводным метаболизмом, вызванным интеграцией в геном целевого гена *suc2*, кодирующего инвертазу (β-фруктофуранозидаза, КФ 3.2.1.26) дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* апопластной локализации, и находящегося под транскрипционным контролем B33-промотора гена пататина класса I. Известно, что у растений при действии гипотермии апопластная инвертаза участвует в разгрузке флоэмы и контролировании уровня сахарозы в свободном клеточном пространстве и её транспорте через плазмалемму и по флоэме.

Проведенные исследования показали, что высокая активность инвертазы дрожжей в растениях картофеля нарушает баланс между фотосинтезом и оттоком ассимилятов, способствует увеличению содержания сахаров в клетках и апопласте, снижению ростовых и фотосинтетических показателей, что обусловливает повышенный уровень конститутивной холодоустойчивости трансформантов. Использование в экспериментах растений *in vitro* позволило не только ускорить получение однородного материала, но также модифицировать углеводный метаболизм и исследовать изучаемые процессы в широком диапазоне действия низкотемпературного стресс-фактора. Было установлено, что накапливаемые конститутивно и при действии гипотермии сахара (апопластные и внутриклеточные) не только стабилизировали структурно-функциональное состояние клеточных мембран и повышали холодоустойчивость растений, но также снижали интенсивность процессов свободнорадикального окисления биомолекул, протекающих с участием активных форм кислорода. Индуцируемая гипотермией активность апопластной инвертазы модифицировала внутриклеточный состав и концентрацию сахаров в корнях и листьях картофеля, что позволяет рассматривать ее как стрессовый фермент углеводного метаболизма, играющий важную регуляторную роль в модуляции метаболического сигнала при формировании повышенной устойчивости холодостойких растений к гипотермии.

Авторы благодарны коллегам из Лаборатории сигнальных систем контроля онтогенеза им. акад. М.Х. Чайлахяна ИФР РАН и группе Dr. L. Willmitzer (Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology, Potsdam-Golm, Германия) за предоставленные для исследований растения-регенеранты картофеля.

Ключевые слова: *Saccharomyces cerevisiae*, *Solanum tuberosum*, *апопласт, инвертаза, сахара, трансформированные растения, холодоустойчивость*

THE POTATO PLANT *IN VITRO* AS THE METHOD FOR STUDYING OF FUNCTIONAL ROLE OF APOPLASTIC INVERTASE UNDER HYPOTHERMIA

Alexander Deryabin, Tamara Trunova
Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences,
Botanicheskaya str. 35, Moscow, 127276, Russia, e-mail: *anderyabin@mail.ru*

We investigated into a functional role of the invertase (β-fructofuranosidase, E.C. 3.2.1.26) in the potato plant (*Solanum tuberosum* L., cv. Désirée), which expressed the *suc2* gene of *Saccharomyces cerevisiae* under the transcriptional control of the patatin class I tuber-specific B33-promoter. Potato line with the *suc2* gene expression offer unique opportunities for research since the integrated *suc2* gene encodes the invertase of yeast with an *N*-end-connected potato proteinase II inhibitor signal peptide, which provides apoplastic localization of foreign invertase. In higher plant apoplastic invertase is the key enzyme of carbohydrate metabolism, which is involved in important physiological processes such as phloem unloading, control of cell differentiation and sucrose level in cell free space, and transport of sucrose across the plasmalemma.

It was reported that the constitutive *suc2* gene expression resulted in elevated activity of the apoplastic invertase in transformants compared to that in the control plants ones promoted more active accumulation of metabolically active sugars: glucose and sucrose in the leaves; fructose in the apoplast, and especially, glucose in the roots. The increased total sugar contents in the transformed potato plant led to some changes in their morphometric parameters (decreased offshoot length, less developed root system, and larger water content in tissues). It is indicative of a regulatory function of apoplastic invertase.

Potato plants with the in-built *suc2* gene could be effectively used to examine the role that apoplastic invertase played in adaptation to hypotermia. Prolonged cold exposure contributed to the increased activity of apoplastic invertase and contents sugar in the transformed plants compared to that in the control plants. The transformed potato plant possess a higher tolerance to hypotermia and less lipid peroxidation activity, apparently due to the changes in sugar ratio produced by the yeast invertase. This fact allows us to consider apoplastic invertase as a stress enzyme of carbohydrate metabolism, playing a significant regulatory role in the modulation of metabolic signaling during the formation of increased plant resistance to hypothermia.

The authors are grateful to the staff of signaling systems of the ontogenesis control laboratory of the Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, and Dr. L. Willmitzer (Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology, Germany) for providing the potato plants for the study.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, *Solanum tuberosum*, *apoplast, cold tolerance, invertase, suc2 gene, sugars, transformed plants*

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МИТОХОНДРИЙ ОПРЕДЕЛЯЕТ УСТОЙЧИВОСТЬ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА К ВОДНОМУ ДЕФИЦИТУ

И.В. Жигачева, Е.Б. Бурлакова, А.Н. Голощапов
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, г. Москва, Россия, e-mail: *zhigacheva@mail.ru*

Водный дефицит, как и другие стрессовые факторы, приводит к смещению антиоксидантно-прооксидантного равновесия в сторону увеличения генерации активных форм кислорода (АФК) митохондриями и увеличению их содержания в клетке, что приводит к нарушению физиологических функций растительных организмов (снижению ростовых процессов, урожайности и т.д.).

Так как регуляторы роста и развития растений (РРР) повышают их устойчивость к действию стрессовых факторов, то можно было предположить, что РРР могут влиять на генерацию АФК митохондриями. Поскольку водный дефицит снижает функциональную активность, как хлоропластов, так и митохондрий интересно было выяснить, как РРР (мелафен (меламиновая соль бис (оксиметил)-фосфиновой кислоты), пирафен (соль бис (оксиметил)-фосфиновой кислоты 2,4,6-триаминопиримидина) и 2-метил-4-диметиламинометил-бензилимидазол-5-ол-дигидрохлорид) влияют на биоэнергетические характеристики митохондрий 6-дневных проростков гороха (*Pisum sativum L* сорт Альфа), подвергнутых 2-х дневному водному дефициту. Проверку протекторных свойств препаратов проводили, используя препараты в концентрациях, в которых они снижали интенсивность перекисного окисления липидов ПОЛ до контрольных значений на модели «старения митохондрий». Дефицит воды активировал свободно радикальное окисление в мембранах митохондрий этиолированных проростков гороха, о чем свидетельствует 3-кратный рост интенсивности флуоресценции продуктов ПОЛ. Обработка семян гороха исследуемыми РРР приводила к снижению интенсивности флуоресценции продуктов ПОЛ. Наиболее эффективным был мелафен и наименее эффективным - амбиол.

Изменения физико-химических свойств мембран митохондрий сопровождались 30% снижением максимальных скоростей окисления НАД-зависимых субстратов и 25% снижением эффективности окислительного фосфорилирования. Замачивание семян в 2×10^{-12}М растворе мелафена предотвращала изменения эффективности окислительного фосфорилирования, обусловленное дефицитом воды и способствовала сохранению высоких скоростей окисления НАД-зависимых субстратов. Обработка семян гороха - 2×10^{-13} М пирафеном или 10^{-9}М амбиолом, которые слабее влияли на интенсивность ПОЛ в условиях дефицита воды, почти не оказывала влияния на скорости окисления НАД-зависимых субстратов. Однако эффективность окислительного фосфорилирования увеличивалась: на 15%. Функциональное состояние митохондрий было связано с физиологическими показателями, а именно с ростовыми процессами. Дефицит воды тормозил рост эпикотилей и корней проростков гороха. Длина корней и эпикотилей 6 дневных проростков была на 57 и 71% ниже контрольных величин. Мелафен предотвращал ингибирование роста побегов и корней проростков в этих условиях. Пирафен и амбиол, почти не влияющие на максимальные скорости окисления НАДН митохондриями проростков, в меньшей степени проявляли защитный эффект на ростовые процессы. Митохондрии семян характеризуются относительно низкими скоростями окисления НАД-зависимых субстратов, то увеличение активности НАД-зависимых дегидрогеназ способствует сохранению высокого уровня энергетического метаболизма в клетке, что, возможно, обеспечивает устойчивость растений к изменяющимся условиям окружающей среды.

Ключевые слова: *водный дефицит, митохондрии, регуляторы роста растений*

THE FUNCTIONAL STATE OF MITOCHONDRIA DETERMINES THE RESISTANES OF PEA SPROUT TO WATER DEFICIENTY

I.V. Zhigacheva, E.B. Burlakova, A.N. Goloschapov
Federal State Scientific Institution: Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, e-mail: *zhigacheva@mail.ru*

Water deficiency, like other stress factors, leads to increasing of the generation of reactive oxygen species (ROS) by mitochondria and increase their content in a cell that leads to disruption of physiologic functions of plant organisms. Since regulators of growth and development of plants (PGRs) increases their resistance to stress factors, it was possible to assume that PGRs can affect the generation of ROS by mitochondria. Aim of this work was to find out how PGRs (melaphen (melamine salt of bis(oxymethyl)phosphinic acid), pyraphen (salt of bis (oxymethyl)-phosphinic acid 2,4,6-triaminopyrimidine), and 2-methyl-4-dimethylaminomethyl-benzylimidazole-5-ol-dihydro-chloride) affect the bioenergetic characteristics of 6-day pea sprouts mitochondria (*Pisum sativum* L Alpha variety), which were subjected to two-day of water deficiency. The test of protective properties of the preparations was performed using them at the concentrations in which they reduced the intensity of lipid peroxidation (LPO) to the control values on the model of "aging" of mitochondria. The water deficiency has led to the 3-fold increase in the fluorescence intensity of the LPO products. The treatment of pea seeds of the studied PRGs resulted in a decrease in the intensity of fluorescence of LPO products. The most effective preparation was melaphen; the least effective, ambiol.

The changes of the physicochemical properties of mitochondrial membranes were associated with a 30% decreasing of the maximum rates of oxidation of NAD-dependent substrates and with a 25% decreasing of the efficiency of the oxidative phosphorylation. The soaking of seeds in a 2×10^{-12}M solution of melaphen prevents changes in the efficiency of the oxidative phosphorylation and contributed to the preservation of high rates of oxidation of NAD-dependent substrates, but 2×10^{-13} M pyraphen or 10^{-9} M ambiol almost no significant effect on the rate of oxidation of NAD-dependent substrates. However the efficiency of the oxidative phosphorylation increased by 15%. The functional state of mitochondria was associated with the physiological characteristics. The water deficiency inhibited the growth processes. The length of roots and epicotyls of the 6-day sprouts was 57 and 71% below the control values. Melaphen prevented the inhibition of the growth of shoots and roots of the sprouts under these conditions. Pyraphen and ambiol, exhibited a lower protective effect on the growth processes. Increasing the activity of NAD-dependent dehydrogenases provides for a high level of the energy metabolism in the cell and, probably, provides for the resistance of plants to the changing environmental conditions.

Keywords: *water deficiency, mitochondria, plant growth regulators*

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ МИТОТИЧЕСКИХ ЦИКЛОВ В КЛЕТКАХ КОРНЕЙ РАЗНЫХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ

Н.В. Жуковская, Е.И. Быстрова, В.Б. Иванов
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва, Россия,
e-mail: *zhukovskayanv@rambler.ru*, *ivanov_vb@mail.ru*

Были изучены продолжительности митотических циклов (Т) в корнях более чем 100 видов растений. Рост корня происходит за счет деления клеток меристемы и роста их растяжением. При этом скорость роста в большей степени зависит не от частоты деления клеток, а от размера меристемы и числа пролиферирующих клеток. Необходимость определения Т очень велика, так как изменение скорости роста часто может быть обусловлено торможением или стимуляцией деления клеток, например, при действии фитогормонов. До недавнего времени основным методом определения Т был тимидиновый (использование H^3-тимидина для определения делящихся клеток в определенный момент времени). Нами предложен другой метод определения Т – расчетный. Т вычислялись по следующей формуле: $T = \ln 2 N_m l_e / v$, где N_m – число клеток в меристеме, l_e – длина, закончивших рост клеток, v – скорость роста корня. На протяжении большей части апикальной меристемы корня практически все клетки участвуют в пролиферации. В период линейного роста корня размер меристемы и скорость роста корня мало меняются. Число клеток, образующееся в меристеме за единицу времени, равно числу клеток, заканчивающих рост. Для более 60 видов результаты определения Т с помощью расчетного метода оказались близко совпадающими с полученными с помощью тимидинового метода, где разница между значениями Т не превышала 30%. Это позволяет использовать данные, получаемые нашим методом для анализа корреляций между Т и различными другими признаками, например, гаплоидным содержанием ДНК (C_{val}), скоростью роста корней (v), систематическим положением растений и другими. По базе данных Kew у большей части травянистых покрытосеменных растений C_{val} до 10 – 15 pg. Следовательно, у большей части видов Т в корнях при температуре 22 – 24 С мало отличаются. В литературе Т часто описывается линейной зависимостью от C_{val}. Однако анализ полученных нами данных и сопоставление их с опубликованными результатами, полученными тимидиновым методом, показали, что зависимость между Т и C_{val} для всех видов нельзя описать линейно. До C_{val} примерно 20 pg Т слабо зависит от C_{val}, а при больших значениях C_{val} эта зависимость становится более резкой. Возможные механизмы этих корреляций будут обсуждены в докладе. Работа частично поддержана Грантом РФФИ №15-04-02502

Ключевые слова: корень, рост, клетка, пролиферация, митотический цикл, меристема, зона растяжения.

ESTIMATION OF MITOTIC CYCLE DURATION IN ROOT CELLS OF DIFFERENT PLANT SPECIES

Natalia Zhukovskaya, Elena Bystrova, Victor Ivanov
Federal State Institution of Science Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, e-mail: *zhukovskayanv@rambler.ru*, *ivanov_vb@mail.ru*

Mitotic cycle duration (T) was studied in the roots of more than 100 plant species. Root growth is due to meristematic cell divisions and their subsequent elongation. Growth rate depends mostly on the size of the meristem and the number of proliferating cells rather than on the frequency of cell divisions. The necessity to identify T is evident, because growth rate changes may be due to the inhibition or stimulation of cell division, for example, by phytohormones. Until quite recently, the main method for determining T was using H3-thymidine which allowed to detect dividing cells at a certain point of time. We have proposed a different method for T determination - a computational method. T is calculated by the following formula: $T = \ln 2 N_m l_e / v$, where N_m - number of meristematic cells, l_e - length of fully elongated cells, v – rate of root growth. Almost all cells of root apical meristem are involved in cell proliferation. Root meristem size and root growth rate during the period of linear growth do not change significantly. The number of cells formed in the meristem per unit time is equal to the number of elongating cells. The results on T determination obtained using the computational method for more than 60 species coresponded well with the results obtained by thymidine method, where the difference between the values of T does not exceed 30%. The data obtained by our method can be used for the analysis of the correlation between T and various other parameters such as haploid DNA content (C_{val}), root growth rate (v), taxonomic position and others. According to the data from the Kew database, most of herbaceous angiosperms have C_{val} to 10 - 15 pg. Consequently, in most species, in the roots at a temperature of 22 - 24°C, T does not differ much. In the literature, T is often described as linearly dependent from C_{val}. However, the analysis of our data and comparison with the published results obtained by thymidine method showed that the relationship between T and C_{val} can`t be described linearly for all species. Up to C_{val} about 20 pg, T is weakly dependent on C_{val}, but this dependence becomes more obvious at large C_{val}. Possible mechanisms of these correlations will be discussed in the report.

Keywords: *root, growth, cell, proliferation, mitotic cycle, meristem, elongation zone*

Aknowlegment
The study was partly supported by RFBR grant №15-04-02502

ИЗУЧЕНИЕ ИЗМЕНЧИВОСТИ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ В УСЛОВИЯХ *EX SITU* И *EX VIVO* В СВЯЗИ С ПРОБЛЕМОЙ ЗАСУХОУСТОЙЧИВОСТИ

Е.С. Клушевская, Н.Ф. Кузнецова
ФГБУ «ВНИИЛГИСбиотех» (Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии), г. Воронеж, Россия,
e-mail: *ekogenlab@gmail.ru*

В связи с глобальными изменениями климата изучение засухоустойчивости является одной из актуальных проблем современной биологии. Цель данной работы - исследование нормы реакции сосны обыкновенной в естественных и стрессовых условиях *ex situ* и *ex vivo;* анализ физиолого-биохимических параметров в зависимости от генотипа и местообитания модельных деревьев. Объектом исследования являлись деревья «Острогожского» селекционного насаждения, расположенного на юге зоны видового оптимума сосны (Воронежская область, Острогожский район). В качестве контроля использовались деревья Ступинского тест-объекта (Воронежская область, Рамонской район), произрастающего вблизи Воронежского биосферного заповедника. В мае с модельных деревьев отбирались побеги второго года жизни. Анализ хвои проводили в трех вариантах опыта: 1) свежесобранные пробы; 2) воздействие гидротермического стресса «засуха + температура» (7 суток при температуре 45°C); 3) воздействие умеренного стресса «засуха» (10 суток при комнатной температуре). Для воспроизведения засухи в лабораторных условиях использовали 0,6М раствор маннита. Исследования водного режима растений (дефицит влаги, общее количество влаги, количество коллоидно-связанной воды) проводили по общепринятой методике Х.Н. Починка (1976). Содержание свободного пролина определяли в воздушно-сухих пробах методом Бейтса (1973).

В нативном состоянии уровень влаги деревьев Острогожского насаждения составлял 48,9%, Ступинского – 55,3%. При действии гидротермического стресса он понижался до 28,0 и 29,5%, при засухе до 17,2 и 30,7%, соответственно. В опытном варианте содержание коллоидно-связанной воды в стрессовых ситуациях возросло от 22,2 до 27,5% в первом случае и до 29,9% во втором у растений Острогожска; и от 19,1 до 28,0 и 56,7% в Ступино. Для оценки стрессового воздействия определяли показатель дефицит влаги. Для Острогожска его величина составила 9,4%, Ступинно – 8,7%. В первом варианте опыта дефицит увеличился до 23,0 и 24,7%, во втором до 19,7 и 15,3%. Возросло и содержание стрессового метаболита – аминокислоты пролин: от 3,1 до 4,2 ммМ/г при гидротермическом стрессе и до 6,8 ммМ/г при засухе в Острогогжске; и от 3,0 до 4,2 и 11,4 ммМ/г в Ступино. По общему содержанию влаги деревья Ступинского тест-объекта, благодаря более высокому уровню залегания грунтовых вод, достоверно отличались от Острогожского насаждения. Значения других исследованных параметров являются сопоставимыми. При действии гидротермического стресса, границы изменения признаков у всех анализируемых деревьев приблизительно одинаковы, что, по-видимому, указывает на сходные механизмы выживания растений при экстремальном воздействии. Умеренный стресс значительно расширил диапазон изменчивости признаков. Отклик на индуцированный стресс в условиях *ex vivo* Острогожского насаждения носит более сглаженный характер по сравнению с реакцией деревьев Ступинского объекта. Возможно, это связано с расположением насаждения на границе между степной и лесостепной зонами, где гидротермические условия более жесткие, чем в центре лесостепной зоны (Ступинский тест-объект).

Ключевые слова: *сосна обыкновенная, лесостепная зона, индуцированный стресс, водный режим, пролин*

RESEARCH OF THE PHYSIOLOGIC-BIOCHEMICAL PARAMETER VARIABILITY OF PINE IN *EX SITU* AND *EX VIVO* IN CONNECTION WITH THE PROBLEM OF DROUGHT RESISTANCE

E.S. Klushevskaya, N.F. Kuznetsova
FGBI "All-rusRIFGBB" (All-Russian Research Institute of Forest Genetics, Breeding and Biotechnology), Voronezh, Russia, e-mail: *ecogenlab@gmail.ru*

With regard to global climate change, a drought resistance research is one of the actual problems of modern biology. The purpose of this work - a study of the reaction norm of Scots pine in native and stress conditions in *ex situ* and *ex vivo*; an analysis of the physiologic-biochemical parameters, depending on the genotype and model tree habitat. The research object is the trees of "Ostrogozhsk" selection stand, located in a southern zone of the species optimum of pine (Voronezh region, Ostrogozhsk district). As the control serve a trees of Stupino test-object (Voronezh region, Ramon district), growing near the Voronezh Biosphere Reservation. In May, we collected a shoots of the second year of development from the model trees. Analysis of needles was conducted in three variants of experiment: 1) a native samples; 2) a hydrothermal stress impact "drought + temperature" (7 days at 45°C); 3) a moderate stress impact "drought" (10 days at room temperature). For imitation of drought in the laboratory conditions we use a solution of 0.6 M mannitol. Studies of water regime (moisture deficit, moisture total amount, colloid-bound water amount) of plant carry out by the usual method of Kh.N. Pochinok (1976). The content of free proline determined in air-dry samples by Bates (1973).

The moisture level in the native state of Ostrogozhsk stand trees was 48.9%, Stupino - 55.3%. Under a hydrothermal stress impact it reduced to 28.0 and 29.5%, under a drought to 17.2 and 30.7%, respectively. In stress situations a content of colloidal-related water increased from 22.2 to 27.5% in the first case and to 29.9% in the second in the plants of Ostrogozhsk; and from 19.1 to 28.0% and to 56.7% in Stupino. Moisture deficit parameter determined for estimation of stress effect. Its value For Ostrogozhsk was equal to 9.4%, for Stupino - 8.7%. A deficit increased to 23.0 and 24.7% in the first variant of experiment, in the second to 19.7 and 15.3%. Content of proline amino acid – the stress metabolite grew from 3.1 to 4.2 mmM/g under a hydrothermal stress and to 6.8 mmM/g under a drought in Ostrogogzhsk; and from 3.0 to 4.2 and to 11.4 mmM/g in Stupino. Moisture total content of the trees of Stupinsky test object statistically significantly differed from Ostrogozhsk stand, thanks to higher level of groundwater. The values of the other analyzed parameters are a comparable. Under a hydrothermal stress impact, the borders of sign variations at all analyzed trees was approximately the same, that, possibly, to indicate a similar mechanisms of plant survival under extreme impact. The moderate stress significantly expanded the variation range of traits. Response on the induced stress in *ex vivo* conditions of Ostrogozhsk stand had more weak character in comparison with the reaction of trees Stupino test object. This, probably, connected with the stand location on the border between the steppe and forest steppe zones where hydrothermal conditions are more stringent than in the middle of forest-steppe zone (Stupino test-object).

Keywords: *Scots pine, forest-steppe zone, induced stress, water regime, proline*

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ВЕЧНОЗЕЛЕНЫХ ДЕКОРАТИВНЫХ РАСТЕНИЙ НА ЮЖНОМ БЕРЕГУ КРЫМА

С.П. Корсакова, О.А. Ильницкий, Ю.В. Плугатарь
ФГБУН «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН», г. Ялта, Россия, e-mail: *Korsakova2002@mail.ru*

Проведена сравнительная оценка CO_2-газообмена у листьев пяти вечнозеленых и двух лекарственных эфирномасличных видов декоративных растений произрастающих на Южном берегу Крыма: *Nerium oleander* L., *Laurus nobilis* L., *Aucuba japonica variegata* Thunb., *Pittosporum tobira* (Thunb.) Aiton cv. Variegata, *Hedera helix* L., *Melissa officinalis* L. and *Salvia officinalis* L. Измерения CO_2-газообмена у листьев в сходных условиях внешней среды показали достоверные различия параметров световых кривых: светового компенсационного пункта (СКП) и константы насыщения (P_n=0.5P_{max}). У всех видов после СКП интенсивность нетто-фотосинтеза (P_n) увеличивалась до насыщающей интенсивности освещения. Самые высокие величины нетто-фотосинтеза наблюдались у *Nerium oleander* (16.18 мкмоль $м^{-2}$ $с^{-1}$) и *Salvia officinalis* (15.70 мкмоль $м^{-2}$ $с^{-1}$) при максимальной фотосинтетически активной радиации (ФАР) (1827 и 1445 мкмоль $м^{-2}$ $с^{-1}$ соответственно), однако 50% световое насыщение достигало при 94 и 272 мкмоль $м^{-2}$ $с^{-1}$ ФАР. Самая низкая величина фотосинтеза 7.55 мкмоль $м^{-2}$ $с^{-1}$ отмечена у *Aucuba japonica* (константа насыщения 72 мкмоль $м^{-2}$ $с^{-1}$ ФАР). Максимальная величина нетто-фотосинтеза у *Pittosporum tobira* достигала 8.95 мкмоль $м^{-2}$ $с^{-1}$ при 1290 мкмоль $м^{-2}$ $с^{-1}$ ФАР. Однако световое насыщение отмечалось при очень низком уровне ФАР – 49 мкмоль $м^{-2}$ $с^{-1}$. За исключением *Aucuba japonica* и *Pittosporum tobira* (достоверные различия не выявлены), у растений, адаптированных к низким значениям ФАР наблюдалось снижение величины светового компенсационного пункта. Снижение СКП в среднем составляло от 1.5 раз у *Salvia officinalis* до 3.9 раз у *Laurus nobilis*. Тангенс угла наклона световой кривой (α) изменялся от 0.05 (*Melissa officinalis*) до 0.17 (*Pittosporum tobira*), насыщающая интенсивность света – от 39 (*Pittosporum tobira*) до 196 (*Salvia officinalis*) мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$. Полученные результаты указывают на значительные физиологические различия видов. Более низкие значения СКП и констант насыщения у *Laurus nobilis*, *Aucuba japonica*, *Pittosporum tobira* и *Hedera helix* свидетельствуют об эффективном использовании ими низкой ФАР, позволяющем выживать в условиях сильного затенения. Выявленные закономерности можно рассматривать как первый шаг к созданию эколого-физиологических характеристик исследуемых видов.

Ключевые слова: *вечнозеленые виды, CO_2-газообмен, световые кривые фотосинтеза*

COMPARATIVE EVALUATION OF PHOTOSYNTHETIC ACTIVITY IN SOME EVERGREEN ORNAMENTAL PLANTS ON THE SOUTHERN COAST OF THE CRIMEA

S.P. Korsakova, O.A. Ilnitsky, Yu.V. Plugatar
Nikitsky Botanical Gardens Federal State Budget Institution of Science «The Order of the Red Banner Nikita Botanical Gardens – National Scientific Center RAS», Yalta, Crimea, Russia, e-mail: *Korsakova2002@mail.ru*

Comparative estimation of CO_2 gas exchange in leaves of five evergreen and two essential oil medicinal species that have ornamental value, i.e. *Nerium oleander* L., *Laurus nobilis* L., *Aucuba japonica variegata* Thunb., *Pittosporum tobira* (Thunb.) Aiton cv. Variegata, *Hedera helix* L., *Melissa officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., grown under ambient conditions on the Southern coast of the Crimea was carried out. In similar environmental conditions the measurement of CO_2 gas exchange in leaves showed significant differences in the parameters of light response curves: the light compensation point (LCP) and the saturation constant (P_n=0.5P_{max}). Net photosynthesis (P_n) of all species continued to rise after the light compensation point until saturating. The highest rate of net photosynthesis was observed in *Nerium oleander* (16.18 µmol m^{-2} s^{-1}) and *Salvia officinalis* (15.70 µmol m^{-2} s^{-1}) at the highest photosynthetic active radiation (PAR) level (respectively at 1827 and 1445 µmol m^{-2} s^{-1}), but 50% of its light saturation was attained respectively at 94 and 272 µmol m^{-2} s^{-1} PAR. The lowest rate of net photosynthesis was 7.55 µmol m^{-2} s^{-1} in *Aucuba japonica* (50% of it light saturation was attained at 72 µmol m^{-2} s^{-1} PAR). The maximum rate of net photosynthesis of 8.95 µmol m^{-2} s^{-1} in *Pittosporum tobira* was reached at 1290 µmol m^{-2} s^{-1} PAR. But 50% of the light saturation point was reached at a very low PAR level of 49 µmol m^{-2} s^{-1}. Except for *Aucuba japonica* and *Pittosporum tobira* (no significant differences were revealed), plants of all species adapted to low levels of solar radiation achieved a lower light compensation point. The light compensation point dropped on average from 1.5-fold in *Salvia officinalis* to 3.9-fold in *Laurus nobilis*. The slope of the light curve (α) varied from 0.05 (*Melissa officinalis*) to 0.17 (*Pittosporum tobira*), the saturation intensity of light - from 39 (*Pittosporum tobira*) to 196 (*Salvia officinalis*) µmol photons m^{-2} s^{-1}. These results indicate significant physiological differences in the species of plants. Lower values of LCP and saturation constants in *Laurus nobilis*, *Aucuba japonica*, *Pittosporum tobira* and *Hedera helix* indicate effective utilization by them of low values of solar radiation, allowing they to survive under the conditions of strong shadow. The patterns detected can be viewed as a first step to finding the ecophysiological characteristics of the species in question.

Keywords: *evergreen species, CO_2 gas exchange, light response curve for net photosynthesis*

ПОВЫШЕНИЕ ХОЛОДОУСТОЙЧИВОСТИ ПРОРОСТКОВ СОРГО ЗЕРНОВОГО (*SORGHUM BICOLOR* (L.) MOENCH) ПОД ДЕЙСТВИЕМ 24-ЭПИБРАССИНОЛИДА

Е.Н. Кучер, С.И. Чмелёва, А.В. Шплихалова, А.И. Фурсова
Федеральное государственное автономное учреждение высшего образования «КФУ имени В.И. Вернадского», Таврическая академия (структурное подразделение), факультет биологии и химии, кафедра ботаники и физиологии растений и биотехнологий, Таврическая академия КФУ имени В.И. Вернадского, Симферополь, Республика Крым, Россия, e-mail: *eugenic.kucher@gmail.com*

В практике сельского хозяйства в целях увеличения урожайности и повышения устойчивости растений к экстремальным условиям окружающей среды в настоящее время применяются многочисленные регуляторы роста растений. К перспективным в использовании и экологически безопасным современным комплексным препаратам относится Эпин-экстра, в качестве действующего вещества в котором выступает 24-эпибрассинолид.

В ряде работ было показано положительное влияние обработки растений синтетическими регуляторами роста на устойчивость к действию низких температур. В связи с вышесказанным, целью нашей работы являлось изучение влияния препарата Эпин-экстра на холодоустойчивость проростков сорго зернового (*Sorghum bicolor* (L.) Moench).

Подготовленные семена сорго замачивали в растворах препарата Эпин-экстра различной концентрации на 4 часа. Применяли предпосевную обработку растворами препарата в концентрациях: 0,006; 0,013; 0,025, 0,05 и 0,1 мг/л. Семена проращивали в термостате типа ТС-80М-2 в темноте при температуре +25°С. Исследуемые растения выращивали на водной культуре (среда Прянишникова) в вегетационных сосудах емкостью 1 л при естественном освещении и температуре +22-+24°С. в течение 7 суток. На 8-е сутки они были помещены на 20 часов в холодильную камеру (t=+4°С), а затем возвращены в нормальные условия. У 15-дневных растений измерены значения морфометрических параметров. Морфометрические измерения проводили по общепринятым в физиологии растений методикам. Определялись линейные размеры побега и корневой системы, площадь листовой поверхности. В ходе проведения опыта использованы два контрольных варианта: контроль 1 – семена замачивали в отстоянной водопроводной воде и выращивали в нормальных температурных условиях; контроль 2 – семена замачивали в отстоянной водопроводной воде, растения были подвергнуты действию низкой положительной температуры одновременно с опытными вариантами.

В результате проведенных исследований было установлено, что у растений, подвергшихся действию низких положительных температур (контроль 2) установлена четкая тенденция к снижению величины параметров роста по сравнению с контрольными, выращенными при оптимальной температуре (контроль 1). Так, высота надземной части растений в неблагоприятных условиях меньше, чем в контроле 1 на 18,6%, длина корневой системы – на 17,8%, площадь листовой поверхности – на 20,0%.

Использование препарата Эпин-экстра привело к увеличению значений морфометрических показателей растений как в оптимальных температурных условиях, так и в условиях температурного стресса. Наиболее выраженный стимулирующий эффект при различных температурных режимах выращивания оказывает концентрация раствора регулятора роста, равная 0,025 мг/л. При предпосевной обработке семян регулятором роста в этой концентрации длина корневой системы растений в условиях холодового стресса превышала величину параметра в контроле 2 на 18,4%, высота побега – на 21,2%, а площадь листовой поверхности – на 18,2%.

Полученные данные могут стать основанием для разработки способов применения препарата Эпин-экстра в практике сельского хозяйства с целью повышения устойчивости сорго зернового к стрессовым факторам окружающей среды.

Ключевые слова: *24-эпибрассинолид, регулятор роста, холодоустойчивость, сорго зерновое*

INCREASING OF LOW-TEMPERATURE RESISTANCE IN GRAIN SORGHUM (*SORGHUM BICOLOR* (L.) MOENCH) SEEDLINGS UNDER 24 EPIBRASSINOLIDE

Kucher E.N., Chmeleva S.I., Shplikhalova A.V., Fursov A.I.
Federal state autonomous institution of higher education "Crimean Federal V.I. Vernadsky University", Taurida Academy (structural subdivision), Faculty of Biology and Chemistry, Department of Botany and Plant Physiology and Biotechnology, Crimean Federal V. I. Vernadsky University, Simferopol, Republic of Crimea, Russia,
e-mail: *eugenic.kucher@gmail.com*

Currently, in agricultural practice, in order to increase yield and plant resistance to extreme environmental conditions, numerous plant growth regulators are applied. Epin-extra, with an active ingredient 24-epibrassinolide, is promising to use and environmentally friendly modern complex drug.

A number of studies have shown a positive effect of the treatment of plants with synthetic growth regulators against the resistance to low temperatures. In this connection, the aim of our work was to study the effect of Epin-extra drug on low-temperature resistance of grain sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) seedling.

Prepared sorghum seeds were soaked in solutions of the drug Epin-extra with different concentrations for 4 hours. We used seedbed processing with solution concentrations: 0.006; 0.013; 0.025, 0.05 and 0.1 mg / l. Seeds were germinated in a thermostat TS-80M-2 in the dark at + 25°C. The test plants were grown in an aqueous culture (the Pryanishnikov medium) in vegetation pots of 1 liter under natural light and a temperature of + 22–24°C for 7 days. On the 8th day they were placed for 20 hours in the refrigerator compartment (t = + 4°C) and then returned to normal conditions. We measured morphometric parameters of 15-day-old plants. The morphometric measurements were performed according to generally accepted methods in plant physiology. We determined the linear dimensions of sprout, root system, leaf surface area. During the experiment two control options were used: Control 1: the seeds were soaked in settled tap water, the plants were grown in normal temperature conditions; control 2: seeds were soaked in settled tap water, plants were exposed to low positive temperatures simultaneously to control 1 seeds.

As a result of studies, it was found that plants exposed to the action of low positive temperature (control 2) established a clear tendency to reduce the magnitude of growth parameters as compared to controls grown under the optimum temperature (control 1). Thus, under adverse conditions the height of aboveground plant parts was 18.6% smaller than in the control 1 plants, root length – by 17.8%, the leaf surface area – by 20.0%.

Use of the drug Epin-extra has led to an increase in the values of morphometric parameters of plants in optimal temperature conditions and under temperature stress. The most pronounced stimulatory effect of growing at various temperature regimes has growth regulator solution concentration equal to 0.025 mg / l. In this concentration of growth regulator, pre-treated seeds showed length of the root system under cold stress greater than the value of the parameter in the control 2 to 18.4%, the shoot height – 21.2%, and leaf surface area – by 18.2%.

The findings may provide the basis for the development of techniques of using the drug Epin-extra in agricultural practice in order to increase the stability of the grain sorghum to stressful environmental factors.

Keywords: *24-epibrassinolide, growth regulator, low-temperature resistance, grain sorghum*

РИЗОГЕНЕЗ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO* И ВЛИЯНИЕ НА ЭТОТ ПРОЦЕСС РЕГУЛЯТОРОВ УГЛЕВОДНОЙ ПРИРОДЫ

И.А. Ларская, О.И. Трофимова, Т.А. Горшкова
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук, г. Казань, Россия,
e-mail: *trofoi@mail.ru*

Индукция адвентивных корней на различных модельных системах является хорошим методом микроразмножения *in vitro* и имеет практическую ценность для садоводства и агрономии, так как многие виды растений трудно укореняются обычным способом. Сравнительный анализ образования корней при оптимальных условиях культивирования позволил расположить различные тест-системы по степени увеличения их ризогенного ответа в следующем порядке: гипокотили клещевины > эпикотили кукурузы > гипокотили кабачка > гипокотили льна > гипокотили табака > сегменты корней кукурузы ≥ листовые экспланты табака ≥ гипокотили гречихи. Несмотря на то, что в процессе проведенного анализа не было выявлено уникальной тест-системы, которая удовлетворяла бы всем необходимым требованиям, для дальнейшей работы, из всех перечисленных тест-систем, нами были выбраны гипокотили гречихи, листовые экспланты табака и сегменты корней кукурузы. Тест-система с использованием гипокотилей гречихи очень проста в применении и позволяет достаточно быстро провести скрининг различных эффекторов. На сегментах корней кукурузы формируются латеральные корни, и этот объект может быть полезен для сравнительного анализа механизмов формирования адвентивных и латеральных корней. Использование в работе эксплантов из листьев трансгенного табака, несущих *rolB-GUS* конструкцию позволяло наблюдать не только конечный результат по подсчету корней, но и оценивать ранние ИУК-индуцируемые события по GUS-активности еще до появления первых видимых корней. ИУК при концентрации 3 мкМ хорошо стимулировала корнеобразование на всех выбранных нами модельных системах. Однако количество корней можно было увеличить на 20-25% при одновременном добавлении в среду культивирования 5 мкг/мл фракции олигосахарина. Эта фракция олигосахаринов была получена в нашей лаборатории в результате многоступенчатой хроматографической очистки экстрактов проростков гороха без предварительного гидролиза полисахаридов клеточной стенки. Она имела степень полимеризации 12-14 и состояла преимущественно из арабинозы, глюкозы и галактозы. Эффективность полученной фракции была выше при краткосрочной обработке эксплантов до добавления гормона. Использование листовых эксплантов из трансгенных растений табака показало, что добавление олигосахарина в среду культивирования до гормона вызывало не только увеличение количества корней, но и повышение пика GUS-активности и ускорение времени его появления. Поскольку активация фермента является строго ИУК-индуцируемой реакцией и отражает чувствительность клеток к гормону, то наблюдаемый эффект демонстрирует усиление ответной реакции на гормон у клеток, предобработанных олигосахарином еще до появления первых видимых корней, а повышение числа корней на эксплантах означает увеличение количества инициальных клеток. Таким образом, полученные данные указывают на то, в сигнальном пути регуляции ризогенеза, запускаемом и регулируемом ауксином, принимает участие эндогенный регулятор углеводной природы, который действует на ранних стадиях корнеобразования еще до гормона. Проявление его эффекта на разных модельных системах свидетельствуют об универсальной природе вовлеченности олигосахаринов в клеточные процессы при формировании адвентивных корней.

Ключевые слова: *экспланты, ризогенез, олигосахарины*

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (грант 14-04-01591).

RHIZOGENES *IN VITRO* AND THE INFLUENCE OF CARBOHYDRATE NATURE REGULATORS ON THIS PROCESS

I.A. Larskaya, O.I. Trofimova, T.A. Gorshkova
Federal State Institution of Science Institute of Biochemistry and Biophysics, Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Kazan, Russia, e-mail: *trofoi@mail.ru*

The induction of adventitious roots in various model systems is a good method of micropropagation *in vitro* and has practical value for horticulture and agronomy, as rooting of many plant species of plants is difficult in its usual way. Comparative analysis of the roots formation under optimum conditions allowed us to arrange a variety of test systems according to the degree of increasing their rhizogenic response in the following order: castor's hypocotyls > corn's epicotyls > zucchini's hypocotyls > flax's hypocotyls > tobacco's hypocotyls > segments of the corn roots ≥ leaf explants of tobacco ≥ buckwheat's hypocotyls. Despite the fact that in the course of the analysis unique test system suitable for all the necessary requirements was not revealed; for the further work we chose hypocotyls of buckwheat, tobacco leaf explants and segments of maize roots. The test system using buckwheat's hypocotyls is very easy to use and allows to make rather fast screening of various effectors. In segments of the maize roots lateral roots are formed, and this object can be useful for comparative analysis of the mechanisms of formation of adventitious and lateral roots. Using the explants from leaves of transgenic tobacco carrying *rolB-GUS* construct it is possible to observe not only the final result by counting the roots, but also to evaluate the early IAA-induced events by GUS-activity before the appearance of the first visible roots.

The IAA at a concentration of 3 μM well stimulates root formation on all of the selected model systems. However, the number of roots can be increased by 20-25%, while adding 5 μg/ml oligosaccharin's fraction to the medium. This fraction was obtained in our laboratory as a result of multi-stage chromatographic purification of extracts of pea seedlings without pre-hydrolysis of cell wall polysaccharides. It has a degree of polymerization of 12-14 and consisted mainly of arabinose, glucose and galactose. The effectiveness of this fraction was higher at short treatment of explants prior to addition of the hormone. The use of leaf explants from transgenic tobacco plants showed that the addition of oligosaccharin to the medium before hormone causes not only an increase in the roots, but also increase of the peak of GUS-activity and the acceleration time of its appearance. Since enzyme activity is strictly the IAA-induced reaction and reflects the sensitivity of cells to the hormone, the observed effect demonstrates the strengthening of the response to the hormone cells pretreated by oligosaccharin before the first visible roots and increase of the root number per explants means the increase of the number of initial cells. Thus, these data indicate that endogenous regulator of carbohydrate nature is involved in the signaling pathway regulating root formation triggered and controlled by auxin. It acts at the early stages of rooting before hormone. The manifestation of its effect on various model systems demonstrate the universal nature oligosaccharin involvement in cellular processes that occur during the formation of adventitious roots.

Keywords: *explants, root formation, oligosaccharin*

Aknowlegment
This work was partially supported by RFBR (grant 14-04-01591).

ВЛИЯНИЕ НОВОГО ШТАММА *BACILLUS SUBTILIS* НА ЭНДОГЕННЫЙ УРОВЕНЬ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ И ФОРМИРОВАНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ К ДЕФИЦИТУ ВЛАГИ В ПРОРОСТКАХ *TRITICUM AESTIVUM* L.

О.В. Ласточкина, Р.А. Юлдашев,М.В. Пенкина, Л.И. Пусенкова
ФГБНУ Башкирский НИИСХ, г. Уфа, Россия, e-mail: *oksanaibg@gmail.com*

Бактерии стимулирующие рост растений (PGPB – plant growth promoting bacteria) оказывают положительный эффект на растения интенсифицируя ростовые процессы и снижая восприимчивость к биотическим и абиотическим стрессам.Механизмы, посредством которых PGPB влияют на растение-хозяина, являются многочисленными, многообразными и часто специфичными. Ранее нами была показана способность бактерий *Bacillus subtilis* 10-4 (*B. subtilis*) оказывать защитный эффект на рост растений пшеницы (*Triticum aestivum* L.)в условиях засоления (2% NaCl) и выявлено, чтосущественный вклад в реализацию такого действияявносит снижение подих влияниемуровня стресс-индуцированного развития окислительного и осмотического стрессов в проростках.Вместе с тем известно, что в запуске механизмов развития системной устойчивости растений важную роль играют такие сигнальные молекулы как жасмоновая и салициловая кислота (СК).В связи с этим, целью данной работы явилось изучение влияния *B. subtilis* 10-4 на содержание эндогенной СК.Обнаружено, что воздействие дефицита влаги на проростки приводило к существенномуувеличению содержания СК в них, что согласуется с данными литературы о том, что СК является ключевым медиатором сигнальных путей, ведущих к активации защитных систем организма в ответ на воздействие разных по природе стресс-факторов. В то же время предпосевная обработка пшеницысуспензионной культурой *B. subtilis* 10-4 также вызывала увеличение содержания эндогенной СК в проростках (до стресса) в сравнении с контролем, что может свидетельствовать в пользу предадаптирующего действия бактерий на растения к последующему воздействию стрессовых факторов, приводящих к их обезвоживаниюпосредством активациисалицилат-зависимых сигнальных путей. Действительно, предобработанные *B. subtilis* 10-4 проростки характеризовались значительно меньшим уровнем индуцированного дефицитом влаги накопления СК в сравнении с таковыми необработанными. Результирующими показателями повышения бактериями *B. subtilis* 10-4 устойчивости растений к обезвоживанию могут служить данные о повышении под их влиянием водоудерживающей способности тканей листьев и снижении уровня стресс-индуцированного гидролиза статолитного крахмала в клетках корневых чехликов зародышевых корешков.Таким образом, предпосевная обработка семян *B. subtilis* 10-4способствует повышению уровня эндогенной СК, что может вносить существенный вклад в реализацию бактериями протекторного действия и проявляется в повышении водоудерживающей способности листьев и замедлении процесса гидролиза статолитного крахмала в условиях дефицита влаги.

Ключевые слова: *Bacillus subtilis*, *устойчивость растений, салициловая кислота,дефицит влаги,водоудерживающая способность, статолитный крахмал, Triticum aestivum* L.

EFFECT OF NEW *BACILLUS SUBTILIS* STRAIN ON ENDOGENOUS SALICYLIC ACID LEVEL AND FORMATION OF RESISTANCE TO WATER DEFICIT IN *TRITICUM AESTIVUM* L. SEEDLINGS

O.V. Lastochkina, R.A. Yuldashev, M.V. Penkina, L.I. Pusenkova
FSBSI Bashkir Scientific Research Institute of Agriculture, Ufa, Russia
e-mail: *oksanaibg@gmail.com*

Plant growth-promoting bacteria (PGPB) induce positive effects in plants, for instance, increased growth and reduced biotic and abiotic stresses susceptibility. The mechanisms by which these bacteria impact the host plant are numerous, diverse and often specific. We have previously demonstrated the ability of the bacteria *Bacillus subtilis* 10-4 (*B. subtilis*) exert protective effect on the growth of wheat plants (*Triticum aestivum* L.) under salinity (2% NaCl). Also, we revealed that a significant contribution to the implementation of such action makesdecreasingunder the influence of bacteria levels of stress-induced oxidative and osmotic stress in seedlings. However, it is known that in the launch of mechanisms of plant systemic resistance are important role plays such signaling molecules asjasmonic and salicylic acid (SA). In this regard, the aim of this work was to study the effect of *B. subtilis* 10-4 on the content of endogenous SA under normal and water deficit conditions. It has been found that the impact of water deficit on seedlings resulted in a significant increase in the content SA in them, which is consistent with the literature data about SA is the key mediator of signaling pathways leading to activation of the organism's defense systems in response to the different stresses.At the same time, pre-sowing treatment of seeds with *B. subtilis* 10-4 also increased the content of endogenous SA in seedlings (before stress) in compared to control, which may indicatea predadaptation action of bacteria on plants to the subsequent impact of stress factors leading to their dehydration by activating the salicylate-dependent signaling pathways.Indeed, the seedlingspretreated with *B. subtilis* 10-4 were characterizedby significantly lower level of SA accumulation in comparison with those untreated under water deficit. The resulting indicators enhancing by bacteria *B. subtilis* 10-4 resistance of plants to dehydration may serve data about increase under their influence of water-holding capacity in leaf tissues and reducing stress-induced hydrolysis of statolite starch in root cap cells of the germinal roots.Thus, pretreatment of seeds with *B. subtilis* 10-4 enhances the levels of endogenous SA that can make a significant contribution to the implementation of the protective action of the bacteria and manifested in the increase water-holding capacity of leaves and slowing the process of statolite starch hydrolysis under water deficit condition.

Keywords: *Bacillus subtilis*, *plant resistance, salicylic acid, water deficiency, water-holding capacity, statolite starch, Triticum aestivum*L.

МЕЛАФЕН И ГЕРМАТРАН ЗАЩИЩАЮТ МИТОХОНДРИИ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА В СТРЕССОВЫХ УСЛОВИЯХ

Е.М. Миль[1], И.В., Жигачева[1] , А.А. Албантова[1], В.И. Бинюков[1]
[1] Институт биохимической физики Российской академии наук им.Н.М.Эмануэля, г. Москва, Россия; e-mail: *elenamil2004@mail.ru, zhigacheva@mail.ru, albantovaaa@mail.ru, bin707@mail.ru*

Действие различных стрессовых ситуаций, таких как неблагоприятные факторы окружающей среды, особенно в весенний период, влияние химических веществ и других факторов на растения и животные организмы, может изменить метаболизм клеток и даже привести к гибели клетки и всего организма. Чтобы предотвратить окислительный стресс и уменьшить последствия его влияния широко используются антиоксиданты. В этой работе было изучено защитное действие регулятора роста растений мелафена при низкой концентрации (2×10^{-12}М) и антиоксиданта герматрана (германий органическое соединение) (10^{-5} М) на морфологию митохондрий проростков гороха (*Pisum sativum L*) при обработки семян в условиях низкой влажности и умеренного охлаждения (НВ, +14°С) с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ).

Метод позволил увидеть АСМ изображения нормальных митохондрий растений, делящихся митохондрий, набухших митохондрий после воздействия стресса, а также митохондрий после введения мелафена и герматрана. Было обнаружено, что в контрольных АСМ-изображениях наблюдались отдельные и делящиеся митохондрии. В условиях воздействия (НВ, +14°С) на семена, средний объем АСМ-изображений митохондрий 5-ти дневных проростков гороха увеличивался, а также наблюдались набухшие митохондрии. Набухание митохондрий является важным показателем клеточного метаболизма, поскольку может привести к апоптозу - запрограммированной гибели клеток.

Было показано, что средний объем (Vср) АСМ изображений митохондрий в контроле составил Vср = 81,0 мкм^2×нм, воздействие (НВ ,+14°С) увеличивало средний объем до Vср = 115,1 мкм^2×нм, а предварительное замачивание семян в 2×10^{-12} М растворе мелафена при тех же условиях стресса предотвращало изменения в морфологии митохондрий (Vср = 86 мкм^2×нм). При предварительной обработки семян герматраном размеры митохондрий приближались к контрольным значениям. В экспериментах было также показано, что при комбинированном действии охлаждения и недостаточного увлажнения происходит активация перекисного окисления липидов (ПОЛ) в мембранах митохондрий и увеличивается интенсивность флуоресценции продуктов перекисного окисления липидов в 2,5-3 раза по сравнению с контролем. После замачивания семян в растворе мелафена (2×10^{-12} М) с последующим выращиванием семян в стрессовых условиях, происходило снижение содержания продуктов перекисного окисления липидов в мембранах митохондрий и интенсивности флуоресценции продуктов перекисного окисления липидов почти до контрольного уровня.

Можно предположить, что хороший защитный эффект мелафена на метаболизм растительных клеток может быть связан с его антиоксидантными свойствами.

Ключевые слова: *растительные митохондрии, мелафен, герматран, стресс, АСМ*

MELAPHEN AND GERMATRAN PROTECT MITOCHONDRIA OF PEA SEEDLING UNDER STRESS

E.M. Mil[1], I. Zhigacheva[1], A.A. Albantova[1], V.I. Binyukov[1]
[1]Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;
e-mail: *elenamil2004@mail.ru, zhigacheva@mail.ru, albantovaaa@mail.ru, bin707@mail.ru*

The action of various stress situations, such as environmental factors especially in spring, the impact of chemicals and others factors on to plants and animal organisms, may change the metabolism of the cells and even lead to death of the cell and the entire organism. To prevent oxidative stress and reduce the effects of its influence are widely used antioxidants.

In this work was to studied the protective effect of plant growth regulator melaphen at low concentration (2×10^{-12} M) and antioxidant germatran (germanium organic compound) (10^{-5} M) on morphology of mitochondria pea seedlings (*Pisum sativum L*) under the pretreatment of seeds and in conditions of low moisture and moderate cooling (LM +14°C) by atomic force microscopy (AFM).

The method allowed to show the AFM images of normal mitochondria, division plant mitochondria, swollen mitochondria after exposure to stress and also mitochondria after introduction of melaphen and germatran. It has been found that in the controls on AFM images were observed the individual mitochondria and division mitochondria. In conditions of action (LM+ 14°C) on seeds the average volume of AFM images of mitochondria 5- day pea seedlings it was increased and also appeared swollen mitochondria. The swelling of mitochondria is an important indicator of cell metabolism, as it may lead to apoptosis - the programmed cell death.

It was shown that the average volume of AFM images mitochondria in control was Vav = 81.0 $\mu m^2 \times$ nm. The action of low moisture and moderate cooling increases the volume to Vav = 115.1 $\mu m^2 \times$ nm and preliminary soaking of seeds in 2×10^{-12} M solution of melaphen under the same stress condition prevents changes in the morphology of mitochondria (Vav = 86 $\mu m^2 \times$ nm). In the case of prior exposure of seeds with germatran the size of mitochondria also approaching to the control mitochondria.

In the experiments also was showed that under the combined action of cooling and insufficient humidity, the activation of lipid peroxidation (LPO) in the membranes of mitochondria, and the fluorescence intensity of lipid peroxidation products was increased in 2,5-3 times compared to the control. After the soaking the seeds in a solution melaphen (2×10^{-12}M) results the decrease the content of lipid peroxidation products in the membranes of mitochondria: and the fluorescence intensity of lipid peroxidation products was reduced almost to the control level.

It can be assumed that good protective effect of melaphen on metabolism of plant cells may be due to its antioxidant properties.

Keywords: *plant mitochondria, melaphen, germatran, stress, AFM*

ВЛИЯНИЕ СПЕКТРАЛЬНОГО СОСТАВА СВЕТА НА СОДЕРЖАНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ЗВЕРОБОЕ ПРОДЫРЯВЛЕННОМ (*HYPERICUM PERFORATUM L.*)

Никифорова Н.В.[1], Овчинникова В.Н.[2], Карсункина Н.П.[1]
[1]Российский государственный аграрный университет – РГАУ-МСХА имени К.А.Тимирязева, г. Москва, Россия. e-mail: *nikif_natali@mail.ru*
[2]ФГБНУ «ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии» ФБГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии (ФБГНУ ВНИИСБ), г. Москва, Россия. e-mail: *vera.ovchinnikova.1957@mail.ru*

Из используемых в медицине лекарственных растений лишь 20-30% возделывается в культуре, а потребность в остальных обеспечивается за счёт истощающейся дикорастущей флоры. Как известно, зверобой продырявленный широко используется в медицине, так как содержит множество биологически активных веществ, в частности, фенольных соединений, которые и представляют большой интерес для фармакологии.

Пока это растение не является редким видом, но систематическая заготовка его сырья постепенно приведет к сокращению природных запасов. Поэтому разработка методов выращивания *H. perforatum L.* в условиях *in vitro* с целью получения качественного лекарственного материала и изучение их влияния на содержание фенолов являются актуальными.

Объект исследования – дикорастущий и культурный (сорт Золотодолинский) зверобой продырявленный. Микропобеги растений, облучаемые светодиодными лампами с красным, белым и красно-синим световыми спектрами, культивировались в течение месяца на трёх вариантах сред МС: 1) +ИМК 0,2 мг/л; 2) +ИМК 0,2 мг/л + 6-БАП 3 мг/л; 3) +ИМК 0,2 мг/л + 6-БАП 0,2 мг/л при фотопериоде 16 часов. Определение суммы растворимых фенольных соединений проводили на спектрофотометре по методике М. Н. Запромётова с использованием реактива Фолина-Дениса.

Свет разного спектрального состава оказывал влияние на морфогенез, продуктивность растений и синтез фенольных соединений *in vitro*. Наблюдали разницу в активности побегообразования и реакцию генотипов по синтезу фенолов в зависимости от сочетания светового спектра и гормонального состава питательной среды.

Установлено, что в дикорастущем зверобое при выращивании с использованием всех световых спектров общее содержание фенольных соединений существенно увеличивалось с увеличением содержания цитокинина в культуральной среде.

В то же время реакция растений сорта Золотодолинский на спектральный состав света и концентрацию цитокининов в культуральной среде была различной, а именно: при красном световом спектре 6-БАП в концентрации 3 мг/л значительно повысил общее содержание фенолов в сравнении с контролем, а 0,2 мг/л 6-БАП– снизил.

При красно-синем источнике освещения значительное увеличение содержания фенолов произошло в микропобегах, культивировавшихся на среде с 0,2 мг/л 6-БАП.

При освещении белым спектром наблюдали прямую зависимость увеличения содержания фенольных соединений с ростом концентрации 6-БАП.

Таким образом, наибольшее количество фенольных соединений синтезировалось у обоих генотипов зверобоя продырявленного при облучении красным и белым световыми спектрами на средах с 3 мг/л 6-БАП.

Ключевые слова: *зверобой продырявленный, фенолы, цитокинины, спектральный состав света*

EFFECT OF LIGHT SPECTRAL COMPOSITION ON THE CONTENT OF PHENOLIC COMPOUNDS IN ST. JOHN'S WORT (*HYPERICUM PERFORATUM L.*)

N.V. Nikiforova[1], V.N. Ovchinnikova[2], N.P. Karsunkina[1]
[1] Russian State Agrarian University - RSAU-MTAA named after K.A. Timiryazev, Moscow, Russia, e-mail: *nikif_natali@mail.ru*
[2] Federal Budget State Scientific Institution "Russian Federal Research Institute of Agricultural Biotechnology", Moscow, Russia,
e-mail: *vera.ovchinnikova.1957@mail.ru*

From the medicinal plants used in medicine only 20-30% are cultivated in culture, but the need in the remaining one are provided due to the dwindling wild flora. As is known, St. John's wort is of great interest for medicine, as it contains a lot of biologically active compounds, a significant part of which belongs to the group of phenols.

Currently the plant is not a rare species, but the systematic collection for preparation of raw materials are gradually leading to a reduction of its reserves, so the development of *H. perforatum* L. cultivation methods under controlled conditions *in vitro* to obtain environmentally friendly and high-quality medicinal material is actual.

The object of research is a wild or cultivated (Zolotodolinsky cultivar) St. John's wort. Microshoots of plants, irradiated by LED lamps with red, white, and red and blue light spectrum, were cultured for a month in three versions of MS media: 1)+IBA 0.2 mg/l; 2) +IBA 0.2 mg/l 6-BAP + 3 mg/l; 3) +IMK + 0.2 mg/l 6-BAP + 0.2 mg/l with a photoperiod of 16 hours.

The light of different spectral composition regulated morphogenesis, plant productivity and synthesis of phenolic compounds in vitro. Difference in activity of shoot formation and reaction of genotypes on the synthesis of phenols depending on the combination of the light spectrum and the hormonal composition of the nutrient medium were observed.

Wild St. John's wort have significantly increased the total content of phenolic compounds under irradiation with red and white light spectrum at the concentration of the cytokinin 3 mg/l.

It was established that on the total content of phenols in micro plants of Zolotodolinsky cultivar Hypericum various concentrations of 6-BAP in the red light spectrum had the opposite effect: 6-BAP 3 mg/l significantly increased the total phenol content in relation to the control and 0.2 mg/l - reduced.

With the red-blue light source a significant increase in content of phenols was in microshoots cultured on medium with 6-BAP 0.2 mg/l.

The greatest number of phenolic compounds were synthesized in both genotypes of Hypericum perforatum at a red and white light irradiating in the medium with 6-BAP 3 mg/l.

Keywords: *St. John's wort, phenols, cytokinins, spectral composition of light*

ВЛИЯНИЕ ЦИТОЗИНОВОГО МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК НА УСТОЙЧИВОСТЬ К АБИОТИЧСЕКИМ СТРЕССАМ РАСТЕНИЙ *ARABIDOPSIS THALIANA*

З.В. Огнева[1,2], А.С. Дубровина[2], К.В. Киселев[1,2]
[1]Дальневосточный федеральный университет, Школа естественных наук, г. Владивосток, Россия
[2]Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Биолого-почвенный институт Дальневосточного отделения Российской академии наук, г. Владивосток, , Россия, e-mail: *zlata.v.ogneva@gmail.com*

За прошедший год на территории Российской Федерации от засухи погибло около 2 миллионов гектар посевов. Это катастрофические потери для сельского хозяйства. Современные агрономы постоянно сталкиваются с проблемой адаптации растений к неблагоприятным условиям окружающей среды. На сегодняшний день хорошо изучены процессы адаптации растений к абиотическим стрессам с точки зрения экспрессии отдельных генов в исследуемых растениях. Однако генетически идентичные растения в разных условиях могут проявлять тот или иной признак по-разному. Это связано с эпигенетическими механизмами, которые происходят с геномом и являются степенью проявления конкретного признака. К сожалению, очень мало уделяется внимания эпигенетическим аспектам адаптации растений, в том числе метилирования ДНК.

Цитозиновое метилирование ДНК – это модификация молекулы ДНК без изменения нуклеотидной последовательности, которая осуществляется путем присоединения метильной группы (-CH3) к цитозину с помощью фермента метилтрансферазы, а деметилирование метилцитозина обратно в цитозин происходит с помощью фермента деметилазы. Данный механизм является очень важным для поддержания стабильности генома и регуляции экспрессии генов у высших растений и других организмов. Однако по-прежнему остается неясно, является ли метилирование/деметилирование ДНК процессом, способствующим лучшей адаптации растений к неблагоприятным условиям окружающей среды.

Известно, что метилирование ДНК находится под контролем различных биотических и абиотических факторов, влияющих на рост и развитие растений. Однако изменения уровня метилирования отдельных генов в связи с развитием устойчивости к абиотическим стрессам изучены недостаточно. Поэтому целью нашей работы было определить зависимость между уровнем цитозинового метилирования ДНК и устойчивостью растений к различным абиотическим стрессам.

В данной работе мы использовали растения *Arabidobsis thaliana*, где контрольная группа растений была с естественным уровнем цитозинового метилирования ДНК, а экспериментальная была с искусственно заниженным уровнем метилирования. Уровень метилирования у исследуемых растений занижался с помощью добавления в почву специального деметилирущего агента – 5-азацитидина. Контрольные и экспериментальные растения подвергались различным абиотическим стрессам – экстремальное содержание солей в почве, засуха и высокая температура. Полученные данные свидетельствуют о снижении стрессоустойчивости растений с заниженным уровнем метилирования ДНК, что подтверждает физиологическую значимость метилирования ДНК при регуляции экспрессии генов в ответ на воздействия окружающей среды.

Таким образом, по результатам проделанной работы можно сделать вывод, что экспериментальное снижение метилирования ДНК приводит к получению менее устойчивых растений. Этот факт означает, что, возможно, искусственное повышение уровня метилирования ДНК может привести к получению растений с повышенной устойчивостью к неблагоприятным условиям окружающей среды, что требует отдельного исследования.

Ключевые слова: *цитозиновое метилирование, абиотические стрессы, Arabidobsis thaliana*

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (16-04-00839).

INFLUENCE OF DNA METHYLATION ON THE ABIOTIC STRESS TOLERANCE IN *ARABIDOPSIS THALIANA*

Z.V. Ogneva[1,2], A.S. Dubrovin[1], K.V. Kiselev[1,2]
[1] Laboratory of Biotechnology, Institute of Biology and Soil Science, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia;
[2] Department of Biochemistry and Microbiology, The School of Natural Sciences, Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia, e-mail: *zlata.v.ogneva@gmail.com*

In the Russian Federation over the last year the drought has led to loss about 2 million hectares of crops. That is catastrophic losses in agriculture. Agronomists constantly face with the problem of adaptation of plants to adverse environmental conditions. Some crops are not initially adapted to a cold Russian climate, and some are too sensitive to sudden changes in environmental conditions. Nowadays the processes of plant adaptation to abiotic stresses in expression of individual genes are well studied. However genetically identical plants are capable of different expression of the same trait in different conditions. The expression of a particular trait is associated with epigenetic mechanisms. Unfortunately epigenetic aspects of plant adaptation, including DNA methylation, are often deprived of attention.

Cytosine methylation is a DNA molecule modification that occurs by the addition of a methyl (CH_3) group to cytosine without changing the nucleotide sequence. This mechanism plays an important role in maintaining the genome stability and in gene expression regulation in higher plants and other organisms. But it is still unclear whether the DNA methylation or demethylation processes play a role in adaptation of plants to adverse environmental conditions. It is well-known that DNA methylation is controlled by various biotic and abiotic factors that affect plant growth and development. However changes in DNA methylation level of individual genes with the development of resistance to abiotic stress are not well understood. Therefore the purpose of this study was to determine association between the cytosine methylation level and plant resistance to various abiotic stresses.

In this study the plant *Arabidopsis thaliana* was used. The control group of plants had natural DNA cytosine methylation level and experimental group had artificially depressed level of methylation. DNA methylation level in experimental plants was depressed by adding special demethylation agent: 5-azacytidine to the soil. All experimental and control plants were subjected to various abiotic stresses. The obtained data show that reducing stress resistance of plants depends on reducing DNA methylation level that confirms the physiological relevance of DNA methylation at gene expression regulation in response to environmental influences.

In conclusion: the experimental decrease of DNA methylation level results in less plant resistance. This fact means that plants with increased resistance to adverse environmental conditions can be produced by artificially improvement of DNA methylation level.

Keywords: *cytosine methylation, abiotic stress, Arabidobsis thaliana*

Aknowlegment
This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (No 16-04-00839).

ВЛИЯНИЕ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА НА КУЛЬТУРУ ТРИТИКАЛЕ ПРИ ИНФЕКЦИОННОМ СТРЕССЕ

Н.В. Осокина[1], Е.А. Калашникова[2], Н.П. Карсункина[3]
[1]РГАУ-МСХА имени К.А.Тимирязева, г. Москва, Россия, e-mail: *natali5-13@mail.ru*
[2]РГАУ-МСХА имени К.А.Тимирязева, г. Москва, Россия, e-mail: *kalash0407@mail.ru*
[3]РГАУ-МСХА имени К.А.Тимирязева, г. Москва, Россия, e-mail: *agrofak@gmail.com*

В настоящее время исследование грибов рода *Fusarium* осуществляется в глобальном масштабе, так как этот патоген доставляет большой вред сельскому хозяйству, вызывая болезнь ценных зерновых культур. Заражённые растения и зерно не пригодны для использования и вредны для здоровья человека и животных. Но несмотря на огромные усилия научного сообщества, многие проблемы в данной области до сих пор не решены.

В наши дни для борьбы с грибными болезнями сельскохозяйственно значимых культур широко применяют пестициды. Они вредны для здоровья человека и животных. В некоторых концентрациях регуляторы роста растений способны ингибировать развитие гриба, являются альтернативным решением. В работе приведен анализ влияния регуляторов роста на развитие фузариоза тритикале, на изменение содержания фенольных соединений в проростках тритикале *in vitro*.

В исследованиях использовали виды грибов *Fusarium*, наиболее часто всречающихся на посевах нашей области: *F. culmorum*, *F. sporotrichioides*, *F. oxysporum* и *F. avenacium*, изучалась их корреляционная зависимость развития при добавлении в питательную среду различных концентраций экологически безвредных регуляторов роста. В качестве растительного материала для исследований была выбрана ценная зерновая культура – тритикале. В качестве регуляторов роста применяли препараты Иммуноцитофит, арахидоновая кислота на основе морских водорослей

Размножение чистой культуры патогенов для получения достаточного количества инокулюма проводили на безгормональной агаризованной питательной среде ½ Мурасига и Скуга (½ МС) с добавлением регуляторов роста.

Выращивали грибы совместно с зерновками тритикале в чашках Петри в условиях световой комнаты при температуре 25°C, 16-часовом фотопериоде, при интенсивности света 3000 лк. По истечении 7 суток проводили учёт биометрических показателей проростков, морфологических особенностей мицелия гриба и биохимические исследования по выявлянию количества растворимых фенольных соединений в проростках.

Проведённые эксперименты показали, что в концентрациях 7,5 мг/л изучаемые препараты оказывают ингибирующее действие на развитие фузариоза. Биохимический анализ показал, что зерновка является синергистом препаратов за счет синтеза вторичных метаболитов, выполняющих защитную функцию в интактных растениях. В стрессовых условиях количестворастворимых фенольных соединений увеличивается и во всех вариантах с присутствием одновременно гриба и препарата превышает контроль (без грибов и регулятора).

Таким образом, регуляторы роста в определённых концентрациях в стрессовых для растения условиях активируют его защитные механизмы, улучшая тем самым их невосприимчивость к болезням или инфекциям. Благодаря этому, появляется возможность частичной борьбы или предотвращения заражения растений фузариозом с помощью данных препаратов.

Ключевые слова: *регуляторы роста, иммуноцитофит, арахидоновая кислота, тритикале, фузариоз, in vitro*.

THE INFLUENCE OF GROWTH REGULATORS ON TRITICALE CULTURE UNDER INFECTIOUS STRESS

N.V. Osokina[1], E.A. Kalashnikova[2], N.P. Karsunkina[3]
[1,2,3]Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia, e-mail: *kalash0407@mail.ru*, *natali5-13@mail.ru*

Study of fungi of the genus *Fusarium*, carried out on a global scale, but despite the enormous efforts of the scientific community, many of the problems in this area is still not resolved.

Nowadays, to combat fungal diseases of agricultural crops significant widely used chemicals. They are harmful to human and animal health. In certain concentrations, growth regulators are able to inhibit fungal growth, an alternative solution. The paper provides an analysis of the effect of growth regulators on the development of *Fusarium* triticale, to change the content of phenolic compounds in triticale seedlings *in vitro*.

The study used a species of fungi Fusarium, which most often are on our field crops: *F. culmorum*, *F. sporotrichioides*, *F. oxysporum*, and *F. avenacium*, study their correlation with the addition of the nutrient medium of different concentrations of environmentally friendly growth regulators. As the plant material was chosen for the research valuable cereal – triticale. As growth regulators were applied preparations Immunocytophite, arachidonic acid from marine algae.The reproduction of pure cultures of pathogens to obtain a sufficient amount of inoculum was carried out on hormone-free agar medium ½ Murashige and Skoog (½ MS) supplemented with growth regulators. Mushrooms were grown together with a caryopsis triticale in Petri dishes in a light room at 25°C and 16-hour photoperiod at light intensity of 3,000 lux. After 7 days there was performed accounting of biometric parameters of seedlings, morphological characteristics of mushroom mycelium and biochemical research to identify the amount of soluble phenolic compounds in seedlings.

The conducted experiments showed that at concentrations of 7.5 mg/l studied drugs exert an inhibitory effect on the development of *Fusarium*. Biochemical analysis revealed that the weevil is a synergist of drugs due to the synthesis of secondary metabolites, a protective function in intact plants. In stressful conditions, the amount of phenolic compounds increased in all variants with the presence of both the fungus and the drug exceeds the control (without fungi and regulator). Thus, growth regulators in stress concentrations in certain plants to conditions of the protective mechanisms are activated, thereby improving resistance to disease or infection. Because of this, there is a possibility of partial fight or prevent infection by *Fusarium* plants using these drugs.

Keywords: *growth regulators, arachidonic acid, triticale, Fusarium*, *in vitro*.

СОДЕРЖАНИЕ БЕЛКОВ ТЕПЛОВОГО ШОКА В ТКАНЯХ КАРТОФЕЛЯ *IN VITRO* ПРИ ТЕПЛОВОМ СТРЕССЕ И ПАТОГЕНЕЗЕ

А.И. Перфильева, Е.Г. Рихванов
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, г. Иркутск, Россия, e-mail: *alla.light@mail.ru*

При мягком температурном воздействии или тепловом стрессе, синтезируются белки теплового шока (БТШ), которые защищают клетку от гибели при более жестком тепловом шоке. Известно, что в ряде случаев БТШ индуцируются при вторжении патогенов в растения. Отсутствует информация о роли БТШ в ответной реакции картофеля на вторжение возбудителя кольцевой гнили *Clavibacter michiganensis* spp. *sepedonicus (Cms)*, а также о их содержании в тканях картофеля при гипертермии.

В настоящей работе было исследовано влияние заражения растений картофеля *Cms* и их обработки монойодацетатом натрия (МИА) на содержание в них белков теплового шока (БТШ).

Для определения влияния патогенеза на содержание БТШ, растения устойчивого (Луговского) и восприимчивого (Лукьяновского) сортов картофеля заражали *Cms* и повергали *in vitro* тепловому воздействию и измеряли количество БТШ 101, БТШ60 и БТШ17,6. Экспериментальным путем было выявлено, что максимальное содержание БТШ наблюдалось при прогревании растений при 39°С, 2 ч. Таким образом, температура 39°С является закаливающей для картофеля. Не обнаружено разницы в уровне синтеза этого белка при 26°С у исследуемых сортов. Следовательно, устойчивость с сорта Луговской к поражению *Cms* не связана с синтезом БТШ. Содержание БТШ60 не менялось во всех образцах, что логично, так как этот белок относят к группе «белков домашнего хозяйства». Тепловой стресс приводил к повышению содержания БТШ17.6 и к значительному увеличению содержания БТШ101 в тканях картофеля обоих сортов. Заражение повышало содержание БТШ101 и БТШ17.6 у картофеля восприимчивого сорта и понижало их содержание в тканях устойчивого сорта.

Для понимания роли митохондрий в процессе регуляции синтеза БТШ, исследовали влияние обработки МИА, как отдельно, так и в комбинации с гипертермией, на содержание БТШ в картофеле *in vitro*. МИА - натриевая соль йодуксусной кислоты, ингибирует триозофосфатдегидрогеназу (ключевой фермент гликолиза), соответственно, необратимо подавляет дыхание. Растения заражали *Cms,* спустя 2 суток культивирования обрабатывали МИА, далее подвергали тепловому воздействию (39°С, 2ч), после определяли содержание БТШ методом Вестерн-блоттинга. Обработка МИА снижала содержание БТШ в картофеле обоих сортов во всех вариантах обработки растений им. Вероятно, это является результатом подавления МИА функционирования митохондрий, участвующих в регуляции экспрессии БТШ.

По-видимому, в растениях при биотическом и абиотическом стрессах реализуются разнонаправленные защитные программы. Вероятно, активация экспрессии генов БТШ при тепловом стрессе, сопровождается подавлением экспрессии генов защищающих клетку при патогенезе (например, PR-белков). Поэтому, понижение синтеза БТШ у зараженных растений при тепловом стрессе, вероятно, объясняется подавлением экспрессии защитных генов картофеля, активируемых в ответ на биотический стресс.

Ключевые слова: *белки теплового шока, Clavibacter michiganensis spp. Sepedonicus, монойодацтетат натрия, стресс*

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ мол_а № 16-34-00806.

HEAT SHOCK PROTEIN CONTENT IN POTATO TISSUES *IN VITRO* UNDER HEAT STRESS AND PATHOGENESIS

A.I. Perfileva, E.G. Rikhvanov
Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, e-mail: *alla.light@mail.ru*

Under soft temperature influence (or heat shock) synthesized are heat shock proteins (HSP), which protect the cell from cell death under stronger heat shock. It is known that in a number of cases HSP is individuated in case of introduction of pathogens in plants. At the same time, there is no information in the literature on both the role of HSP in the response reaction of potato to its infecting with the ring rot pathogen *Clavibacter michiganensis* spp. *sepedonicus (Cms)* and the HSP content potato tissues under hyperthermia.

In our work, investigated was the effect of infecting potato plants *Cms* and their processing with iodide acetic sodium salt (IASS) on the content of HSP in them.

To the end of defining the influence of pathogenesis on the content of HSP, the plants of resistant (Lugovskoy) and susceptible (Lukyanovsky) potato varieties were infected with *Cms*, underwent heat shock, and the quantity of HSP 101, HSP60 and HSP17,6 was measured. It has been experimentally ascertained that the maximum content of HSP is observed in case of heating the plants at 39°C during 2 h. So, the temperature of 39°C is seen as tempering for potato plants. No difference has been revealed in the level of synthesis of this protein at 26°C for these varieties. Consequently, stability of the Lugovskoy variety to infecting with *Cms* is not bound up with synthesis of HSP. The content of HSP60 did not change in all the samples. This may be considered to be natural, no wonder that this protein has been attributed to the group of “house keeping proteins”. As it has been verified experimentally, heat stress leads to the increase in the content of HSP17.6 and to substantial increase in content of HSP101 in tissues of both varieties of potato. Infecting in our experiments induced some increase in the content of HSP101 and HSP17.6 for the susceptible Lukyanovsky variety and some decrease in the content of these proteins in tissues of resistant Lugovskoy variety.

For the purpose of understanding of the role mitochondria in the process of HSP synthesis regulation, in a series of the following experiments we investigated the influence of processing IASS (both separately and in combination with hyperthermia) on the content of HSP in potato plants *in vitro*. IASS specifically inhibits of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (the key enzyme of glycolysis), therefore, sodium salt irreversibly suppresses cellular respiration. The plants were infected with *Cms*; after 2 days (48 h) of cultivating, these were processed with IASS; nest, the plants underwent heat shock (39°C, 2 h). After all these processes, the content of HSP was determined by the Western-Blotting method. Processing with IASS provoked a decrease in the content of HSP in potato tissues of both the varieties indicated under all the variants of processing the plants with IASS. Probably, this is a result of suppressing the functioning of mitochondria (participating in regulation of expression of the genes encoding HSP) with IASS.

Probably, there are differently directed protective programs realized in plants under biotic and abiotic stresses. It may be supposed that HSP gene expression activation under heat stress is normally accompanied by suppression of expression of the genes protecting the cell under pathogenesis (e.g. pathogenesis proteins). So, decrease in the synthesis of HSP in infected plants under heat stress may be explained via the hypothesis stating that increase in the temperature suppresses expression of protective potato genes activated in response to biological stress.

Keywords: heat shock proteins, *Clavibacter michiganensis* spp. *sepedonicus,* iodide acetic sodium salt, stress.

Aknowlegment
The work has been conducted with the support of Russian Foundation for Basic Research, Grant mol_a No. 16-34-00806.

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА ЭПИН ЭКСТРА НА ПРОРАСТАНИЕ СЕМЯН КУКУРУЗЫ НА ФОНЕ ДЕЙСТВИЯ СУЛЬФАТА МЕДИ

Г.В. Решетник, М.П. Леонов, С.И. Чмелева
Таврическая академия Федерального государственного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И.Вернадского», г. Симферополь, Республика Крым, Россия, e-mail: *gvresh@ukr.net*

В настоящее время одной из проблем сельскохозяйственного производства является обеспечение высокой продуктивности и устойчивости растений к абиотическим и биотическим факторам. Одним из абиотических факторов, который оказывает негативное влияние на сельскохозяйственные растения, являются тяжелые металлы. Тяжелые металлы не разлагаются и уровень их содержания в среде со временем возрастает.

Медь – элемент, вовлеченный во множество физиолого - биохимических процессов в живых организмах. Диапазон концентраций меди, обеспечивающий оптимальный клеточный метаболизм и развитие растений, узок. Высокие концентрации меди вызывают хлорозы и некрозы, ингибирование роста корней и побегов, иногда наблюдается летальный эффект.

Одним из возможных путей снижения токсического действия тяжелых металлов в растении может быть предпосевная обработка семян регуляторами роста. Большинство современных регуляторов имеют искусственное происхождение и не разрушаются ферментными системами растений. Среди них особого внимания заслуживает препарат Эпин экстра - препарат нового поколения, обладает адаптогенными и антистрессовыми свойствами, снижает в растении количество токсинов, тяжелых металлов, радионуклеидов, стимулирует биохимические процессы в клетке.

Целью наших исследований явилось изучение влияния препарата Эпин экстра на прорастание семян и морфометрические показатели проростков кукурузы сорта Кладио на фоне действия сульфата меди.

С целью изучения влияния препарата Эпин экстра на прорастание семян и рост проростков кукурузы (*Zea mays* L.) сорта Кладио на фоне действия сульфата меди, семена предварительно замачивали в растворах различной концентрации препарата. Семена, замоченные в водопроводной отстоянной воде, служили контролем. Затем обработанные семена высаживали в кюветы с растворами сульфата меди следующих концентраций: 25 мМ, 50мМ, и 100мМ. Энергию прорастания и всхожесть определяли согласно ГОСТу (12038-84). 4-ёх дневные проростки кукурудзы проращивали на водной культуре (½ среды Кнопа) с добавлением меди. Морфометрические показатели (линейные размеры корневой системы и надземной части, массу сырого и сухого вещества) изучали у 7-14-ти дневных растений.

В результате проведенных исследований была установлена оптимальная концентрация препарата (0,075%) для предпосевной обработки семян кукурузы, экспозиция замачивания – 24 часа, энергия прорастания и лабораторная всхожесть повысились на 10-13% соответственно. Наблюдался стимулирующий эффект предпосевной обработки препаратом на ростовые параметры проростков кукурузы, массу сырого и сухого вещества надземной части и корней на фоне действия сульфата меди.

Таким образом, установлено улучшение посевных качеств семян и морфометрических характеристик проростков кукурузы сорта Кладио при проведении предварительного замачивания семян в растворе Эпин экстра.

Ключевые слова: *эпин экстра, тяжелые металлы, проростки кукурузы, ростовые параметры*

INFLUENCE OF EPIN EXTRA PREPARATION ON MAIZE SEED GERMINATION UNDER COPPER SULFATE EFFECT

G.V. Reshetnik, M.P. Leonov, S.I. Chmeleva
Taurida Academy of Federal state educational institution of the higher education
«V.I. Vernadsky Crimean Federal University», Simferipol, Republic of Crimea, Russia,
e-mail: *gvresh@ukr.net*

Nowadays one of the problem of agricultural industry is providing high productivity and plants resistance to the abiotic and biotic factors. One of the abiotic factors which exerts negative influence on the agricultural plants is the factor of heavy metals . Heavy metals don't mould and the rate of their containing circumstances is growing with the lapse of time. The copper is the element that is involved into the numerous physiological and biochemical processes in living organisms. The range of concentrations of copper that is providing the optimal biodyne and the development of plants is narrow. High concentrations of copper lead to the chlorosis and necrosis, inhibition of roots and shoots, sometimes the lethal phenomenon may be observed.

One of the eventual options to reduce the toxic effects of the heavy metals in the plant can be the seed treatment by the growth regulators. The most of modern regulators are of synthetic origin and they are not being ruined by the enzymatic systems of plants. Among them the Epin extra preparation deserves particular notice - the preparation of the new generation , has adaptogenic and antistress properties, reduses the number of toxins, heavy metals, radionuclides in the plant, stimulates the biochemical processes in the cellular. The aim of our investigations is the research the Epin extra preparation effects on the germination of seeds and the growth of the *Zea mays* L. corn-plantlings in combination with copper-sulfate.

For the purpose of research the Epin Extra preparation effects on the germination of seeds and the growth of the *Zea mays* L. corn-plantlings in combination with copper-sulfate the grains were soaking previously in the different concentrations of the preparation's solutions. The seeds that were soaked in the settled tap water were used as the control. Then the treated grains were set into the pans with the solutions of the copper sulfate with the next concentrations: 25 mM, 50 mM and 100 mM. The energy of the germination was identified in accordance with the GOST (State Standard) (12038-84). 4-days *Zea mays* L. corn-plantlings were germinated with the solution culture (½ Knop medium) by the adding in it the copper. The morphometric factors (the linear dimensions of the root system and the top, the wet weight and the dry weight) were explored at the 7-14-days plants.

In the issue of the investigations that were made the optimal concentration of the preparation has been determined (0.075%) for the pre-planting cultivation of the corn seeds, the exposition of soaking- 24 hours, the energy of the germination and the laboratory germinating ability increased for 10-13% thereof. The stimulating effect of the pre-planting cultivation by the preparation on the growth factors of the corn-germinants in combination with the copper-sulfate was observed.

This way the improving of the cultivated quality of the seeds and the morphometric specifications of the *Zea mays* L. corn-plantlings with the pre-soaking of them in the Epin extra solution was determined.

Keywords: *Epin extra, heavy metals, maize sprouts, growth parameters*

ВЛИЯНИЕ АБИОТИЧЕСКИХ СТРЕСС-ФАКТОРОВ (ЗАСУХА, ЗАСОЛЕНИЕ) НА ФОТОСИНТЕЗ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ПШЕНИЦЫ *IN VIVO* И *IN VITRO*

Н.В. Терлецкая[1], Н.В. Зобова[2], В.Ю. Ступко[2], А.Б. Искакова[1], О.Е. Ларионова[2]
[1]Институт биологии и биотехнологии растений Комитета науки Министерства образования и науки республики Казахстан, г. Алматы, Казахстан,
e-mail: *teni02@mail.ru*
[2]ГНУ Красноярский НИИ сельского хозяйства Россельхозакадемии, г. Красноярск, Россия, e-mail: *zobovanat@mail.ru*

Выявлены как общие неспецифические, так и разнообразные видоспецифические реакции, регулирующие стабильность фотосинтетической активности различных видов пшеницы в условиях засухи и солевого стресса *in vivo* и *in vitro*.
Показано, что проростки таких видов, как *T. dicoccum* Shuebl., *T. compactum* Host., *T. aestivum* L. в стрессовых условиях наиболее стабильно поддерживали рост листовых пластинок. Стабильное соотношения хлорофилла a/b, вне зависимости от изменений общего содержания хлорофилла у различных видов пшеницы в условиях засухи и засоления, позволило предположить, что рассматриваемые стрессы не вызвали значимых структурных изменений в работе фотосинтетического аппарата проростков. Исследования фотосинтетического CO_2 газообмена показали значительное снижение показателя у всех изученных видов пшеницы при солевом стрессе. В условиях засухи только у вида *T. dicoccum* газообмен оставался практически неизменным по отношению к контрольным условиям. Транспирация листьев, соотнесенная к содержанию хлорофилла (*a*+*b*), в условиях индуцированной засухи у видов *T. aestivum* и у *T. dicoccum* возрастала, а у остальных изучаемых видов изменения варьировали. При солевом стрессе транспирация значительно снижалась у всех изучаемых видов, кроме *T. aestivum*. У всех изучаемых видов отмечено изменение скорости транспорта электронов через фотосистему II (ФСII) под действием стрессоров. В условиях индуцированной засухи наименьшее снижение фотосинтетической активности (ФА) продемонстрировали образцы *T. aethiopicum* Jakubz. и *T. monococcum* L. Наиболее устойчивыми к солевому стрессу были виды *T. aethiopicum, T. dicoccum, T. compactum*. Вызывает интерес образец *T. polonicum* L., который, несмотря на снижение ФА, свидетельствующее о нарушениях в работе фотосистемы II (ФСII) в условиях засухи, увеличивал эффективность нефотохимического тушения флуоресценции. Данная особенность, возможно, свидетельствует о динамической засухоустойчивости данного образца.

Выявлены видоспецифические отличия развития процессов морфогенеза *in vitro* в стрессовых условиях. Показано, что воздействие стрессовых факторов на каллусные ткани выражалось в снижении ростовых параметров, подавлении развития фотосинтетического аппарата в каллусных клетках и снижении, как следствие, их ФА. Получены данные, свидетельствующие о нарушениях в работе ФСII каллусных тканей в условиях засоления и засухи. Но показано, что работающая, пусть с нарушениями, ФСII, у отдельных форм все-таки дает возможность получения в стрессовых условиях *in vitro* фотосинтезирующей каллусной ткани, а значит – возможность регенерации жизнеспособных растений. Отмечено, что виды *T. macha* Dek. et. Men., *T. dicoccum* и *T. aestivum* показали наибольшую стабильность фотосинтетического аппарата в стрессовых условиях *in vitro*.

Ключевые слова: *пшеница, виды, проростки, каллусы, засуха, солевой стресс, фотосинтез*

INFLUENCE OF ABIOTIC STRESS FACTORS (DROUGHT, SALINITY) ON PHOTOSYNTHESIS IN DIFFERENT WHEAT SPECIES *IN VIVO* AND *IN VITRO*

N.N. Terletskaya[1], N.V. Zobova[2], V.Yu. Stupko[2], A.B. Iskakova[1], O.Ye. Larionova[2]
[1] Institute of Plant Biology and Biotechnology Scientific Committee of the Ministry of Education and Science of the Republic Kazakhstan, Almaty, Kazakhstan,
e-mail: *teni02@mail.ru*
[2]GNU Krasnoyarsk Research Institute of Agriculture of the Russian Agricultural Academy, Krasnoyarsk, Russia, e-mail: *zobovanat@mail.ru*

It was identified as a general non-specific and species-specific variety of reactions governing stability photosynthetic activity of various types of wheat under drought and salt stress *in vivo* and *in vitro*.

It was showed that the seedlings species such as *T. dicoccum* Shuebl., *T. compactum* Host., *T. aestivum* L. most stressful conditions stably support the growth of leaf blades. Stable ratio chlorophyll a/b, regardless of the total chlorophyll content changes in different species of wheat under drought and salinity, suggesting that the subject did not stress caused significant structural changes in photosynthetic apparatus of seedling. Research photosynthetic CO_2 gas exchange showed a significant reduction of this index in all studied species of wheat under salt stress. Under drought conditions the gas exchange remained virtually unchanged relative to the control conditions only a species *T. dicoccum*. The leaf transpiration, correlated to the content of chlorophyll (a + b), under drought conditions in species *T. aestivum* and *T. dicoccum* were increased, and in the rest of the studied species was varied. Under salt stress the transpiration decreased significantly in all species studied except *T. aestivum*. In all studied species was marked change in transport speed of electrons through the photosystem II (PSII) under the influence of stressors. In drought conditions, the smallest decline in photosynthetic activity (FA) showed samples of *T. aethiopicum* Jakubz. and *T. monococcum* L. The most resistant to salt stress were visible *T. aethiopicum*, *T. dicoccum*, *T. compactum*. Causes interest the sample *T. polonicum* L., who, despite a decline in the FA, indicating irregularities in the photosystem II (PSII) in drought conditions, increased the efficiency of non-photochemical quenching of fluorescence. This feature may be indicative of the dynamic stability of the sample.

The species-specific differences between the development of processes *in vitro* morphogenesis in a stressful environment were identified. It has been shown that exposure to stress factors expressed in reducing calluses growth parameters, suppression of the photosynthetic apparatus in the callus cells and decrease as a consequence of their FA. Data were obtained indicating irregularities in the work of PSII under salinity and drought. Data were obtained reveal a violation of the PSII in calluses under salinity and drought. However, it is shown that working with violations PSII still gives the possibility of obtaining in the stressful conditions in vitro photosynthetic callus tissue, and thus - the possibility of regeneration of viable plants in individual forms. It was noted that the species *T. masha* Dek. et. Men., *T. dicoccum* and *T. aestivum* showed the greatest stability of the photosynthetic apparatus in stressful conditions *in vitro*.

Keywords: *wheat, species seedlings, calluses, drought, salt stress, photosynthesis*

ЭНДОГЕННЫЕ СТИМУЛЯТОРЫ, ПОВЫШАЮЩИЕ ЭФФЕКТИВНОСТЬ РИЗОГЕНЕЗА В УСЛОВИЯХ ВОДНОГО ДЕФИЦИТА

О.И. Трофимова, И.А. Ларская, Т.А. Горшкова
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук, г. Казань, Россия,
e-mail: *pzl@mail.ru*

Морфология растений подвержена значительному влиянию окружающей среды. Рост и развитие корневой системы является превосходной моделью пластичности развития, поскольку одной из адаптивных стратегией в изменившихся условиях водоснабжения является увеличение длины корней, их количества и разветвленности

Исследование процесса корнеобразования в условиях водного дефицита (ПЭГ 6000) проводили на эксплантах, полученных из первичного корня проростков кукурузы. Количество корней на среде MS/2 в отсутствии гормонов было незначительным и увеличивалось при добавлении 3 мкМ ИУК. При концентрации 20% ПЭГ и выше наблюдалось снижение количества корней на эксплантах. Однако умеренный водный дефицит (концентрация ПЭГ 5-10%) не только не ингибировал, но, наоборот, стимулировал корнеобразование.

Новообразование латеральных корней в изменившихся условиях, как способ приспособления растений, возможен благодаря активации определенной группы клеток, потенциально способных к реализации дальнейшей программы развития. Однако вопрос о механизмах и направлении дифференцировки таких клеток все еще остается открытым. В этом контексте, большой интерес представляет идентифицированный нами биологически активный олигосахарид - новая эндогенная сигнальная молекула углеводной природы, которая как было показано ранее, вовлечена в инициацию боковых корней в стационарных условиях. В условиях умеренного водного дефицита (диапазон концентраций ПЭГ от 5 до 10%) олигосахарин, внесенный в среду культивирования эксплантов в концентрации 5 мкг/мл, вызывал дополнительное увеличение количества корней. При других концентрациях ПЭГ подобного эффекта не было отмечено.

Таким образом, очевидно, что поскольку одним из способов повышения засухоустойчивости может быть усиление их водообеспечения вследствие более развитой корневой системы, то расшифровка механизма действия олигосахарина на процесс корнеобразования в условиях умеренного водного дефицита поможет выявить регуляторные пути и лимитирующие стадии формирования корневой системы, что является многообещающим подходом для получения более устойчивых сортов.

Ключевые слова: *засухоустойчивость, ризогенез, экспланты, олигосахарины*

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (грант 14-04-01591).

ENDOGENOUS STIMULANTS INCREASING THE EFFICIENCY OF ROOT FORMATION IN THE CONDITIONS OF WATER DEFICIT

O.I. Trofimova, I.A. Larskaya, T.A. Gorshkova
Federal State Institution of Science Institute of Biochemistry and Biophysics, Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Kazan, Russia, e-mail: *pzl@mail.ru*

The morphology of plant is subjected to significant influence of the environment. Growth and development of the root system are an excellent model of development plasticity. So one of the adaptive strategies in the changed water conditions is to increase the length of roots, their number and branching

The research of the rooting process in water deficit conditions (PEG 6000) was performed on the explants derived from the primary root maize seedlings. The number of roots on MS/2 medium in the absence of hormone was low and increased with the addition of 3 μM of IAA. At the concentration of 20% PEG or higher reduction in the number of roots on the explants was observed. However, moderate water deficit (concentration of PEG 5-10%) not only inhibited, but, on the contrary, stimulated root formation.

New formation of lateral roots in the changed conditions, as a method of adaptation of plants, is possible thanks to the activation of a specific group of cells that can potentially realize further development programs. However, the problem of mechanisms and direction of differentiation of such cells is still open. In this context, bioactive oligosaccharin identified by us is great interest. It is a new endogenous signaling molecule of carbohydrate nature which has been previously shown to be involved in lateral root initiation in stationary conditions. In conditions of moderate water deficit (PEG concentration range from 5 to 10%) oligosaccharin added to explants culture at a concentration of 5 μg/ml caused an additional increase in the number of roots.

Thus, it is obvious that as one way of improving drought tolerance may be strengthening their water supply as a result of a more developed root system, then decoding of oligosaccharin mechanism of action in the process of root formation in water deficit will help to identify regulatory pathways and limiting stages of formation of the root system, which is a promising approach for more resistant varieties.

Keywords: *drought tolerance, root formation, explants, oligosaccharin*

Aknowlegment
This work was partially supported by RFBR (grant 14-04-01591).

ВЛИЯНИЕ 24-ЭПИБРАССИНОЛИДА НА СОСТАВ СЛОЖНЫХ ОКСИЛИПИНОВ ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С МИКРООРГАНИЗМАМИ

Е.О. Федина, А.Ю. Ярин., А.С. Блуфард, И.Р. Чечёткин, А.Н. Гречкин
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук, г. Казань, Россия, e-mail: *solo_nika@mail.ru*

В процессе совместной эволюции растений и окружающих их микробов на растительных мембранах выработались механизмы распознавания чужеродных организмов, запуска сигнальных систем, оповещающих растение об их присутствии, а также индукции синтеза антипатогенных метаболитов. Активация окислительной части метаболизма мембранных липидов приводит к образованию оксилипинов и является одной из защитных стратегий растений при инфицировании патогенами. Ранее в нашей лаборатории была обнаружена новая группа сложных оксилипинов льна – линолипины, у которых было установлено строение, исследованы пути их биосинтеза и катаболизма. Было показано, что линолипины являются запасной формой соединений, обладающих антибактериальной активностью.

В настоящее время недостаточно изучен вопрос гормональной регуляции биосинтеза оксилипинов, являющихся компонентами иммунитета растений. Известно, что фитогормоны стероидной природы повышают устойчивость растений к фитопатогенам, что позволяет активно использовать их в выращивании сельскохозяйственных культур. В литературе отсутствуют сведения о влиянии брассиностероидов на метаболизм оксилипинов при инфицировании растений бактериями.

В настоящей работе изучалось влияние стероидного фитогормона 24-эпибрассинолида (ЭПБ) на профили сложных оксилипинов (линолипинов) при инфицировании растений льна бактерией *Pectobacterium atrosepticum*. На основании полученных данных делается вывод о регуляторной роли стероидных фитогормонов в метаболизме сложных оксилипинов при патогенезе растений.

Ключевые слова: *иммунитет растений, сложные галактолипиды, брассиностероиды, линолипины, Pectobacterium atrosepticum, Linum usitatissimum*

Работа поддержана грантом РФФИ №16-04-01553.

24-EPIBRASSINOLIDE EFFECT ON THE COMPLEX OXYLIPINS IN THE MICROORGANISM INTERACTION

E.O. Fedina, A.Yu. Yarin, A.S. Blufard, I.R. Chechetkin, A.N. Grechkin
Federal State Institution of Science Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Kazan, Russia, e-mail: *solo_nika@mail.ru*

In the process of co-evolution of plants and microbes, plants have evolved the mechanisms of the recognition of alien organisms and triggering the signaling systems that inform the plant about pathogen presence, as well as induction of synthesis of antipathogenic metabolites on their membranes.

The activation of oxidative metabolism of membrane lipids leads to the oxylipin formation that is one of the defensive strategies of plants upon infection by pathogens. Previously we have found a new family of complex oxylipins in flax, namely linolipins. The structure as well as biosynthetic and catabolic pathways of linolipins have been studied. Linolipins were shown to present a storage form of compounds possessing antibacterial activity.

There are scarce data on hormonal regulation of the biosynthesis of oxylipins, which are components of plant immunity. Plant steroid hormones are known to increase the resistance of plants to plant pathogens and so widely used in cultivation of crops. There are no data about brassinosteroid effect on the oxylipin metabolism during plant pathogenesis in the current literature.

In the present work, we studied the effect of steroid phytohormone 24-epibrassinolide (EBR) on the profiles of complex oxylipins (linolipins) in flax plants infected by *Pectobacterium atrosepticum*. Based on the data obtained, we propose the regulatory role of steroid hormone in the metabolism of complex oxylipins during plant pathogenesis.

Keywords: *plant immunity, complex galactolipids, brassinosteroids, linolipins, Pectobacterium atrosepticum*, *Linum usitatissimum*

Aknowlegment
This work was supported by RFBR grant No.16-04-01553.

ПОВЫШЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ КУКУРУЗЫ (*ZEA MAYS* L.) К ОСМОТИЧЕСКОМУ СТРЕССУ ПОД ДЕЙСТВИЕМ СИНТЕТИЧЕСКИХ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА

С.И. Чмелёва, Е.Н. Кучер, В.В. Белоусов, Н.А. Собчук
Федеральное государственное автономное учреждение высшего образования «КФУ имени В.И. Вернадского», Таврическая академия (структурное подразделение), факультет биологии и химии, кафедра ботаники и физиологии растений и биотехнологий,КФУ имени В.И. Вернадского, г. Симферополь, Республика Крым, Россия, e-mail: *chmeleva-s@mail.ru*

В настоящее время в условиях Республики Крым в связи с изменением климатических условий, а также с возрастающим антропогенным воздействием, актуальной является проблема устойчивости культурных растений к различным неблагоприятным факторам внешней среды. Неблагоприятные факторы внешней среды вызывают у растений ряд изменений, которые проявляются на различных уровнях – от молекулярного до организменного, и отражаются на продуктивности.

Кукуруза (*Zea mays* L.) уже на протяжении многих тысячелетий играет важную роль в хозяйстве человека, она относится к культурам, требовательным к водному режиму.

Одним из наиболее эффективных путей защиты культурных растений от последствий недостаточного водообеспечения является усиление естественной засухоустойчивости. Наряду с выведением новых сортов растений, велика роль использования в сельском хозяйстве биопрепаратов – усилителей засухоустойчивости.

Современные полифункциональные регуляторы роста способны одновременно стимулировать рост, развитие и физиологические процессы растений, а также повышать их способность адаптироваться к неблагоприятным факторам среды.

К перспективным в использовании и экологически безопасным комплексным препаратам относятся Циркон и Вымпел.Действующим веществом препарата Циркон является смесь гидроксикоричных кислот (ГКК), а именно, кофейные кислоты и хлорогеновые кислоты, получаемые из растительного сырья эхинацеи пурпурной. В состав препарата Вымпел входят соли гуминовых кислот.

С целью изучения влияния синтетических регуляторов роста Циркон и Вымпел на повышение устойчивости растений кукурузы к осмотическому стрессу, вызванного недостаточным водообеспечением, нами было проведено исследование воздействия различных концентраций препаратов на семена и растения кукурузы (*Zea mays* L., CV/TAP 349). Применяли предпосевную обработку семян в течение 6 часов 0,25; 0,5; 1,0; 2,5 и 5,0 %-ными растворами препарата. В качестве морфометрических показателей исследовались: высота растений, длина корней, площадь листовой пластинки, масса сырого и сухого вещества у 8-, 15- и 22-дневных растений, выращенных в вегетационных сосудах емкостью 2 кг, при естественном освещении. Растения выращивали в лабораторных условиях при температуре от +22 до +24°С в течение 3 недель при двух уровнях влажности почвы: оптимального – 70% от полной полевой влагоемкости (ППВ) и засушливого – 30-35% от ППВ.

При изучении влияния регуляторов роста установлено, что оба препарата повышают устойчивость кукурузы к осмотическому стрессу, при этом возрастает всхожесть семян и увеличиваются значения морфометрических параметров растений. Данный эффект зависит от концентрации действующих веществ и сохраняется на протяжении всего эксперимента.

Наилучшие результаты были получены нами при обработке семян раствором препарата Циркон в концентрации 2,5%. При обработке Вымпелом в условиях недостаточного водообеспечения можно рекомендовать использовать более низкую дозу препарата – 1,0%-ную. Такая доза препарата позволяет получить проростки кукурузы, опережающие по вегетативному развитию растения, выращиваемые в условиях водного дефицита.

Ключевые слова: *регуляторы роста, Циркон, Вымпел, осмотический стресс, кукуруза*

IMPROVING OSMOTIC STRESS RESISTANCE OF MAIZE (*ZEA MAYS* L.) UNDER SYNTHETIC GROWTH REGULATORS

S.I. Chmeleva, E.N.Kucher, V.V. Belousov, N.A. Sobchuk
Federal state autonomous institution of higher education "Crimean Federal V.I. VernadskyUniversity", Taurida Academy (structural subdivision), Faculty of Biology and Chemistry, Department of Botany and Plant Physiology and Biotechnology, Crimean Federal V. I.VernadskyUniversity, Simferopol, Republic of Crimea, Russia,
e-mail: *chmeleva-s@mail.ru*

Currently, there is a very urgent problem of resistance of cultivated plants to adverse environmental factors in the Republic of Crimea, in connection with the change of climatic conditions, as well as of increase of anthropogenic pressure. Adverse environmental factors cause a number of changes in plants that occur at various levels – from molecular to organismal, and they are reflected in the productivity.

Maize (*Zea mays* L.) has been playing an important role in human economy for thousands of years, it belongs to cultures, demanding special water regime.

One of the most effective ways to protect maize plants from the effects of inadequate water supply is to enhance the natural drought resistance. Along with the breeding of new varieties of plants, the use of agricultural biological products – drought resistance amplifiers – plays an important role in agriculture.

Modern multifunctional growth regulators are able to simultaneously stimulate the growth, development and physiological processes of plants, as well as to increase their ability to adapt to adverse environmental factors.

Zircon and Vympel are promising and environmentally friendly complex drugs to use for this purpose. The active ingredient of the drug Zircon is a mixture of hydroxycinnamic acids (HCA), namely, caffeic acid and chlorogenic acid, extracted from vegetable raw materials of Echinacea purpurea. The composition of the drug Vympel includes salts of humic acids.

To study the influence of synthetic growth regulators Zircon and Vympelon improving the sustainability of maize plants to osmotic stress caused by inadequate water supply, we investigated the effects of different concentrations of drugs on seeds and plants of maize (*Zea mays* L., CV / TAR 349). We used pre-sowing treatment of seeds for 6 hours with 0.25; 0.5; 10; 2.5 and 5.0% solution of the drug. As for morphometric parameters we examined: plant height, root length, leaf area, weight of wet and dry substances in 8-, 15- and 22-day-old plants grown in pots of 2 kg, at natural light. Plants were grown in the laboratory at temperatures from +22 to + 24°C for 3 weeks at two levels of soil moisture content: optimum – 70% of the full field water capacity, and dry – 30–35% of the full field water capacity.

In the course of our study of the influence of growth regulators,we found that both drugs increase the resistance of maize to osmotic stress,they increase germination of seeds and the value of morphometric parameters of the plants. This effect depends on the concentration of active ingredients and is maintained throughout the experiment.

The best results for seed treatment were obtained with 2.5% solutionof Zircon. When treating the seeds with Vympel in insufficient water supplyconditions, we recommendto usea lower dose – 1.0%. This dose allows you to get maize seedlings that are ahead for the vegetative development of plants grown under conditions of water scarcity.

Keywords: *growth regulators, Zircon, Vympel, osmotic stress, maize*

КАЧЕСТВЕННЫЕ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРОТЕОМА *TRITICUM AESTIVUM* И *SOLANUM TUBEROSUM* ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ИНДУКТОРОВ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ

Л.Г. Яруллина[1,2], Р.И. Касимова[1], Л.М. Яруллина[2], Р.И. Ибрагимов[2], И.В. Максимов[1]
[1]Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, г. Уфа, Россия,
e-mail: *yarullina@bk.ru*
[2]Башкирский государственный университет, Уфа, Россия,
e-mail: *ibragimov56@yandex.ru*

В последнее время все большее внимание исследователей уделяется изучению индукторов устойчивости растений как экологически безопасных препаратов для защиты растений от заболеваний различной природы. Сигнальными молекулами, механизм защитного действия которых связан с индукцией генерации АФК в растительных тканях, являются салициловая (СК) и жасмоновая (ЖК) кислоты. Большое значение в сигнальной регуляции устойчивости растений к патогенам отводят также непатогенным ризобактериям, регулирующим рост растений. Большинство из них запускают каскад защитных реакций в растительных тканях за счет выработки различных метаболитов, в частности липопептидов (ЛП), индуцируя ISR. В последние десятилетия активно изучаются функции оксилипинов (ОЛ) – биологически активных молекул, образующихся в ходе окисления полиненасыщенных жирных кислот. Однако механизмы активации экспрессии генов продуктами метаболизма C_{18}-жирных кислот в растительных клетках к настоящему времени известны лишь в общих чертах.

Объектом исследования служили отрезки листьев пшеницы сорта Жница, выращенные из семян предобработанных растворами СК 10^{-5} М и ЖК 10^{-7} М и инфицированные возбудителем септориоза *Septoria nodorum*, и диски из клубней картофеля сорта Леони, обработанные растворами ЖК 10^{-7} М, ОЛ 20 мг/мл и ЛП *Bacillus subtilis* 10 мг/мл и инфицированные возбудителем фитофтороза *Phytophthora infestans*. Белки выделяли методом фенольной экстракции. Разделение по изоэлектрической точке проводили на 7-сантиметровых стрипах pH 3-10. В наших исследованиях обнаружено, что обработка семян СК и ЖК снижает степень развития гемибиотрофа *S. nodorum* на листьях пшеницы и оказывает стимулирующее действие на продукцию H_2O_2 в зоне инфицирования. Двумерный электрофорез растворимых белков инфицированных листьев выявил как сходство, так и различия изменений протеомов под воздействием СК и ЖК. Можно предположить, что формирование защитного ответа в растениях пшеницы к *S. nodorum* под воздействием СК и ЖК обусловлено генерацией H_2O_2 и модуляцией экспрессии защитных белков. Обработка ЖК, ОЛ, бактериальными ЛП снижала степень развития возбудителя фитофтороза *Phytophthora infestans* на дисках картофеля, вызывала повышение в них концентрации перекиси водорода и изменения в суммарном спектре растворимых белков в диапазоне pH 6-7 и 7.5-8.7. Были выявлены различия в дифференциальной экспрессии 39 полипептидов под воздействием сигнальных молекул и инфицирования патогеном. Причем, максимальный защитный эффект от инфицирования клубней картофеля возбудителем фитофтороза был обусловлен индукцией в тканях защитных белков с Мм/pI 24/5.8; 75/6.45; 68/6.45; 19/6.5; 69/6.3 под воздействием ЖК.

Таким образом, наличие качественных и количественных изменений в экспрессии индивидуальных белков свидетельствует о дифференциальном механизме воздействия сигнальных молекул на защитный потенциал растительных клеток.

Ключевые слова: *протеомные исследования, Solanum tuberosum, Triticum aestivum, сигнальные молекулы, устойчивость растений*

QUALITATIVE AND QUANTITATIVE CHANGES IN *TRITISUM AESTIVUM* AND *SOLANUM TUBEROSUM* PROTEOME UNDER THE INFLUENCE OF PLANT RESISTANCE INDUCTORS

L.G. Yarullina[1,2], R.I. Kasimova[1], L.M. Yarullina[2], R.I. Ibragimov[2], I.V. Maksimov[1]
[1]Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia, e-mai:l *yarullina@bk.ru*
[2]Bashkir State University, Ufa, Russia, e-mail: *ibragimov56@yandex.ru*

In recent years, increasing attention is given to studying plant resistance inducers as an environmentally safe plant protection inductors against diseases of different nature. Signaling molecules, the mechanism of the protective effect of which is associated with the induction of ROS generation in the plant tissues are salicylic (SA) and jasmonic (JA) acid. Of great importance in the regulation of signal plant resistance to pathogens and nonpathogenic plant growth regulating rhizobacteria. Most of them trigger a cascade of defense responses in the plant tissues due to generation of different metabolites, including lipopeptides (LP) to induce ISR. In the last decades of active research function oxylipins (OL) – biologically active molecules produced during the oxidation of polyunsaturated fatty acids. However, activation mechanisms of gene expression products of the metabolism C_{18}-fatty acids in plant cells are known to date only in general terms.

The object of the study were leaf segments of wheat Zhnitsa variety grown from seed pretreated by solutions SA 10^{-5} M and JA 10^{-7} M and infected by *Septoria nodorum*, and the wheels of the potato tubers Leoni variety treated with solutions of JA 10^{-7} M, OL 20 mg/ml and LP 10 mg/ml of *Bacillus subtilis* and infected by *Phytophthora infestans*. Proteins isolated by phenol extraction. Separation was carried out on the isoelectric point of 7-cm strips pH 3-10. In our study we found that the treatment of seeds by SA and JA reduces the development of *S. nodorum* on wheat leaves and stimulates the production of H_2O_2 in the infection zone. Two-dimensional electrophoresis of soluble proteins of infected leaves revealed both similarities and differences proteomes changes under the influence of SA and JA. It can be assumed that the formation of a protective response in plants *S. nodorum* in wheat under the influence due to SA and JA H_2O_2 generation and modulation of expression of protective proteins. Processing JA, OL and bacterial LP reduced degree of infection by *Phytophthora infestans* on potato discs, which caused an increase in hydrogen peroxide concentration and the changes in the spectrum of total soluble proteins in the range of pH 6-7 and 7.5-8.7. Differences were detected in 39 of differential expression of polypeptides under the influence of signaling molecules and pathogen infection. Moreover, the maximum protective effect of potato tuber late blight pathogen infection was due to the induction of protective proteins in tissues with Mm/pI of 24/5.8; 75/6.45; 68/6.45; 19/6.5; 69/6.3 under the influence of the JA.

Thus, the presence of qualitative and quantitative changes in protein expression in the individual indicates the differential mechanism of action of signaling molecules on the protective potential of plant cells.

Keywords: *proteomics studies, Solanum tuberosum, Triticum aestivum, signaling molecules, the resistance of plants*

СЕКЦИЯ 7.
SESSION 7.

РЕПРОДУКТИВНАЯ БИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ В СОХРАНЕНИИ БИОРАЗНООБРАЗИЯ

PLANT REPRODUCTIVE BIOLOGY IN BIODIVERSITY CONSERVATION

ПОЛИЭМБРИОНИЯ *IN VIVO* И *IN VITRO* У АПОМИКТИЧНОЙ ЛИНИИ КУКУРУЗЫ АТ-1

Т.А. Алаторцева, Н.В. Апанасова
Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, г. Саратов, Россия, e-mail: *alatortsevata@mail.ru*; *apanasova.natasha@mail.ru*

Полиэмбриония – широко распространенное явление среди покрытосеменных растений. Исследование этого процесса имеет прикладное значение, так как открывает перспективы для производства чистых линий, гаплоидных и гомозиготных форм. Однако использовать в полной мере потенциал полиэмбрионии в селекционно-генетической работе не позволяет недостаточная изученность механизмов её индукции.

Высокая частота встречаемости семян с несколькими зародышами характерна для апомиктичных видов, что связано с созданием цитоэмбриологических предпосылок к полиэмбрионии в ходе развития женских генеративных структур. К их числу относится формирование нескольких зародышевых мешков в одном семязачатке, нескольких яйцеклеток в одном мегагаметофите (полигаметия), яйцеклеткоподобных синергид или антипод (апогаметия).

У половых видов полиэмбриония – явление достаточно редкое, но культивирование *in vitro* семязачатков и завязей может провоцировать развитие зародышей из разных элементов мегагаметофита.

Целью проведенного нами исследования был сравнительный анализ частоты и путей формирования полиэмбрионов у партеногенетической линии кукурузы АТ-1 *in vivo* и *in vitro* в культуре неопыленных завязей.

Было установлено, что неоплодотворенные зародышевые мешки *in vivo* и на 7 сутки культивирования на искусственной питательной среде характеризовались одинаковым спектром цитоэмбриологических предпосылок к полиэмбрионии. Наблюдалось образование дополнительных яйцеклеток и яйцеклеткоподобных синергид. Частота формирования многозародышевых семян (*in vivo*) в среднем составила 1,5% и достоверно не отличалась от частоты развития неопыленных завязей с несколькими проэмбрио в культуре *in vitro* (1,0%). Темпоральный цитоэмбриологический анализ культивируемых завязей показал, что дополнительные зародыши образуются как при индукции к партеногенезу дополнительных яйцеклеток, так и вследствие нетипичного продольного деления яйцеклетки с последующим независимым развитием в зародыши дочерних клеток. Формирования зародышей из яйцеклеткоподобных синергид не наблюдали.

Аналогия процессов, приводящих к полиэмбрионии в условиях *in vivo* и *in vitro*, позволяет использовать культуру неопыленных завязей партеногенетических линий кукурузы в качестве модельной системы для изучения механизмов индукции развития многозародышевых семян. Использование для изучения полиэмбрионии методов *in vitro* расширяет возможности анализа и контроля экзогенных и эндогенных факторов, влияющих на эмбриологические процессы.

Ключевые слова: *кукуруза, полиэмбриония, зародышевый мешок, партеногенез, зародыш*

AT-1 APOMICTIC MAIZE LINE POLYEMBRYONY *IN VIVO* AND *IN VITRO*

T.A. Alatortseva, N.V. Apanasova
N.G.Chernyshevsky Saratov State University, Saratov, Russia,
e-mail: alatortsevata@mail.ru; apanasova.natasha@mail.ru

A polyembryony is a prevailing event among angiosperms. Research of this process has an applied value as opens prospects for production of pure lines, haploids and homozygous forms. However the insufficient level of its induction mechanisms studies does not allows using of the full polyembryony potential in selection and genetics practice.

High frequency of seeds with several embryos occurrence is characteristic for apomictic species that is connected with polyembryony cytoembryological preconditons during female generative structures development. Several embryo sacs formation in single ovule, several egg cells in one megagametophyte (polygamety), egg cell-like synergids or antipodal cells (apogamety) are included.

Among the sexual species a polyembryony is rather rare event, but ovule and ovary *in vitro* cultivation can provoke embryos development from the different megagametophyte elements.

The research purpose was a compatative analysis of frequency and formation ways of polyembryos of an AT-1 maize parthenogenetic line *in vivo* and *in vitro* in non-pollinated ovaries culture.

It has been determined, that unfertilized embryo sacs *in vivo* and for the 7 days cultivation on an artificial nutrient medium were characterized by an identical cytoembryological preconditions spectrum for polyembryony. An additional egg cells and egg cells-like synergids formation were observed. Multi-embryos seeds formation (*in vivo*) on average amounts to 1,5% and do not significantly differs from non-pollinated ovules with several proembryos formation frequency *in vitro* (1,0%) . Temporal cultivated ovaries cytoembryologocal analysis shows that an additional embryos generates from the additional egg cells parthenogenesis induction as well as a result of non-typical longitudinal egg cells division with following independent development to daughter cells embryos. Embryos formation from egg-like synergides was not observed.

The analogy of the processes leading to the polyembryony *in vivo* and *in vitro* conditions, allows to use the non-pollinated parthenogenetic maize lines culture as a modelling system for the multi-embryos seeds development induction mechanisms studying. Using *in vitro* methods for the polyembryony studying extendes the opportunities of the analysis and control of an external and internal causes influencing on embryological processes.

Keywords: *maize, polyembryony, embryo sac, parthenogenesis, embryo*

РЕПРОДУКТИВНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ВИДОВ КЛЕВЕРА ГОРНЫХ ФИТОЦЕНОЗОВ

С.А. Бекузарова, А.Л. Комжа, Л.Б. Соколова
Горский Государственный Аграрный Университет, г. Владикавказ, Россия,
e-mail: *bekos37(S)mail.ru*

Репродуктивные особенности изучают важнейшие этапы в процессе размножения растений, что позволяет получить информацию о причинах сохранения разнообразия видов.

Мобилизация генетических ресурсов неразрывно связана с идентификацией каждого вида, экотипа, образца по основным хозяйственно-ценным признакам с возможностью оценки его использования в селекции.

Наиболее распространенной культурой в горной зоне Северного Кавказа является клевер, численность которого составляет 61 вид. В результате изучения систематического состава рода *Trifolium* установлена принадлежность видов, произрастающих в Республике Северная Осетия-Алания, к двум подродам и девяти секциям.

В течение ряда лет изучено более 300 образцов семи дикорастущих видов клевера, наиболее часто встречающихся в горных условиях республики (*Trifolium prartense* L., *Tr. hibridum* L., *Tr. ambiguum* Bieb., *Tr. canescens* Willd., *Tr. repens* L., *Tr. trichocepalum* Bieb, *Tr. alpestre* L.). Вее виды изучали на различных горных высотах в диапазоне 800-2000 м над уровнем моря. Изучена их обсемененность соцветий в различных вертикальных условиях гор. Определены закономерности развития растений с учетом экологических условий.

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

Сравнительная оценка дикорастущих видов на разных высотах позволила установить влияние окружающей среды на образование семян. Определено, что на одной и той же высоте, но в разных почвенных средах обсемененность соцветий была неодинаковой. Было выявлено, что количество щуплых семян в нейтральной среде (pH 6,15–6,45) достигало 15–22%, а на слабокислой и кислой средах (pH менее 5) превышало 50%. Причем количество образовавшихся семян на 9,5–28% выше на участке, где кислотность минимальная.

Ключевые слова: *виды клевера, семенная продуктивность, закономерность обсемененности*

REPRODUCTIVE FEATURES OF CLOVER MOUNTAIN PHYTOCENOSES

S.A. Bekuzarova, A.L. Komga, L.B. Sokolova
Gorsky State Agrarian University, Vladikavkaz, Russia, e-mail: *bekos37@mail.ru*

Studies of the most important stages in the process of plant reproduction allows to obtain information about the reasons for conserving the diversity of species. Mobilization of genetic resources is inextricably linked with the identification of each species, ecotype, and sample by main economic-valuable attributes with the ability to assess its use in breeding.

The most widely spread crop in the mountain area of the North Caucasus is clover, the size of which is 61. A study of the systematic composition of the genus

For several years we have studied more tlian 300 samples of seven wild species of clover, the most common in the mountainous conditions of the Republic (*Trifolium prartense* L., *Tr. hibridum* L , *Tr. ambiguum* Bieb., *Tr.canescens* Willd. *Tr. repens* L., *Tr. trichocepalum* Bieb, *Tr. alpestre* L.). All species were studied at various mountain altitudes in the range of 800-2000 m above the sea level. They studied the colonization of inflorescences in different vertical mountain environment. The regularities of the development taking into account environmental conditions

As have shown results of researches, quantity of the seeds formed in one head depends on position of the place of growth in system of altitudinal zonality. It is revealed that with increase in altitude up to 2000 m increasing contamination of inflorescences from clover meadow, hybrid and creeping. In other studied species the maximum value of this indicator is marked at an altitude of 1400 m above the sea level. The comparative assessment of wild-growing types at different heights has allowed establishing influence of environment on formation of seeds. It is defined that at the same height, but in different soil environments the obsemenennost of inflorescences was unequal. It has been revealed that the quantity of puny seeds in the neutral environment (pH 6.15–6.45) reached 15–22%, and on sub acidic and sour environments (pH less than 5) 50% exceeded. And the quantity of the formed seeds are 9.5-28% higher on a site with minimum acidity.

Keywords: *clover species, seed production, pattern of contamination*

МЕХАНИЗМЫ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ КЛЕТОК ЖЕНСКИХ РЕПРОДУКТИВНЫХ СТРУКТУР *IN VIVO* И *IN VITRO* (НА ПРИМЕРЕ ВИДОВ *ALLIUM*)

Г.Ю. Виноградова
Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, г. Санкт-Петербург, Россия
e-mail: *vinogradova-galina@binran.ru*

Биологическое разнообразие, включающее в себя огромное число видов растений, несомненно, основано на разнообразии генетических и фенотипических признаков. Женские репродуктивные структуры растений, и женский гаметофит в частности, показывают богатейшее многообразие; существуют классификации и типизации зародышевых мешков (Maheshwari, 1937, 1950; Fagerlind, 1944; Романов, 1971; Haig, 1990, и др.) в основу которых положены различные критерии. Вариабельность строения зародышевого мешка проявляется не только в типе его развития (моно-, би- или тетраспорическом), но и в морфо-функциональной характеристике его элементов.

У видов *Allium* система женского гаметофита очень лабильна, что отражается в возможности изменения программы развития (специализации) его клеток. Отмечено образование дополнительных яйцеклеток вместо синергид (*A. schoenoprasum*, *A. rotundum*), или антипод (*A. ramosum*, *A. tuberosum*); инвертированных зародышевых мешков (*A. nutans*); развития дополнительных зародышевых мешков из сестринской (микропилярной) клетки диады (*A. cepa*, *A. roseum*, *A. neapolitanum*, *A. triquetrum*, *A. fetissovii*, *A. karataviense*). Несмотря на накопленный фактический материал, механизмы, лежащие в основе переключения программы развития клеток зародышевого мешка, не выяснены.

Цель настоящего исследования - выявление некоторых механизмов, обусловливающих смену программы развития элементов женского гаметофита у видов *Allium*. Результаты показали, что одним из возможных факторов, определяющих судьбу клетки в зародышевом мешке, является характер распределения ядер и заложения клеточных пластинок в процессе клеткообразования. На примере *A. ramosum* и *A. schoenoprasum*, которые различаются по структурной организации базальной части семязачатка и характеру транспорта питательных веществ, выявлена зависимость характера заложения клеточных стенок между ядрами от формы зародышевого мешка. В одинаково зауженных концах зародышевого мешка *A. ramosum* топография образованных клеток идентична, что, вероятно, стимулирует одинаковую их специализацию – по типу яйцевого аппарата. Зародышевый мешок *A. schoenoprasum* характеризуется узким микропилярным концом, где формируется яйцевой аппарат, и более вариабельным по форме халазальным – от относительно широкого до узкого. В последнем случае клетки приобретают черты яйцевого аппарата, в остальных – образуются антиподы. Эти результаты подтверждают мнение некоторых исследователей о наличии морфогенетического градиента (позиционной информации) в зародышевом мешке (Еналеева, 2002; Юдакова, 2010), в качестве которого может выступать ауксин (Pagnussat et al., 2009; Sundaresan, Alandete-Saez, 2010).

Возможная роль ауксина в качестве стимулятора смены программы развития подтверждена данными по влиянию экзогенного ауксина на развитие зародышевого мешка и дифференциацию его клеток у *A. tuberosum* в условиях *in vitro*. При культивировании бутонов на средах с различной концентрацией ауксина (НУК – 0,5 мг/л, 1,0 мг/л) в отдельных семязачатках происходит формирование нескольких мегаспороцитов и, соответственно, нескольких зародышевых мешков; диплоспорическое развитие зародышевого мешка, развитие гаметофита из микропилярной, а не халазальной клетки; нарушение полярности на ценоцитных стадиях развития гаметофита, изменение типа клеточной дифференциации на халазальном полюсе и др.

Ключевые слова: *женский гаметофит, зародышевый мешок, дифференциация клеток, программы развития, Allium*, *Alliaceae*

MECHANISMS OF CELL DIFFERENTIATION OF FEMALE REPRODUCTIVE STRUCTURES *IN VIVO* AND *IN VITRO* (ON THE EXAMPLE *ALLIUM* SPECIES)

G.Yu.Vinogradova
Komarov Botanical Institute of Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia
e-mail: *vinogradova-galina@binran.ru*

Biological diversity, including a great number of plants species, of course, is based on a variety of genetic and phenotypic characteristics. The female reproductive structures of plants and the female gametophyte in particular, show the richest diversity; there are classification and typing of embryo sacs (Maheshwari, 1937, 1950; Fagerlind, 1944, Romanov, 1971; Haig, 1990, etc.) which are based on different criteria. The variability of the embryo sac structure is manifested not only in the type of development (mono-, bi- or tetrasporic), but in the morpho-functional characteristics of its elements.

The system of female gametophyte in species *Allium* is very labile, that is reflected in the possibility of change in the developmental program (specialization) of its cells. It is noted the formation of additional eggs instead synergids (*A. schoenoprasum*, *A. rotundum*), or antipodals (*A. ramosum*, *A. tuberosum*); inverted embryo sacs (*A. nutans*); the development of additional embryo sacs from the sister (micropilar) dyad cell (*A. cepa*, *A. roseum*, *A. neapolitanum*, *A. triquetrum*, *A. fetissovii*, *A. karataviense*). Despite the available actual material, the mechanisms underlying in the basis of the switching developmental program of the embryo sac cells, not clarified.

The purpose of this study is the detection some of the mechanisms that determine the change of the developmental program of the female gametophyte cells in *Allium* species. The results showed that one of the possible factors determining the fate of cells in the embryo sac is the character of the cell nuclei distribution and of the cell plates formation during last mitosis. Character of cell plates formation between the nuclei is depended from the embryo sac form that was determined in *A. ramosum* and *A. schoenoprasum*, which differ in the structural organization of the ovule basal part and the transport pathways of the nutrients. In the both narrow ends of *A. ramosum* embryo sac the topography of the forming cells is identical that probably stimulates the equal of their specialization – of the type of the egg apparatus. The *A. schoenoprasum* embryo sac is characterized by narrow micropilar end, where egg apparatus is formed, the chalazal end is more variable in shape - from a relatively broad to narrow. In the latter case, the cells acquire characteristics of the egg apparatus, in others - formed the antipodals. These results support the view of some researchers that there is morphogenetic gradient (positional information) in the embryo sac (Enaleeva, 2002; Yudakova, 2010), such as the auxin (Pagnussat et al, 2009; Sundaresan, Alandete-Saez, 2010).

Possible role of auxin as a stimulator of the development program change is confirmed by the data on the influence of exogenous auxin on the embryo sac development and its cells differentiation in *A. tuberosum in vitro*. When flower buds were cultivated on media with different concentrations of auxin (NAA - 0.5 mg/l and 1.0 mg/l) in some ovules there are formed several megasporocytes and accordingly multiple embryo sacs; diplosporic embryo sac development, the development of the gametophyte from micropilar dyad cell instead chalazal cell; disturbance of polarity in the nuclear stages of gametophyte development, changing the type of cell differentiation on the chalazal pole of embryo sac and others.

Keywords: *female gametophyte, embryo sac, cell differentiation, developmental programs, Allium*, *Alliaceae*.

ГЕТЕРОСПЕРМИЯ, КАЧЕСТВО СЕМЯН И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ СЕЯНЦЕВ *IN VITRO* У *ORCHIS PURPUREA* SUBSP. *CAUCASICA* (*ORCHIDACEAE*)

Е.Е. Евдокимова[1], Е.В. Андронова[1], А.В. Семенов[2]
[1]Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Ботанический институт им. В.Л. Комарова Российской академии наук, г. Санкт-Петербург, Россия,
e-mail: *elena.andronova@mail.ru*,
[2]Филиал ФБУ "Российский центр защиты леса" "Центр защиты леса Краснодарского края", Краснодар, Россия

Изучены некоторые аспекты биологии семенного размножения *Orchis purpurea*, редкого вида, занесенного в Красную книгу РФ. Показано, что в изученных местонахождениях в Новороссийском и Абинском районах Краснодарского края в 2009–2014 гг. средний процент завязывания плодов был очень низкий (1-4%). Семена из плодов, собранных с разных особей, различались по жизнеспособности, окраске семенной кожуры и зародыша, а также по степени однородности их размерных параметров (длина, ширина) и форме, что свидетельствует о наличии гетероспермии. Доля нежизнеспособных семян (без зародыша) в плодах, сформировавшихся при естественном опылении, в среднем составила 50%. Процент нежизнеспособных семян в плодах, образовавшихся при гейтоногамии, был существенно выше, чем при ксеногамии. Цитоэмбриологическое исследование незрелых семян показало, что зародыш в большинстве из них присутствует. Однако, в строении зародыша отмечен ряд отклонений от нормы: изменения в направлении заложения перегородок при клеточных делениях, нарушения в последовательности и темпах деления клеток тела зародыша и суспензора, аномальное разрастание отдельных клеток суспензора (формирование «пузыревидных» клеток). Аномальные зародыши оставались жизнеспособными до перехода семян к созреванию. На стадии сформированных семян мелкие зародыши имели признаки дегенерации, к моменту диссеминации они почти полностью дегенерировали и погибали. Поэтому к моменту диссеминации большая часть зрелых семян лишилась зародыша.

Проведен ростовой тест на проращивание семян, сформировавшихся при свободном и искусственном опылении на питательной среде в культуре *in vitro*. Жизнеспособность семян, полученных при самоопылении, оказалась существенно ниже, чем при перекрестном опылении. Наблюдалось массовое прорастание семян некоторых особей, тогда как у других формировались единичные проростки. Сеянцы различались по степени жизнеспособности и темпам развития. Потомство некоторых особей практически полностью погибало в течение первого года культивирования. Выявлен ряд аномалий строения проростка, связанных с задержкой формирования апекса побега.

Высказано предположение, что низкий процент завязывания плодов и низкое качество семян могут быть связаны как с условиями места произрастания особей, (граница ареала), так и с неоптимальными погодными условиями. Низкая реальная семенная продуктивность может быть следствием межвидовой интрогрессивной гибридизации и/или инбридинга в связи с малой численностью особей в изучаемых популяциях

Ключевые слова: *жизнеспособность семян, семенная продуктивность, зародыш, проросток, аномалии развития*

Работа выполнена по государственному заданию № 01201255606 и при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и Министерства образования и науки Краснодарского края (проект № 13-04-96605 р_юг_а).

HETEROSPERMY, SEED QUALITY AND VIABILITY OF *ORCHIS PURPUREA* SUBSP. *CAUCASICA* (*ORCHIDACEAE*) SEEDLINGS *IN VITRO*

E.E. Evdokimova[1], E.V. Andronova[1], A.V. Semeonov[2]
[1]Institution of the Russian Academy of Science Komarov Botanical Institute of RAS, Sankt-Petersburg, Russia, e-mail: *elena.andronova@mail.ru*
[2]Federal Forestry Agency of the Federal Budget Institution «Russian Centre of Forest Health» branch «Centre of Forest Health of Krasnodar Region», Krasnodar, Russia

Some aspects of seed propagation biology of *Orchis purpurea*, a rare species listed in the Red Book of Russia, were studied. It is shown that in the localities studied in Novorossiysk and Abinsk districts of Krasnodar region in 2009-2014 period the average percentage of fructification was very low (1-4%). The seeds of the fruits collected from different individuals differ of the vitality, color of the seed coat and embryo, as well as in the degree of the dimensional parameters homogeneity (length, width) and shape, that indicates the presence of heterospermy. Percentage of unviable seeds (without embryo) in the fruits, formed by natural pollination, the average was 50%. Percentage of unviable seeds in the fruits formed at geitonogamy was significantly higher than at xenogamy.

Cytoembryological study of immature seeds showed that the embryo in most of them is presented. However, a number of deviations from the norm are marked in the structure of the embryo: the changes in the direction of laying down walls in cell division, violation of the sequence and rates of cell dividing in embryo body and suspensor, abnormal proliferation of some suspensor cells (the formation of "bubble" cells). Abnormal embryos remain viable up to the seed maturation. At the stage of formed seed small embryo display the signs of degeneration, at the time of dissemination they almost completely degenerated and died. Therefore, at the time of dissemination of a large portion of the mature seeds lost the embryo.

Growth test on germination of the seed, formed by the free and artificial pollination, a nutrient medium in culture in vitro for was carry out. The viability of seeds obtained by self-pollinated was significantly lower than by cross pollination. Mass germination of seeds of some plants were observed, while in another single seedlings were formed. The seedlings differed by the degree of vitality and rates of development. The posterity of some individuals almost completely died within the first year of cultivation. A number of anomalies in the structure of the seedling associated with the delay of forming the shoot apex were revealed.

It was suggested that a low percentage of fructification and the poor quality of seeds may be associated both with condition of individual habitat (border area), and a not optimal weather conditions. Low real seed production is belived to be the result of interspecific introgressive hybridization and / or inbreeding due to the small number of individuals in the populations studied

Keywords: *seeds viability, seed production, embryo, seedling, developmental abnormalities*

Aknowlegment
The work is carried out according Government task № 01201255606 with the financial support of The Russian Foundation for Basic Research and the Ministry of Education and Science of the Krasnodar Territory (project № 13-04-96605).

ФЕРТИЛЬНОСТЬ ПЫЛЬЦЫ ИНТРОДУЦИРОВАННЫХ ВИДОВ СЕМЕЙСТВА ГОРТЕНЗИЕВЫЕ В УСЛОВИЯХ СТЕПНОГО ПРИДНЕПРОВЬЯ

И.А. Зайцева
Днепропетровский национальный университет им. Олеся Гончара,
г. Днепропетровск, Украина, e-mail: *irinza_ldfr@mail.ru*

При интродукции древесно-кустарниковых растений одним из основных критериев акклиматизации является способность к семенному размножению в новых условиях произрастания, одним из показателей которого является фертильность пыльцы. Объектами исследований служили красивоцветущие кустарники семейства *Hydrangeaceae* Dum. – представители родов *Philadelphus* L., *Deutzia* Thunb. и *Hydrangea* L. коллекции ботанического сада ДНУ. Фертильность пыльцы изучали ацетокарминовым методом. Просматривали под микроскопом по 10 полей зрения на каждый пыльник. Для одного вида анализ проводился в 15 повторностях. Общее количество проанализированных пыльцевых зерен по каждому виду составило от 3121 до 12468.

Все изучаемые виды в ботаническом саду ДНУ цветут. В среднем начало бутонизации чубушников и дейций приходится на 1-ю декаду мая. Начало цветения большинства видов чубушников и дейций – в конце мая - в начале июня. Начало бутонизации и цветения *H. bretschneideri* Dipp. происходит одновременно с большинством видов чубушников и дейций. Наиболее поздние сроки (2-я декада мая и конец июня-начало июля) отмечены у остальных двух гортензий.

Изучаемые виды семейства *Hydrangeaceae* Dum. показали различную устойчивость к неблагоприятным факторам весенне-летнего периода в Степном Приднепровье – недостатку влаги и перегреву, что могло повлиять на процессы микроспорогенеза и развитие мужского гаметофита. В период проведения исследований отмечались стрессовые гидротермические условия в мае – среднемесячная темпертура была выше нормы на 3,9°С, количество осадков за месяц составило 9,8% от нормы.

Результаты исследований показали, что большинство видов чубушников в данных условиях продуцирует качественную пыльцу. Фертильность пыльцы видов с более ранним цветением *Ph. coronarius* L., *Ph. magdalenae* Koehne, *Ph. satsumanus* Miq. и *Ph. schrenkii* Rupr. (интродуцентов из южной Европы и Восточной Азии) находится в пределах 87,1–94,6%. У позднецветущих видов *Ph. californicus* Benth., *Ph. latifolius* Schrad. и *Ph. mexicanus* Schlecht. (интродуцентов из юго-восточных и юго-западных регионов Северной Америки) фертильность пыльцы была несколько ниже – 83,2–90,0%, а у *Ph. microphyllus* Gray составила 77,6%.

Высокие показатели фертильности пыльцы (84,6–97,5%) отмечены у *D. discolor* Helms., *D. scabra* Thunb. и *D. staminea* R.Br. Исключением является *D. sieboldiana* Maxim., которая цветет раньше других дейций (в середине мая) и имеет 6,9% фертильной пыльцы, с чем, по-видимому, связано и отстутствие плодоношения у этого вида.

Изученные виды гортензий отличаются самыми низкими показателями качества пыльцы. Среди них несколько более высокие значения – 23,4% отмечены у *H. bretschneideri* Dipp., которая цветет ранее других видов. У остальных видов гортензий фертильность пыльцы составляет от 1 до 3%, что является одной из причин отсутствия плодоношения и делает невозможным их семенное размножение.

Таким образом, снижение фертильности пыльцы у дейций отмечено при действии стрессовых условий во время цветения, у гортензий – на более ранних этапах формирования цветка и микроспорогенеза. Установлена высокая устойчивость процессов генеративного развития по показателю фертильности пыльцы у всех изученных видов *Philadelphus* L. и большей части видов *Deutzia* Thunb., что обеспечивает их репродуктивную способность в неблагоприятных условиях района интродукции.

Ключевые слова: *фертильность пыльцы, интродукция, чубушники, дейции, гортензии*

POLLEN FERTILITY OF INTRODUCED SPECIES OF THE HYDRANGEACEAE FAMILY IN THE CONDITIONS OF STEPPE PRIDNEPROVYE

I.A. Zaitseva
Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Dnipropetrovsk, Ukraine
e-mail: *irinza_ldfr@mail.ru*

In case of introduction of trees and shrubs one of the main criteria of acclimatization is the capacity for generative reproduction in new growing conditions, and pollen fertility is one of such indices. Beautiful flowering shrubs of the *Hydrangeaceae* Dum. family – representative of the *Philadelphus* L., *Deutzia* Thunb. and *Hydrangea* L. geni from the collection of the Botanical Garden of the Dnipropetrovsk National University (DNU) were the objects of research. Pollen fertility was studied by aceto-carmine method. 10 fields of sight for each pollinium were viewed under the microscope. For one species, analysis was carried out in 15 replications. The total number of analyzed pollen grains for each species ranged from 3121 to 12468.

All studied species of the Botanical Garden of DNU are in bloom. On average, the beginning of budding of mock oranges and deutzias falls on the first ten-day period in May. The most of mock orange and deutzia species start to bloom at the end of May – beginning of June. Beginning of budding and blooming of *H. bretschneideri* Dipp. occurs simultaneously with the most of mock orange and deutzia species. The latest dates (the second ten-day period in May and the end of June) are recorded in other two hydrangeas.

Species of the *Hydrangeaceae* Dum. family under study showed the different resistance to unfavorable factors of spring-summer period in Steppe Pridneprovye, i.e. overheating and lack of moisture, which could affect the processes of microsporogenesis and development of male gametophyte. During the period of study in May, stress hydrothermal conditions were recorded; average monthly temperature was 3.9°C above the norm, and amount of precipitation per month was equal to 9.8% of the norm.

Results of studies have shown that the majority of mock oranges in the given conditions produced high-quality pollen. Pollen fertility in species with the earlier flowering, such as *Ph. coronarius* L., *Ph. magdalenae* Koehne, *Ph. satsumanus* Miq. and *Ph. schrenkii* Rupr. (introduced species from the Southern Europe and Eastern Asia), varied within 87,1–94,6%. In late-flowering species *Ph. californicus* Benth., *Ph. latifolius* Schrad. and *Ph. mexicanus* Schlecht. (introduced species from the South-Eastern and South-Western regions of the North America) pollen fertility was somewhat lower – 83,2–90,0%, and in *Ph. microphyllus* Gray it was 77,6%.

High indices of pollen fertility (84,6–97,5%) are recorded in *D. discolor* Helms., *D. scabra* Thunb. and *D. staminea* R.Br. The exclusion is *D. sieboldiana* Maxim. which comes into bloom earlier than other deutzias (in the middle of May) and has 6.9% of fertile pollen; the absence of fruit-bearing in this species is, probably, connected with this fact.

Species of hydrangea under study are characterized by the lowest levels of pollen quality. Slightly higher value among them (23.4%) is observed in *H. bretschneideri* Dipp., which comes into bloom earlier than the other species. In other hydrangea species pollen fertility is equal to 1-3%, being one of the reasons for the lack of fruits and making impossible their propagation by seeds.

Therefore, reduction of pollen fertility in deutzias is recorded under action of stress conditions during flowering, and in hydrangeas it is found at the earlier stages of flower formation and microsporogenesis. High stability of processes of the generative development by the index of pollen fertility has been established in all *Philadelphus* L. species and the most of *Deutzia* Thunb. species under study, providing for their reproductive capacity in the unfavorable conditions of the introduction region.

Keywords: *pollen fertility, plant introduction, species of mock oranges, deutzia, hydrangea*

СОПРЯЖЕННОСТЬ В РАЗВИТИИ РЕПРОДУКТИВНЫХ СТРУКТУР В ЦВЕТКАХ ОСТРОЛОДОЧНИКА БАШКИРСКОГО *OXYTROPIS BASCHKIRENSIS* KNJASEV, РЕДКОГО ЭНДЕМИЧНОГО ВИДА ФЛОРЫ ЮЖНОГО УРАЛА

Зинатуллина А.Е.
Уфимский институт биологии РАН, г. Уфа, Россия, e-mail: *kruglova@anrb.ru*

Эндемичный вид остролодочник башкирский *Oxytropis baschirensis* Knjasev (семейство бобовые *Fabaceae* Lindl.) относится к группе редких исчезающих видов, занесенных в Красную книгу Республики Башкортостан. Один из эффективных приемов сохранения этого вида – интродукция в питомники ботанических садов с последующей реинтродукцией для восстановления природных популяций. Как правило, для успешной репатриации требуется значительное количество качественных семян. В то же время хорошо известно, что у интродуцированных растений в связи со сменой местообитаний снижается семенная продуктивность. Важно по морфологическим признакам установить, какие именно морфогенетические процессы проходят в цветке в конкретной фенофазе с тем, чтобы определить природу и время возникновения возможных нарушений, приводящих к снижению потенциальной семенной продуктивности. Цель исследования состояла в оценке сопряженности развития репродуктивных структур – пыльника и семяпочки – в цветке растений о. башкирского в условиях интродукционного питомника.

Выявлены морфометрические показатели соцветия/цветка и получены данные по цито-гистологическому статусу пыльника и семяпочки в фенофазы, связанные с формированием и развитием этих репродуктивных структур. Установлено, что в начале фазы бутонизации (средняя длина соцветия 2,7 см, средняя длина бутона 2,2 мм) в цветке отмечаются сформированный пыльник с микроспороцитами и семяпочка с недифференцированными, но хорошо развитыми меристематическими бугорками. В конце фазы бутонизации (средняя длина соцветия 3,1 см, средняя длине бутона 2,5 мм) пыльник находится в стадии микроспоры, семяпочка – в стадии макроспороцита. В фенофазу начала цветения (средняя длина соцветия 4,5 см, средняя длина цветка 3,8 мм) в цветках отмечаются зрелые пыльники и сформированные семяпочки. Зрелые семяпочки, содержащие зрелые зародышевые мешки, отмечены в цветках в фенофазу массового цветения (средняя длина соцветия 6,2 см, средняя длина цветка 4,5 мм); при этом зрелые пыльники уже вскрыты внутри закрытого дихогамного (в форме протандрии) цветка.

Таким образом, формирование репродуктивных структур острлодочника башкирского приходится на фенофазу бутонизации. Зрелые пыльники отмечены в фенофазу начала цветения, зрелые семяпочки – в фенофазу массового цветения. В целом, в пределах цветка наблюдается сопряженность развития пыльников и семяпочек при более ускоренном морфогенезе пыльника. В появлении такой асинхронности основную роль, по-видимому, играет перекрестный способ опыления о. башкирского, при котором нет необходимости в синхронизации развития репродуктивных структур.

Полученные данные могут быть использованы при разработке экспериментальных, в том числе биотехнологических, способов увеличения реальной семенной продуктивности о. башкирского в условиях интродукции.

Ключевые слова: *биоразнообразие, интродукция, морфогенез, пыльник, семяпочка, Oxytropis baschirensis*

Работа выполнена при поддержке грантом Президента РФ по программе «Ведущие научные школы России» (№ НШ-5282.2014.4).

THE CONJUGATION IN THE DEVELOPMENT OF REPRODUCTIVE STRUCTURES IN THE FLOWERS OF *OXYTROPIS BASCHKIRENSIS* KNJASEV, A RARE ENDEMIC SPECIES OF SOUTHERN URAL FLORA

A.E. Zinatullina
Institute of Biology of RAS, Ufa, Russia, e-mail: *kruglova@anrb.ru*

Endemic species *Oxytropis baschirensis* Knjasev (family Fabaceae Lindl.) refers to a group of rare endangering species listed into the Red Book of the Republic of Bashkortostan. One of the effective techniques for the conservation of this species is the introduction into Botanical garden nurseries, followed by reintroduction to restore natural populations. As a rule, a significant amount of quality seed requires for successful reintroduction. At the same time, it is well known that introduced plants have reduced seed production in connection with the change of habitats. It is important to identify according morphological characters what morphogenetic processes take place in the flower during the concrete phenophase in order to determine the nature and the time of occurrence of potential violations, resulting to reduce of potential seed productivity. The purpose of the study was to assess the conjugation in the development of reproductive structures – anther and ovule – in the flowers of *O. baschirensis* plants in the condition of introduction nursery.

It were identified the morphometric characteristics of inflorescence/flower and were obtained the data on cyto-histological status of the anther and of the ovule in phenophases associated with the formation and development of these reproductive structures. It was established that at the beginning of budding phase (average length of inflorescence was 2.7 cm, an average length bud was 2.2 mm) in a flower are noted the formed anther with microsporocytes and the ovule with undifferentiated, but well-developed meristematic tubercles. At the end of the budding phase (average length of inflorescence was 3.1 cm, an average length of bud was 2.5 mm) the anther was at the stage of microspore, ovule – at the stage of macrosporocyte. At the phenophase of beginning of flowering (average length of the inflorescence was 4.5 cm, average flower length was 3.8 mm) in the flowers observed the mature anthers and the formed ovules. The mature ovules containing mature embryo bags noted in the flowers at the phenophase of mass flowering (average length of inflorescence was 6.2 cm, the average length of flower was 4.5 mm); during this the mature anthers were already revealed inside a gated dihogamic (in the form of protandry) flower.

Thus, the formation of reproductive structures of *O. baschirensis* accounts for phenophase of budding. The mature anthers observed in the phenophase of beginning of flowering, the mature ovules – in the phenophase of mass flowering. In general, within the flower there was a conjugation in the development of anthers and ovules in the time of the more accelerated anther morphogenesis. In the appearance of such asynchronous the main role seems to play a cross-pollination method of *O. baschirensis*, in which there was no need to synchronize the development of reproductive structures.

The data obtained can be used to work out the experimental, including biotechnological, ways of increasing of actual seed productivity of *O. baschirensis* in the conditions of introduction.

Keywords: *biodiversity, introduction, morphogenesis, anther, ovule, Oxytropis baschirensis.*

Aknowlegment
The work was supported by grant of the Russian Federation President program "Leading Scientic Schools of Russia" (№ НШ-5282.2014.4).

НЕКОТОРЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ТРЕХ ВИДОВ РОДА *CAMPANULA* L. (C. *SIBIRICA* l., C. *TAURICA* JUZ., C. *TALIEVII* JUZ.)

Н.Н. Мирошниченко
ФГБУН «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН», г. Ялта, Россия

Изучаемые нами виды рода *Campanula* L. (*Campanula sibirica* L., *C. taurica* Juz., *C. talievii* Juz.) произрастают в горном Крыму (вдоль автомобильных дорог, на опушках лесов и на каменистых склонах гор Чатыр - Даг, Челеби и на Никитских скалах). Встречаются единичными особями или малочисленными популяциями.

По нашим наблюдениям и согласно литературным данным, *Campanula sibirica* L. – двулетнее травянистое растение с одинарным, прямостоячим, слабо опушенным стеблем до 70 см высотой. *Campanula taurica* Juz. – многолетнее травянистое растение до 50 см высотой. Генеративные побеги у данного вида многочисленные (3-6), прямые, средний обычно выше других. *Campanula talievii* Juz. – полукустарничек до 25 см высотой. Как и у *C. taurica*, генеративные побеги многочисленные (4-9), средний из которых прямостоячий. Одним из основных отличий изучаемых видов является их жизненная форма.

Цветки многочисленные, до 20-30 мм длиной, на довольно длинных цветоножках (8-10 мм). Строение венчика соответствует характерным признакам рода. Наружная часть венчика, как и внутренняя, средне опушенная. Цветоложе выпуклое. Чашелистики отогнуты, имеются придатки. Чашечка поникающая, зубчатая, увядающая, неопадающая. Лепестки зубчатые. Окраска цветка варьирует от светло- до темно – сиреневой. В тени окраска цветков более бледная, а на свету имеет более насыщенную окраску венчика. Также нами были обнаружены особи *C. taurica* с белой окраской венчика. Стебли насыщенного зеленого цвета, покрытые жесткими волосками. Волоски имеют такую же окраску, как и стебель. В отличие от *C. sibirica* и *C. taurica*, у *C. talievii* стебель одревесневший и у основания имеет коричневатую окраску.

Восприимчивость данных видов к температурным показателям также свидетельствует об их видовом различии. Самым восприимчивым оказался вид *C. talievii*. Начало вегетационного периода варьирует и отличается из года в год. При низких весенних температурах цветение наступает позже среднестатистических данных, а при высоких летних температурах цветение, семяобразование и диссеминация завершаются раньше.

Размножение у данных видов, в основном, происходит семенным путем. Семена мелкие (до 1 мм длиной) и легкие, благодаря чему разносятся на довольно большие расстояния. Плод – нижняя, трехгнездная, многосемянная, поникающая, неопадающая коробочка. Высывание семян происходит через три поры, образованные с помощью аксикорна и расположенные в основании коробочки. Семенное размножение у данных видов осуществляется при помощи баллистохории, в частности, баллистоанемохории (с помощью ветра), баллистоэпизоохории (с помощью животных) и эпизоохории (при непосредственном участии животных). Для *C. taurica*, и *C. talievii* также характерно вегетативное размножение. На корневище образуются на первый год новые розетки листьев, а на второй или третий год эти розетки дают генеративные побеги.

Полученные данные свидетельствуют о потенциальных возможностях естественного возобновления изучаемых видов в условиях природного ареала Крыма, лимитирующими факторами при этом являются антропогенное воздействие, а также животные, которые обламывают и обкусывают растения.

Ключевые слова: *Campanula sibirica* L., *C. taurica* Juz., *C. talievii* Juz., *цветение, семенное и вегетативное размножение*

SOME SPECIAL BIOLOGICAL FEATURES OF THREE *CAMPANULA* L. SPECIES (C. *SIBIRICA* L., C. *TAURICA* JUZ., C. *TALIEVII* JUZ.)

N.N. Miroshnichenko
Nikita Botanical Gardens - National Scientific Centre, Yalta, Russia

Study cases from *Campanula* L. genus (*Campanula sibirica* L., C.*taurica juz*., C. *talievii Juz*.) grow in the mountain Crimea (along highways, on forest edges and rocky slopes of Chatyr-Dag, Chelebi mountains and on Nikita rocks). Single specimens or small-sized populations can be found there.

According to our observations and publishing data, *Campanula sibirica* L. is a biennial herbaceous plant with a single upright weakly downy stem, 70 sm high. *Campanula taurica* Juz. is a perennial herbaceous plant up to 50 sm high. Generative shoots are numerous (3-6), straight, middle one is higher than others. *Campanula talievii* Juz. is a dwarf semishrub that reaches 25 sm high. Like *C. Taurica* its generative shoots are numerous (4-9), middle is upright. One of the principal characteristics of study cases is their life-form.

On quite long pedicles (8-10 mm) there are a lot of flowers, 20-30 mm long. Corolla structure corresponds to the typical genus characteristics. Exterior part of corolla as inside is mid-downy. Receptacle is prominent. Calyx lobes are folded, appendages are presented as well. Calyx is wilted, serrate, faded, but persistent. Petals are quite serrate. Flower color ranges from light to dark blue. In the shade it is not so bright, while in the light corolla has got more intensive color. At the same time we discovered specimens of *C. taurica* with white corolla. Stems are bright green covered with hard fuzzes. Fuzz is bright green as well. In comparison with C.*sibirica* and C.*taurica*, C.*talievii*`s stem is lignified with brown bottom.

Response of these cultivars to temperature parameter also indicates their specific difference. *C.talievii* was found out as the most susceptible. Vegetative period ranges and differs depending upon year. In case of low spring temperatures blooming starts later than it was fixed on average, but if high summer temperatures blooming, seed formation and dissemination finish earlier.

Propagation of study cultivars is mainly seed. Seeds are small-sized (till 1 mm long) and light, that`s why capable to get over big distances. The fruit is lower, trilocular, multi-seed, wilted, persistent seed boll (fruitcase). Seeding occurs through three apertures, created by axicorn and locates at the bottom of fruitcase. Seed propagation of these cultivars is realized due to ballistohoria, particularly ballistoanemohoria (by means of wind), ballistoepizoohoria (by means of animals) and epizoohoria (with direct animal role). For *C. taurica*, and *C. Talievii* vegetative propagation is typical. On the rhizome there are first year new leaf rosettes, during the second and third years they produce generative shoots.

These findings indicate the potential capacity of the natural renewal for study cultivars under conditions of the Crimean areal; in this way anthropogenic sphere and animal affect are limiting factors.

Keywords: *Campanula sibirica* L., *C. taurica* Juz., *C. talievii* Juz., *blooming, seed and vegetative propagation*

РЕПРОДУКТИВНАЯ БИОЛОГИЯ ГРЕЦКОГО ОРЕХА В КОНТЕКСТЕ СОХРАНЕНИЯ ЕГО БИОРАЗНООБРАЗИЯ

М.А. Пынтя
Научно-Практический Институт Садоводства Виноградарства и Пищевых Технологий, Кишинэу, Республика Молдова, e-mail: *mariapintea@yandex.ru*

Выполнение задач касающихся стабильного плодоношения, а также сохранения биоразнообразия грецкого ореха (*Juglans regia* L.) могут быть достигнуты лишь при всестороннем исследовании его биологии, включая такие важные вопросы как закладка, дифференциация и формирование репродуктивных структур цветков, особенности цветения, опыления, оплодотворения и плодообразования. Плод грецкого ореха образуется из пестичного цветка. От нормального формирования цветка, его опыления качественной и генетически соответствующей (совместимой) пыльцой зависит образование семени - основной хозяйственно-ценной части ореха. В этом отношении грецкий орех отличается от подавляющего большинства плодовых культур: семя (костянка) является плодом в потребительском понимании. Если урожай большинства плодовых обеспечивается всего лишь 8-15 % цветков, у грецкого ореха только максимальная сохранность пестичных цветков может обеспечить высокую рентабельность его культуры. При распространении сортовой культуры грецкого ореха путем его вегетативного размножения возникла настоятельная необходимость дать эмбриологическую оценку наиболее перспективным сортам и формам. Нами выявлено отрицательное влияние зимних температур ниже -25 - -30°C на прохождение процессов микроспорогенеза и образования полноценной пыльцы раноцветущих протандричных генотипов. При развитии женской генеративной сферы чаще обнаруживаются нарушения формирования зародышевого мешка (в том числе и остановка его развития на 4-х ядерной стадии) независимо от типа дихогамии (у отдельных генотипов, обладающих высокой степенью бокового плодоношения). Эти явления особенно проявляются при усиленной обрезке кроны деревьев, а также при вторичном цветении. Выявлено что при партеногенетическом развитии семени грецкого ореха (которое в рамках дихогамии встречается одинаково редко у протогиничных, протандричных и одновременноцветущих генотипов) возможны два пути: раннее развитие яйцеклетки и слияние полярных ядер, с образованием продолговатого зародыша и аномального эндосперма или, наоборот, позднее (уже при критическом морфофизиологическом состоянии семяпочек) развитие яйцеклетки при неслившихся полярных ядрах, деление которых приводит к аномальному эндосперму. Только в первом случае возможно образование полноценных диплоидных орехов. Мы считаем, что апомиксис у грецкого ореха является частичной компенсацией подавления полового размножения, являющегося результатом его естественной отдаленной гибридизации.

Ключевые слова: *грецкий орех, эмбриология, дихогамия, биоразнообразие*

EMBRYOLOGICAL ASPECTS OF WALNUT (*JUGLANS REGIA* L.) RELATED TO BIODIVERESITY CONSERVATION

M.A. Pintea
Research and Practical Institute for Horticulture and Alimentary Technologies. Rep Moldova, Chisinau, e-mail: *mariapintea@yandex.ru*

Resolution of tasks concerning stable economic walnut (*Juglans regia* L.) production as well as its biodiversity conservation could be attainable only by multilateral biological investigations, including questions regarding initiation of male and female buds, differentiation and formation of reproductive flowers structures, peculiarities of micro-and macrosporogenesis and gametogenesis, endospermo- and embryogenesis related to flowering period and dichogamous types. Walnut fruit production is developed from maximal quantity of pistillate flowers. Therefore depending on normally formed flowers, its pollination with qualitative and genetically compatible pollen depend development of kernel – economically main part of nut. Walnut fructification is very different from a lot of fruit crops: seed (nut) there is whole fruit meaning utilization. Only maximal fruit set from walnut pistillate flowers could ensure economic profitability of its growing, in the same time for all *Rosaceae* fruit trees species good fructification is obtained from 8-15 % of flowers. Therefore during the development of industrial walnut cultivation via vegetative (grafting methods) embryological investigation of main varieties and hybrids there are indispensable. As a result of our investigations there is established that negative actions of -25- -35 ^{o} C for the microsporogenesis and to the formation of viable pollen grains, especially for early flowering protandrous genotypes. During the development of female generative sphere of all dichogamous types there are observed abnormalities in the processes of embryo sac formation, including stopped of development of 4-nuclear stage. This phenomenon is characteristic especially for some lateral bearing genotypes, being manifested after strong pruning, as well as after secondary flowering. According our investigations partenogenetic development of seeds (in the frame of dichogamy there are rare phenomenon within protoginous, protandrous and homogamous genotypes) occurs by 2 ways: early development of egg cell and copulation of polar nucleus with the formation of prolonged embryo and anomalous endosperm, or contrarily late (in the critical morphophsiological state of ovule) development of egg cell in the absence of connection of polar nuclei, theirs divisions conduct to formation of anomalous endosperm cell. Only in the first case could be developed normal diploid fruits (nuts). We suppose that phenomenon of apomixis in the case of walnut could represent particular compensation of reduction of sexual reproduction, as a result of long natural distant hybridization.

Keywords: *walnut, embryology, dichogamy, selection, biodiversity*

ИЗМЕНЧИВОСТЬ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ РЕПРОДУКТИВНЫХ И ВЕГЕТАТИВНЫХ ОРГАНОВ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ РОДА *EPIPACTIS*

Я.А. Феоктистова, М.М. Кривошеев
Башкирский государственный университет, г. Уфа, Россия, e-mail: *yaroslava-f@mail.ru*, *m.m.krivosheev@mail.ru*

Приводятся результаты изучения морфологических признаков двух изолированных популяций *Epipactis atrorubens и Epipactis helleborine* на территории Южно-Уральского природного заповедника (Республика Башкортостан).

Представители рода *Epipactis* Zinn. (Дремлик) – являются полиморфными видами, что проявляется в образовании многочисленных морфологических форм и естественных межвидовых гибридов (Ефимов, 2004; Пинчук и др., 2010.). Однако внутривидовая изменчивость видов этого рода в пределах их ареалов недостаточно исследована, не описаны морфологические характеристики гибридов, что затрудняет их выделение при их совместном произрастании.

На территории РБ описан (Пушкарева, Ишмуратова, 2012; Пушкарева, 2013) межвидовой гибрид *E.* × *schmalhausenii* в местах совместного произрастания родительских форм *Epipactis atrorubens* (Hoffm. ex Bernh.) Bess. и *E. helleborine* (L.) Crantz , исследована изменчивость качественных и количественных морфологических признаков *E. helleborine* и *E.* × *schmalhausenii*. Установлено, что гибрид морфологически близок к *E. helleborine,* но отличается от него меньшим габитусом и появлением в окраске цветков дополнительных оттенков – коричневых и насыщенно-фиолетовых.

Цель работы – изучить внутривидовую изменчивость качественных и количественных признаков морфологических органов *E. atrorubens* и *E. helleborine* на Южном Урале.

В 2015 году на территории ЮУГПЗ изучены две изолированные друг от друга ценопопуляции *E. atrorubens* (30 генеративных особей) и *E. helleborine* (18 генеративных особей*)*. Всего проанализировано 4 признака побега, 6 признаков соцветия и 12 признаков цветка. Данные обрабатывались вариационно-статистическими методами с использованием пакета программ Microsoft Excel. Достоверность различий при сравнении арифметических средних оценивали по коэффициенту Стьюдента (C_{st}).

Анализ степени изменчивости признаков в изучаемых выборках показывает, что имеются как слабо-, так и сильноизменчивые признаки. Наиболее вариабельными для обоих видов оказались признаки вегетативной сферы, в частности: высота побега (*E. atrorubens* 31,5 - 84,5 см; *E. helleborine* 48,0 – 107,0 см) и высота побега до соцветия (*E. atrorubens* 7,5 - 54,0 см; *E. helleborine* 16,5 - 70,5 см) (CV≥20%). Это подтверждает данные ряда авторов (Ефимов, 2004; Пинчук и др., 2010), согласно которым признаки вегетативной сферы могут быть лишь ограниченно использованы для определения видов у дремликов.

Морфометрические признаки цветка в исследуемых популяциях варьировали в меньшей степени (7,21≤CV≤15,07 %). Наибольший коэффициент вариации наблюдался у признака длина гипохилия (CV=27,71 %), для вида *E. atrorubens* (1,5 - 3,7 мм), в то же время диапазон вариации для *E.helleborine* (CV=13,69 %) был значительно меньше (2,6-5,0 мм).

Таким образом, нужно отметить, что различия достоверны (по коэффициенту Стьюдента) у видов между признаками генеративной сферы - признаками цветка (доверительный интервал 99,99%). Среди вегетативных признаков различия достоверны по высоте побега и ширине первого листа. Именно на эти признаки следует обращать внимание при дальнейшем изучении смешанных и гибридных популяций исследуемых видов.

Ключевые слова: *Epipactis atrorubens, Epipactis helleborine, изменчивость признаков*

VARIABILITY OF MORPHOLOGICAL FEATURES OF REPRODUCTIVE AND VEGETATIVE CHARACTERS OF SOME SPECIES OF *EPIPACTIS*

Ya.A. Feoktistova, M.M. Krivosheev
Bashkir State University, Ufa, Russia, e-mail: *yaroslava-f@mail.ru*, *m.m.krivosheev@mail.ru*

The results of the study of morphological features of two isolated populations of *Epipactis atrorubens* and *Epipactis helleborine* in the territory of the South Ural Nature Reserve (Republic of Bashkortostan).

Members of the genus *Epipactis* Zinn (Morio) – are polymorphic species, which is manifested in the formation of several morphological forms and natural interspecific hybrids (Efimov, 2004; Pinchuk et al., 2010.). However, intraspecific variability of species in this genus within their areas explored insufficiently, morphological characteristics of hybrids are not described, which makes it difficult to select them under the joint growth.

On the territory of the Republic of Bashkortostan is described (Pushkareva, Ishmuratova, 2012;Pushkareva, 2013) intraspecific hybrid *E.* × *schmalhausenii* in areas of the joint growth of parental species *Epipactis atrorubens* (Hoffm. ex Bernh.) Bess. and *E. helleborine* (L.) Crantz, is explored variability of qualitative and quantitative morphological features of *E. helleborine* and *E.* × *schmalhausenii*. It is stated, that hybrid morphologically close to *E. helleborine,*but differs in smaller habitus and existence of additional shades in the color of the flowers – browns and rich purple.

Objective is to study intraspecific variability of qualitative and quantitative features of morphological organs of *E. atrorubens* и *E. helleborine* in the South Ural.

In 2015 on the territory of South Ural State Nature Reserve, we studied two isolated from each other coenopopulations*Epipactisatrorubens* (30 generative individuals) and *Epipactishelleborine* (18generative individuals).We analyzed total four characters of sprout, 6 characters of inflorescence and 12 characters of flower Data were processed by variational-statistical methods using Microsoft Excel software package.Reliability of distinctions when compared arithmetical averages was estimated by Student's coefficient (C_{st}).

Level of characters variability in studied samples analysis shows that there are both weakly and highly variable characters. The most variable for both species were vegetative characters, such as: height of sprout (*E. atrorubens* 31.5 – 84.5 cm; *E. helleborine* 48.0 – 107.0 cm) and the height of sproutto inflorescence(*E. atrorubens* 7.5 – 54.0 cm; *E. helleborine* 16.5 – 70.5 cm) (CV≥20%). It confirms findings of several authors (Efimov, 2004; Pinchuk et al., 2010.), according to whichvegetative characters can be usedlimited for identification of Morio species.

Morphometric features of flower in study populations varied lower (7,21≤CV≤15,07). The highest coefficient of variation was shown by the feature length of hypochil of *Epipactis atrorubens* (CV=27.71%) for the *E. atrorubens* (1.5 – 3.7 мм), simultaneously the range of variation for *E. helleborine* (CV=13.69 %) was significantly lower (2.6-5.0 mm).

Thus, it should be noticed, that the differences are significant (by Student's coefficient) in species between the characters of generative sphere by the flower characters (confidence interval 99,99%).Among vegetative characters,the differences are significant by the height of sprout and width of the first leave.We should pay attention particularly to these characters during the further research of mixed and hybrid populations of studied species.

Keywords: *Epipactis atrorubens, Epipactis helleborine, morphological features variability*

ЦИТОМОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПЫЛЬЦЫ ПОРАЖЕННЫХ ВИРУСАМИ И БЕССИМПТОМНЫХ РАСТЕНИЙ РОЗЫ

С.В. Шевченко, Т.Н. Кузьмина, И.В. Митрофанова
ФГБУН «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН», г. Ялта, Россия, e-mail: *Shevchenko_nbs@mail.ru*

Поражение растений биогенными и абиогенными стрессовыми факторами, в том числе и вирусами, приводит к изменению ряда физиолого-биохимических параметров, что вызывает нарушение биохимического равновесия и отражается на анатомо-морфологических характеристиках растения. Для визуальной оценки степени зараженности растения и его жизнеспособности используются изменения морфологических признаков листовых пластинок (пятнистость, морщинистость и карликовость) (Грин, Стаут, Тейлор, 1990; Митрофанова и др., 2000).Состояние мужского гаметофита на стадии зрелых пыльцевых зерен является одним из наиболее доступных и результативных признаков, дающих представление о степени стрессовых воздействий различных факторов на растение (Бессонова, Фендюр, Пересыпкина, 1997; Методические указания, 1979).

Цельюданного исследования было выявлениецито-морфологического состояния пыльцевых зерен ряда сортов розы эфиромасличной у особей с визуальными признаками поражения вирусами и бессимптомных растений для определения влияния вирусной инфекции на состояние генеративной сферы. В исследования были включены 12 сортов (Джалита, Крымская красная, Радуга, Фестивальная, Лада, Мичуринка, Лань, Кооператорка, Таврида, Аура, УкраинаиИскра). В результате метагеномного секвенирования вирусной РНК выявлено наличие ряда вирусных патогенов в исследуемых сортах. Вместе с тем, анализ полученных данных показал, что наиболее высокая доля морфологически нормальных пыльцевых зерен у безвирусных растений сорта Джалита(около 78%). Установлены статистически значимые различия морфологически нормальных пыльцевых зерен у безвирусных растений и пыльцевых зерен у растений с визуальными признаками вирусного заражения. 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. В то же время для сорта Джалита характерно повышение доли аномальных пыльцевых зерен на 6,15% у растений с визуальными признаками заражения по сравнению с растениями, не имеющими вирусного заражения. Иными словами, у сорта Джалита действие вирусов сказывается как в повышении числа аномалий при формировании пыльцевых зерен, так и в их значительной стерильности. Практически у всех изученных сортов направленность реакции мужских генеративных структур на зараженность вирусами идентична и различается только фактическими цифровыми показателями. Например, у бессимптомных особей сорта Фестивальная аномальных пыльцевых зерен было менее 30%, у зараженных – около 60%, у сорта Кооператорка – около 30% и 50%, соответственно.

Таким образом, проведенный сравнительный анализ состояния мужского гаметофита у различных сортов розы эфиромасличной с визуальными признаками поражения вирусами и бессимптомных особей позволил сделать предварительное заключение, что поражение растений приводит не только к изменениям морфологических признаков листьев и цветков, но и отражается насостоянии и жизнеспособности мужского гаметофита. При определяющей зависимости формирования нормальной пыльцы от генотипа поражение особей вирусными патогенами особенно ярко проявляется в процессах формирования элементов мужской генеративной сферы и выражается в аномалиях и дефективности пыльцевых зерен.

Ключевые слова: *роза, пыльцевые зерна, инфицированные и бессимпттомные растения*

Исследования выполнены при поддержке гранта№ 14-50-00079 Российского научного фонда.

POLLEN CYTOMORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS IN VIRUS DAMAGED AND ASYMPTOMATIC ROSA PLANTS

S.V. Shevchenko, T.N. Kusmina, I.V. Mitrofanova
Nikita Botanical Gardens - National Scientific Centre, Yalta, Russia,
e-mail: *Shevchenko_nbs@mail.ru*

Damages of plants with biogenic and abiogenic stress factors including virus pathogens resulted in the changes of some physiological and biochemical characteristics, that offer infringement of biochemical balance and appears in the anatomical and morphological characteristics of plants. For visual estimation of plant viral damages and its viability leaf blade morphological changes (spot, rugosity and dwarfism) are used (Green, Stout, Taylor,1990; Mitrofanova and etc., 2000). The state of male gametophyte on the stage of mature pollen grains is one of the most accessible and resulting features that indicates the degree of different stress factors affection on a plant (Bessonova, Fendur, Peresypkina, 1997; Metodical indication, 1979).

The aim of this study was to identify the cytomorphological state of the pollen grains in plants with visible virus diseases symptoms and asymptomatic plants of some rose cultivars to determine the effects of virus infection on their generative sphere. The study included 12 cultivars (Dzhalita, Krymskaja Krasnaja, Raduga, Festivalnaya, Lada, Michurinka, Lan, Kooperatorka, Tavrida, Aura, Ukraina and Iskra). Metagenomic sequencing of viral RNA demonstrated that number of viral pathogens presented in the studied cultivars. However, pollen analysis demonstrated that the highest percentage of morphologically normal pollen grains were in virus-free plants cultivar Dzhalita (about 78%). Significant differences between morphologically normal pollen grains from virus-free plants and pollen grains from plants with visual signs of viral infection were found. The difference in number of morphologically normal pollen grains between asymptomatic and infected plants for cultivar Dzhalita was on average 16%. While the part of sterile pollen grains in damaged plants was 23.21% higher compared to asymptomatic plants. At the same time, Dzhalita cultivar characterized with increase of anomalous pollen grains at 6.15% in plants with visual signs of infection compared with plants that did not have a viral infection. In other words, in the cultivar Dzhalita viruses affect indicated both in increasing the number of anomalies in the formation of pollen grains and their considerable sterility. Almost in all the studied cultivars reaction of male generative structures on virus contamination was identical and differed only by the actual digital indicators. For example, in asymptomatic plants of the cultivar Festivalnaya the part of anomalous pollen grains was less than 30%, and in infected plants it was about 60%, in Kooperatorka cultivar - about 30% and 50%, respectively.

Thus, the comparative analysis of male gametophyte state in different cultivars of essential oil roses with visual signs of viral damages and asymptomatic plants suppose that viral infections in plants do not only induce the changes in morphological characteristics of leaves and flowers, but also affects the state and viability of male gametophyte. So as normal pollen formation is genotype dependent plants` damages by viral pathogens were especially evident in the processes of male generative sphere elements formation and appeared as the anomalies and impairments of pollen grains.

Keywords: *rose, pollen grains, virus damaged and asymptomatic plants*

Aknowlegment
This study was funded by a research grant № 14-50-00079 of the Russian Science Foundation.

СЕМИНАР
«МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ МЕХАНИЗМОВ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К АБИОТИЧЕСКОМУ СТРЕССУ»

THE WORKSHOP
“METHODS OF STUDDING ABIOTIC STRESS RESISTANCE MECHANISMS IN PLANTS”

СЕЗОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СОСТОЯНИЯ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА В ХЛОРОПЛАСТАХ «ВЕЧНОЗЕЛЕНЫХ» (КОРА, ПАРЕНХИМА ХВОИ) ТКАНЕЙ В ОЦЕНКЕ ФАЗ ЗИМНЕГО ПОКОЯ И УСТОЙЧИВОСТИ ДЕРЕВЬЕВ К НИЗКИМ ТЕМПЕРАТУРАМ

Н.А. Гаевский, Н.В. Пахарькова, Г.А. Сорокина
Сибирский федеральный университет, г. Красноярск, Россия,
e-mail: *nikgna@gmail.com*

Известно, что переход из активного состояния в состояние зимнего покоя сопровождается изменениями в фотосинтезирующих клетках коры и хвои. Эти изменения включают количество и соотношение пигментов, увеличение фракции ненасыщенных жирных кислот в мембранах, концентрации сахаров и белков криопротекторов в цитоплазме, изменения в структуре фотосинтетического аппарата (Öguist and Huner, 2003; Маслова и др., 2009).

Нулевой уровень флуоресценции хлорофилла в условиях постепенного (2,5° мин$^{-1}$) нагревания от 25-30 до75-80°С показывает термоиндуцированную кривую флуоресценции (ТИКФ). Начиная с работ U. Shreiber и его коллег (1977), ТИКФ используют для определения ФС-2 и для оценки структурной организации хлоропластов у вегетирующих растений (Downton, Berry, 1982; Гаевский и др., 1987, 1989). Также на основе характера ТИКФ можно определить находится ли растение в состоянии зимнего покоя или в активном состоянии. Низкотемпературный максимум на ТИКФ при 49-52°С летом указывает на снижение эффективности захвата энергии реакционным центром ФС-2 (Shreiber et al., 1978). Высокотемпературный пик флуоресценции при температуре близкой 60°С принадлежит ФС-1 в строме и ФС-2 в особых условиях (Гаевский и др., 1989). Отношение амплитуд низко- и высокотемпературного пиков обычно составляет от 2 до 3. Характер ТИКФ у коры и хвои в период зимнего покоя кардинально отличается от характера ТИКФ в период активной вегетации (Гаевский и др., 1991): низкотемпературный пик исчезает, когда как высокотемпературный пик увеличивается и смещается к 70-75°С. В переходные периоды (весна, осень) наблюдаются ТИКФ с переходными по отношению к зиме и лету показателями. Отсутствие низкотемпературного пика объясняют особым состоянием фотосинтетического аппарата в зимний период, при котором развиваются процессы, которые защищают хлорофилл-белковые комплексы от фоторазрушения (Oquist and Huner, 2003). Флуоресценция в области 75°С испускается всеми хлорофилл-белковыми комплексами после усиления их взаимодействия с липидной фазой мембран тилакоидов (Гаевский и др., 1991).

В коре отношение флуоресценции в низко- и высокотемпературном пиках увеличивается от 0,08 до 1,7 в период выхода растений из состояния зимнего покоя. Величину отношения можно использовать в качестве индикатора степени глубины зимнего покоя.

Ключевые слова: *хлорофилл, флуоресценция, термоиндуцированные изменения, зимний покой*

Публикация поддержана Российским фондом фундаментальных исследований совместно с Фондом научной и технологической поддержки Красноярского края (No. 15-44- 04132).

SEASONAL CHANGES IN PHOTOSYNTHETIC APPARATUS OF CHLOROPLAST IN «EVERGREEN» (BARC, PARENCHYMA OF NEEDLES) TISSUES IN THE EVALUATION OF WINTER DORMANCY PHASES AND TREES RESISTANCE TO LOW TEMPERATURES

N.A. Gaevsky, N.V. Pakharkova, G.A. Sorokina
Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia
e-mail: *nikgna@gmail.com*

It is well-established that during the transition from active vegetation into winter dormancy the photosynthesizing cells of needle and bark undergo a number of changes. These changes include: the amount and the proportions of pigments, an increase in the fraction of unsaturated fatty acids in membranes, in the concentration of saccharides and cryoprotective proteins proteins, changes in the structure of the photosynthetic apparatus (Öguist and Huner, 2003; Maslova et al., 2009).

The zero level of chlorophyll fluorescence in condition of gradual (2,5° min^{-1}) heating from 25-30 to 75-80 °C is shown by the chlorophyll fluorescence temperature curve (CFTC). This curve, starting with the study of U. Shreiber with colleagues (1977) is used for determination of the stability of PS-2 and for evaluation of the structural arrangement of chloroplasts in vegetating plants (Downton and Berry, 1982; Gaevsky et al., 1987, 1989). Also, based on the changes in the shape of the CFTC it can be deduced whether the plant is in the state of winter dormancy or is vegetating. Low-temperature maximum of fluorescence at 49-52°C in summer points to the lowering of the effectiveness of energy capturing by the reaction centers of PS-2 (Shreiber et al., 1978). The high-temperature fluorescence peak around 60°C originates from PS-1 in stroma and from PS-2 under specific conditions (Gaevsky et al., 1989). The ratio of the amplitudes of low-/high-temperature peaks ranges typically from 2 to 3. The CFTC for needles or bark during winter dormancy is drastically different that during active vegetation (Gaevsky et al., 1991): the low-temperature peak is absent, whereas the high-temperature peak rises and shifts to 70-75°C. In intermediate periods (spring or autumn) there were gradual changes in recording CFTC. The absence of the low-temperature peak is explained by a special state of the photosynthetic apparatus during the winter period due to reactions that protect the chlorophyll-protein complexes against a photodestruction (Oquist and Huner, 2003). Fluorescence around 75°C originates from chlorophyll-protein complexes after enhance interaction with the lipid phase of thylakoid membranes (Gaevsky et al., 1991).

For the period of winter dormancy the ratio of the low-/high-temperature peaks is around 0.08, increasing in bark to around 1.7 during the transition of plants to active metabolism. The calculated the ratio may be used as an indicator of the degree of the depth of winter dormancy.

Keywords: *chlorophyll, fluorescence, heat-induced change, winter dormancy*

Aknowlegment
The publication is supported by the Russian Foundation for Basic Research and Krasnoyarsk Region Science and Technology Support Fund (grant No. 15-44- 04132)

КРАТКОВРЕМЕННОЕ ДЕЙСТВИЕ НИЗКОЙ ПОЛОЖИТЕЛЬНОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ НА НАКОПЛЕНИЕ ФЛАВАНОВ В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ *IN VITRO* КЛЕТКАХ *CAMELLIA SINENSIS* L.

Т.Л. Нечаева, Н.В. Загоскина
Институт физиологии растения им. К.А. Тимирязева, г. Москва, Россия,
e-mail: *NechaevaTatyana.07@yandex.ru*

Устойчивость растений к различным стрессовым фактором, включая низкие положительные температуры, является следствием изменений многих физиолого-биохимических процессов. И в этом случае важная роль принадлежит фенольному метаболизму, при участии которого образуются различные по молекулярной массе мономерные, олигомерные и полимерные фенольные соединения (ФС). Установлено, что многие представители мономерных ФС, относящихся к фенилпропаноидам и флавоноидам, относятся к низкомолекулярным компонентамантиоксидантной системырастений.

Чайное растение (*Camellia sinensis* L.) обладает специализированным обменом, направленным на биосинтез ФС, содержание которых может достигать 30% на сухой вес. Основными компонентами его фенольного комплекса являются такие представители флавоноидов, как флаваны (ФЛ), представленные не только мономерными (катехины), но и олигомерными (проантоциадины; ПА) формами.Чайпроизрастаетпреимущественнов областях тропического и субтропического пояса стран Азии, Африки и Америки. Самой северной в мире зонойего выращиванияявляются субтропики Краснодарского края. В этом регионе часто отмечаются резкие перепады положительных температур, что оказывает негативное влияниена рост растений, особенно на начальных этапах вегетации, и, возможно на накопление в них ФС.

Целью исследования являлось изучение кратковременного действия низкой положительной температуры на накоплениефлавановвкаллусных культурах чая. Такой подход позволяет четко регулировать действие стрессового фактора и оценивать изменения в образовании ФС.

Каллусную культуру чайного растения выращивали при +24°С в темноте на питательной среде Хеллера, содержащей глюкозу (25 г/л) и 2,4–Д (5 мг/л). При проведении опытов, каллусы 20-дневного возраста (начало линейной фазы роста) переносили в камеру с низкой положительной температурой (+3°С) и выдерживали в течение 16 час. ФС извлекали из каллуснойткани контрольного и опытного вариантов 96% этанолом. Содержание ФЛ определяли с ванилиновым реактивом (поглощение при 500 нм), а содержание ПА - по реакции с кислым бутанолом (при 550 нм).

При кратковременном действии низкой температуры на каллусные культуры чая в них происходило значительное повышение накопления ПА, которое превышало таковое контроля в 1,8 раза. Что касается содержания флаванов, представляющих собой комплекс катехинов и ПА, то оно повышалось незначительно (10%).

Все вышеизложенное позволяет заключить, чтопосле кратковременного действия низкой положительной температуры в клетках чайного растения, культивируемых в условиях *in vitro*, активировался биосинтез проантоцианидинов - олигомерных форм катехинов.

Ключевые слова: чай, *Camellia sinensis* L.,каллусы, низкая положительная температура, флаваны, проантоцианидины.

BRIEF EFFECT OF LOW TEMPERATURE ON THE ACCUMULATION OF FLAVANS IN CULTURED *IN VITRO* CELLS *CAMELLIA SINENSIS* L.

T.L. Nechaeva, N.V. Zagoskina
Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia,
e-mail: *NechaevaTatyana.07@yandex.ru*

Resistance of plants to various stress factors, including low positive temperatures, is a consequence of changes in many physiological and biochemical processes. In this case, an important role is played on the phenolic metabolism, which participate in formation of various monomeric, oligomeric and polymeric phenolic compound (PhC). It is found that many of the monomeric PhC (flavonoids and phenylpropanoids) related to low-molecular components of the antioxidant system of plants.

The tea plant (*Camellia sinensis* L.) has a specialized exchange, directed to the biosynthesis of PhC, the content of which can be up to 30% on the dry weight. The major components of its phenolic complex are flavans (FL) containing monomeric (catechins), and oligomeric (proantotsiadiny; PA) forms. Tea plants grows mainly in tropical and subtropical zone of Asia, Africa and America. The most northern in the world its cultivation area is the subtropics Krasnodar region. In this region, often marked sharp differences of positive temperatures, which has a negative effect on plant growth, especially in the early stages of the growing season, and possible accumulation in their PhC.

The aim of the study was to investigate the short-term effect of low temperature on the accumulation offlavans in callus cultures of tea. This approach allows adjustment effect of stress factors and evaluate changes in the PhC education.

Callus cultures of tea plant were grown at +24°C in the dark on Heller medium containing glucose (25 g/l) and 2,4-D (5 mg/l). During the experiments, the calli (20 days of age; the beginning of the linear phase of growth) were transferred into the chamber with a low positive temperature (+3°C) and kept standing for 16 hours. PhC was exstracted from callus tissue of control and experimental options by 96% ethanol. PhC content was determined with vanillin reagent (absorbance at 500 nm) and PA content- by reaction with acidic butanol (at 550 nm).

At short-term effect of low temperatures on the calluses of tea there was a significant increase in the accumulation of PA, which is larger than that of control in 1.8 times. The content of PhC, representing a complex of catechins and the PA, it was increased slightly (10%).

All of the above leads to the conclusion that after a brief effect of low positive temperatures in the *in vitro* cultured cells of the tea plant was activated biosynthesisof proanthocyanidins - oligomeric forms of catechins.

Keywords: *tea, Camellia sinensis L., calli, low positive temperature, flavans, proanthocyanidins*

РАЗНЫЕ СТРАТЕГИИ СОЛЕУСТОЙЧИВОСТИ У ГАЛОФИТОВ ЮЖНОГО УРАЛА

З.Ф. Рахманкулова, Е.В. Шуйская
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва, Россия
e-mail: *zulfirar@mail.ru, evshuya@mail.ru*

Устойчивость галофитов к засолению зависит от контролируемости поглощения и компартментации ионов Na^+, K^+ и Cl^-, а также от синтеза органических “совместимых” растворенных веществ. Многие осмолиты, так же как и соединения антиоксиданты, и в том числе пролин и флавоноиды, защищают субклеточные структуры и макромолекулы от окислительного стресса, вызванного токсическим действием ионов. Исследовали четыре вида галофитов сем. Chenopodiaceae (*Artiplex tatarica* L., *Bassia sedoides* (Pall.) Aschers., *Atriplex verrucifera* M. Bieb, и *Kochia prostrata* (L.)), произрастающие на территории Южного Урала при разных уровнях засоления (умеренное и слабое). Определяли ростовые параметры, содержание пролина и флавоноидов, накопление ионов Na^+ и K^+ в надземной части растений. В пределах одной таксономической группы выявлены различные стратегии солеустойчивости, связанные с уровнем засоления почвы и особенностями соленакопления в побегах. Различия проявлялись в содержании протекторных соединений (пролина и флавоноидов) в зависимости от накопления ионов Na^+ и K^+ в побегах растений. Для характеристики участия данных соединений в процессах адаптации к засолению введено соотношение пролин/флавоноиды (Про/Фл). Наибольшее значение Про/Фл (4.9) показано для вида *A. tatarica*, характеризующегося зависимым от содержания натрия в почве соленакоплением в побегах, и произрастающим при небольшом засолении. Виды *B. sedoides*, *A. verrucifera*, *K. prostrata*, с независимым от уровня засоления почвы соленакоплением в побегах, обитали на более засоленных участках. У этих видов отношение Про/Фл составило 0.2–1.4, т.е. большую или равнозначную роль в протекторных механизмах играли флавоноиды, концентрация которых положительно коррелировала с содержанием K^+. У видов *B. sedoides* и *A. verrucifera* высокое содержание флавоноидов и K^+ является показателем высокой продуктивности и адаптированности к условиям обитания. Таким образом показано, что отношение Про/Фл у галофитов сем. Chenopodiaceae характеризует адаптивные стратегии, зависящие от особенностей соленакопления в растениях.

Ключевые слова: Chenopodiaceae, галофиты, засоление, адаптивные стратегии, пролин, флавоноиды

DIFFERENT SALT TOLERANCE STRATEGIES OF HALOPHYTES FROM SOUTH URAL

Z.F. Rakhmankulova, E.V. Shuyskaya
Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia; e-mail: *zulfirar@mail.ru*, *evshuya@mail.ru*

The tolerance of halophytes to salinity depends on the control of Na^+, K^+, and Cl^- ions uptake and their compartmentation, as well as on the synthesis of organic compatible soluble compounds. Many osmolytes and also antioxidant compounds, including proline and flavonoids, protect subcellular structures and macromolecules against oxidative stress induced by a toxic ion action. Four halophytes from the family Chenopodiaceae (*Artiplex tatarica* L. *Bassia sedoides* (Pall.) Aschers., *Atriplex verrucifera* M. Bieb, and *Kochia prostrata* (L.) Schrad.) inhabiting the territory of the South Urals at different levels (low and moderate) of salinity were studied. Growth parameters, the content of proline and flavonoids, Na^+ and K^+ ion accumulation in the shoots were analyzed. Within a single taxonomic group, different strategies of salt tolerance related to the level of soil salinity and specific features of salt accumulation in the shoots were revealed. Differences were manifested in the contents of protective compounds (proline and flavonoids) in dependence on the Na^+ and K^+ ions accumulation in the plant shoots. To characterize the participation of these compounds in plant adaptation to salinity, the ratio proline/flavonoids (Pro/Fl) was used. The highest value of Pro/Fl (4.9) was observed in *A. tatarica* growing at low salinity; in this plant, salt accumulation in the shoots depended on the sodium content in soil. Species *B. sedoides*, *A. verrucifera* and *K. prostrata* with salt accumulation in the shoots independent on the level of soil salinity, inhabited the regions with the higher salinity. In these species the ratio Pro/Fl was 0.2–1.4, i.e., flavonoids, which concentration was positively correlated with the K^+ content, played a great or equal to proline role in protective mechanisms. In *B. sedoides* and *A. verrucifera*, the high content of both flavonoids and K^+ ion are indices correlating with high productivity and adaptation to the environment. Thus, it was shown that the Pro/Fl ratio in halophytes of Chenopodiaceae characterizes the adaptive strategies depending on salt accumulation in plants.

Keywords: *Chenopodiaceae, halophytes, soil salinity, adaptive strategies, proline, flavonoids*

КЛЕТОЧНАЯ СЕЛЕКЦИЯ С ИОНАМИ ТЯЖЁЛЫХ МЕТАЛЛОВ ДЛЯ ОТБОРА ОСМОУСТОЙЧИВЫХ ФОРМ РАСТЕНИЙ

Л.Е. Сергеева, Л.И. Бронникова
Институт физиологии растений и генетики НАН Украины, г. Киев, Украина,
e-mail: *Zlenko_lora@ukr.net*

Дефицит растительных форм с повышенным уровнем стрессоустойчивости становится всё более острым, несмотря на многочисленные усилия и капиталовложения. Поэтому проблема требует существенной модификации имеющихся биотехнологий.

Повышающие устойчивость генетические изменения в интактном растении, а также происходящие в результате культивирования *in vitro*, делаются ключевыми. В случае создания адекватной селективной системы и выбора стресс-моделирующего агента метод может стать приоритетным для получения клеток с уникальными характеристиками.

Нами было предложено применять ионы тяжёлых металлов (ИТМ) в клеточной селекции. В частности, использовать свойства ионов Ba^{2+} и Cd^{2+} для отбора форм, устойчивых к засолению и водному дефициту. Известно, что катионы Ba^{2+} являются ингибиторами перемещения ионов K^{+}; катионы Cd^{2+} существенно влияют на транспорт воды в клетку. На селективных средах, содержащих летальные для клеточных культур дозы катионов Ba^{2+} и Cd^{2+}, были отобраны клеточные линии табака, сои, пшеницы с комплексной устойчивостью. Ba-устойчивые линии растений выдерживали летальное засоление (соли морской воды). Cd-устойчивые варианты росли в условиях водного стресса (маннит).

Регенеранты R0 и семенное поколение R1 табака также были устойчивы к осмотическим стрессам *in vitro* и *in vivo*. Клеточная селекция с использованием ИТМ может стать перспективным методом получения форм с повышенным уровнем осмоустойчивости.

Ключевые слова: ионы тяжёлых металлов; клеточная селекция; осмоустойчивость

CELL SELECTION WITH HEAVY METAL IONS FOR OBTAINING OSMORESISTANT PLANT FORMS

L. Sergeeva, L. Bronnikova
Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine, e-mail: *Zlenko_lora@ukr.net*

Genetic changes can be the reason for higher stability. Desirable mutation may occur in the intact plant or it appears during *in vitro* cultivation. In any case this event is rare. Cell selection, as a method, gives the opportunity to detect the single cell with required feature. We propose to select cells with combined stress resistance via cell selection with heavy metal ions (HMI).

Ba^{2+} and Cd^{2+} cations were used for obtaining osmoresistant forms. Ba^{2+} is a well-known inhibitor of K^{+} transport. Cd^{2+} represses the water penetration. Tobacco, wheat and soybean cell lines were obtained on selective media with the addition of lethal doses of these cations. Ba^{2+}-resistant cultivars challenged the lethal salinity (sea water salts). Cd^{2+}-resistant variants grew under water stress (mannitol). The combined resistance of selected lines did not reduce during long time cultivation under various conditions.

Tobacco regenerants R0 and R1 progeny grew under *in vitro* salinity pressure or *in vivo* drought. Cell selection with HMI guarantees the obtaining of forms with high level of osmoresistance

Keywords: *heavy metal ions, cell selection, osmoresistance*

СТАБИЛЬНОСТЬ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОГО РАВНОВЕСИЯ КАК ИНДИКАТОР УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К СТРЕССОРАМ ФИЗИЧЕСКОЙ ПРИРОДЫ

Ю.В. Синицына, И.В. Стручкова, А.П. Веселов
Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, г. Нижний Новгород, Россия; e-mail: *jsin@inbox.ru*

Универсальной реакцией растительной клетки на действие неблагоприятных факторов является активизация окислительных процессов, провоцирующая дальнейшие колебания прооксидантно-антиоксидантного равновесия. Амплитуда и длительность таких возмущений зависят от физиолого-биохимических особенностей растения (популяции, вида, сорта) и природы стрессирующего фактора. Не для всех стрессоров физической природы (повышенной и пониженной температуры, электромагнитного излучения, радиационного излучения, избыточной инсоляции и пр.) известны компоненты клеточных рецепторов и сигнальных систем, отвечающих за восприятие сигнала внешней среды и в последствии инициирующих развитие ответных реакций. Вероятнее всего, во всех этих случаях в систему восприятия и переработки информации включены активные формы кислорода, выступающие одновременно как сигнальные молекулы и индукторы окисления. В связи с этим, характеристика динамики окислительных (прооксидантных) и антиоксидантных процессов широко используется в научных исследованиях для тестирования устойчивости растений к стрессирующим воздействиям. К настоящему времени в науке наработан довольно богатый набор лабораторных методов исследования систем поддержания перекисного гомеостаза растительной клетки, в том числе: определение концентрации активных форм кислорода (супероксидного анион-радикала, пероксида водорода), продуктов липопероксидации (промежуточных - диеновых конъюгатов, гидропероксидов жирных кислот, малонового диальдегида; конечных - оснований Шиффа), продуктов перекисного окисления белков, активности ферментов (супероксиддисмутазы, различных пероксидаз, каталазы, глутатион трансферазы), содержания низкомолекулярных антиоксидантов (каротиноидов, глутатиона, аскорбата и др.).

Среди сложностей, с которыми может столкнуться исследователь данной проблематики, можно отметить неполную специфичность некоторых методик (определение содержания глутатиона на самом деле может выявить всю сумму низкомолекулярных HS-соединений); наличие мешающих веществ, искажающих результат, от которых невозможно полностью избавиться в процессе пробоподготовки; "перекрещивание" некоторых окислительно-восставительных процессов из-за наличия общих компонентов реакций (так, глутатион является субстратом для нескольких ферментов), что провоцирует ошибки в интерпретации полученных результатов; высокую скорость колебаний прооксидантно-антиоксидантного равновесия, что требует тщательного продумывания пробоподготовки, чтобы не исказить регистрируемые показатели. Наконец, систему поддержания перекисного гомеостаза некорректно изучать по одному показателю, более адекватную картину событий можно обнаружить, используя одновременно целый комплекс разных методик.

Ключевые слова: *прооксидантные и антиоксидантные процессы, перекисный гомеостаз*

Исследования поддержаны проектом №2575 Задания № 2014/134 на выполнение государственных работ в сфере деятельности в рамках базовой части государственного задания.

STABILITY OF PROOXIDANT-ANTIOXIDANT BALANCE AS AN INDICATOR OF PLANT RESISTANCE TO PHYSICAL STRESSORS

Yu.V. Sinitsyna, I.V. Struchkova, A.P. Veselov
Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russia,
e-mail: *jsin@inbox.ru*

Oxidative processes activation provoking further fluctuations of prooxidant-antioxidant balance is the universal plant cell reaction to adverse factors action. The amplitude and duration of these fluctuations depend on the physiological and biochemical characteristics of plant (population, species, cultivar) and stressing factor type. The components of cell receptors and signaling systems responsible for the environment signal perception and response reactions initiation for physical stressors (high and low temperature, electromagnetic radiation, radioactive influence, excessive insolation, etc.) are not fully understood yet. Probably, active oxygen species both as signaling molecules and oxidation inductors are included in all these systems of information perception and processing. In this connection, the oxidizing (prooxidant) and antioxidant processes dynamic study is widely used in researches connected with testing plant resistance to stressful factors. To date, there is a rich set of laboratory methods maintain peroxide homeostasis of plant cell including quantitative determination of reactive oxygen species (superoxide anion radical, hydrogen peroxide), lipid peroxidation products (diene conjugates, fatty acids hydroperoxides, malondialdehyde, Schiff bases), protein peroxidation products, low molecular weight antioxidants (carotenoids, glutathione, ascorbate, etc.); enzymatic activity determination (superoxide dismutase and various peroxidases, catalase, glutathione transferase).

Difficulties to be noted for researchers are: lowered specificity of some methods (glutathione content determination may reveal full amount of low molecular weight HS-compounds); presence of interfering substances distorting results but impossible to be completely excluded from sample preparation process; some redox processes "crossings" due to shared reaction components (for example, glutathione is a substrate for several enzymes) which trigger errors in results interpretation; high speed of prooxidant-antioxidant balance oscillations requires to be careful during sample preparation procedures in order not to distort recorded scientific data. Finally, the system of peroxidation homeostasis maintenance can not be examined with one indicator, more adequate pattern of events can be detected using whole range of different methods simultaneously.

Keywords: *oxidizing and antioxidant processes, peroxidation homeostasis*

Aknowlegment
Research supported by the project №2575 2014/134 to perform public works in the sphere of activities of the base part of the state task (Russian Federation).

ОТДЕЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ХОЗЯЙСТВЕННОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ ЯБЛОНИ

М.К. Скрипникова, Е.В. Скрипникова
Мичуринский государственный аграрный университет, г. Мичуринск, Россия,
e-mail: *skr.m@mail.ru*, *elena.sk@mail.ru*

Основная плодовая порода нашей страны - яблоня. В России возделывается около 300 сортов. Одним из важнейших хозяйственно-ценных признаков сорта является его урожайность.

Урожайность – сложный комплексный показатель, компоненты которого контролируются различными генетическими системами, по-разному отзываются на отбор и факторы внешней среды. Чтобы ими управлять, необходимо детально изучить физиологическую природу факторов, от которых зависит уровень общей и хозяйственно-полезной продуктивности растительного организма, его способность наиболее эффективно использовать условия жизни.

Согласно общепринятой теории продукционного процесса, в основе энергетических основ урожая лежит фотосинтетическая продуктивность деревьев, одним из основных компонентов которой является чистая продуктивность фотосинтеза. Мы провели оценку фотосинтетической продуктивности яблони более чем у 100 сортов и выявили, что размах варьирования данного показателя лежит в пределах 4,5 – 15,0 г/м^2 в сутки. На величину данного показателя влияют многие факторы, в том числе генотип привоя и подвоя (при трёхкомпонентной системе дерева и интеркаляр), многочисленные внешние факторы. Снижение продуктивности фотосинтеза может произойти под влиянием любого неблагоприятного воздействия, но максимально возможная продуктивность – это, несомненно, высокий продукционный потенциал генотипа и высокая степень соответствия генотипа и внешних факторов. Поэтому высокая среднегодовая чистая продуктивность фотосинтеза характеризует не только продукционный потенциал сорта, но и его адаптационный потенциал.

Однако энергетические возможности растения сформировать высокий хозяйственно-ценный урожай далеко не всегда совпадают с реальностью. Это может быть связано со многими причинами. Одной из них могут быть весенние заморозки. По устойчивости к заморозкам сорта яблони, возделываемые в Центральной России, значительно различаются между собой. Многолетние наблюдения в естественных условиях, а также в условиях искусственного моделирования заморозков, путём помещения срезанных ветвей на разных этапах развития цветков в условия холодильной камеры, показали, что характер и количество повреждений зависят от биологических особенностей сорта.

Анализ полученных экспериментальных данных позволяет утверждать:

урожайность сорта – это результат проявления различных генотипических качеств;

при формировании урожая его максимально возможный потенциал создаётся за счёт фотосинтеза;

реальный урожай формируется под влияние различных факторов, среди которых немаловажное значение имеет генотипическая устойчивость генеративной сферы к заморозкам;

различия между сортами по данному показателю весьма существенны,

для стабилизации хозяйственной продуктивности яблоневых насаждений необходимо вести селекцию на повышение устойчивости генеративной сферы яблони к поздневесенним заморозкам; в качестве источников селекции несомненный интерес представляют сорта Орлик, Орловское полосатое. Антоновка обыкновенная, Вишневое;

для стабилизации продуктивности яблоневых садов при их закладке нужно выбирать сорта, способные мобилизовать резервные механизмы самоплодности: самосовместимость, апомиксис, партенокарпию.

Ключевые слова: *фотосинтез, урожайность, фотосинтетическая продуктивность*

SELECTED INDICATORS OF APPLE TREES' ECONOMIC PRODUCTIVITY

M.K. Skripnikova, E.V. Skripnikova
Michurinsk State Agrarian University, Michurinsk, Russia, e-mail: *skr.m@mail.ru*, *elena.sk@mail.ru*

The main fruit species in our country is an apple tree. It is cultivated about 300 varieties in Russia. One of the most important agronomic characteristics of the variety is its productivity. Productivity is a complicated complex index. The components of it are controlled by different genetic systems and respond to environmental factors in different way. To manage them you need to study in details the nature of the physiological factors that determine the level of general and economic-useful productivity of the plant organism, its ability to most effectively use of the living conditions.

According to the generally accepted theory of the production process, the photosynthetic productivity of trees is the base for energy crops. A major component of photosynthetic productivity of trees is the net productivity of photosynthesis. We have evaluated the photosynthetic productivity of apple trees more than 100 varieties and found that the range of variation of this indicator lies in the range of 4.5 - 15.0 g/m^2 in a day. The magnitude of this index is influenced on by many factors including genotype of the scion and rootstock (with three-component system of a tree and interkalyar), numerous external factors. Reduced productivity of photosynthesis can occur under the influence on any adverse effects but the maximum possible efficiency is undoubtedly a high production of potential genotypes and a high degree of compliance with the genotype and environmental factors. Therefore, a high average of an annual net productivity of photosynthesis characterizes not only the potential productivity of the variety but its adaptive capacity.

However, the energy potential of plants to generate high economic-valuable crop does not always coincide with the reality. It may be due to many reasons. One of them may be spring frosts. In terms of resistance to frost apple varieties cultivated in Central Russia considerably differ from each other. Long-term observations in the natural environment, as well as under artificial frost simulation by placing cut branches at different stages of flower development in the refrigeration chamber conditions have shown that the nature and the amount of damage depend on the biological characteristics of varieties.

The analysis of the experimental data suggests:

• yield varieties is the result of manifestations of different genotypic qualities;

• the formation of the harvest of its maximum possible capacity is created by the photosynthesis;

• the real harvest is formed under the influence of various factors among which considerable importance is the genotypic resistance to frost generative sphere;

• differences between varieties of this indicator are very important,

• to stabilize the economic productivity of apple plantations you need to conduct a selection to increase the stability of generative sphere of apple to late spring frosts; as the selection of sources of undoubted interest are the varieties Orlik, Orel striped, Antonovka, Cherry;

• to stabilize the productivity of apple orchards at their establishing you should select varieties able to mobilize the reserve mechanisms of self-productivity: compatibility, apomixis parthenocarpy.

Keywords: *photosynthesis, productivity, photosynthetic productivity*

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENT

ПЛЕНАРНЫЕ ДОКЛАДЫ…….....9

СЕКЦИЯ 1. Изучение биоразнообразия растений
in vitro, in situ и *ex situ*..…….....17

СЕКЦИЯ 2. Клональное микроразмножение растений: теоретические
и прикладные аспекты……73

СЕКЦИЯ 3. Создание коллекций растений *in vitro*,
методы сохранения генофонда……....145

СЕКЦИЯ 4. Молекулярно-генетические методы в
изучении биоразнообразия растений……..169

СЕКЦИЯ 5. Биохимические исследования растительного генофонда,
получение и использование биологически активных
веществ…….201

СЕКЦИЯ 6. Физиологические аспекты развития и устойчивости
растений……251

СЕКЦИЯ 7. Репродуктивная биология растений в сохранении
биоразнообразия…….....303

СЕМИНАР «Методы изучения механизмов устойчивости растений к абиотическому
стрессу»…….325

СОДЕРЖАНИЕ…….....339

АЛФАВИТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ АВТОРОВ……...343

PLENARY REPORTS…….....9

SECTION 1. Investigations of plant biodiversity *in vitro, in situ* and *ex situ*…….....17

SECTION 2. Clonal micropropagation of plants: theoretical and applied aspects……73

SECTION 3. Creation of *in vitro* plant collections, methods for germplasm conservation……145

SECTION 4. Molecular genetics techniques for plant biodiversity studies……169

SECTION 5. Biochemical studies of plant germplasm; synthesis and usage of biological active substances……..201

SECTION 6. Physiological aspects of plants development and resistance…….....251

SECTION 7. Plant reproductive biology in biodiversity conservation……303

THE WORKSHOP "Methods of studding abiotic stress resistance mechanisms in plants"……325

CONTENT……339

AUTHORS ALPHABET LIST……343

АЛФАВИТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ АВТОРОВ

AUTHORS ALPHABET LIST

Абдулалишоева С.Ф. 74
Азарова А.Б. 76
Акулов А.Н. 58, 202
Алаторцева Т.А. 304
Албантова А.А. 280
Алейнова О.А. 170, 178, 226
Алексеева Е.И. 204
Алтаева Н.А. 18
Аменов А.А. 12, 188
Андронова Е.В. 172, 310
Апанасова Н.В. 304
Аралбаева М.М. 152
Ахалкатси М.Ш. 24
Ахмадов А.Х. 78
Ахметова А.Ш. 86
Багманян И.А. 232
Бадулина А.А. 248
Банаев Е.В. 228
Бараева Н.А. 174
Баранова О.Г. 38
Баринова Ю.Л. 126
Батукаев А.А. 78
Батукаев М.С. 78
Бекузарова С.А. 306
Белова М.М. 80
Белоусов В.В. 298
Березина Е.В. 126, 206, 210
Бехтерев В.Н. 208
Бинюков В.И. 280
Блуфард А.С. 296
Блюднева Е.А. 150
Бободжанова Х.И. 20, 74
Бойко Е.В. 212
Болдина О.Н. 30
Болквадзе Ц.В. 146
Большакова Е.В. 100
Боме А.Я. 22
Боме Н.А. 22
Бояркина С.В. 66
Браилко В.А. 252
Брилкина А.А. 126, 206, 210
Бронникова Л.И. 332
Букин Ю.С. 66
Бурлакова Е.Б. 266
Бурханова Г.Ф. 56, 256
Быстрова Е.И. 268
Вайновская И.Ф. 160
Васильева О.Г. 156
Васько П.П. 182
Ведяшкина О.А. 100
Верулидзе Г.Р. 146
Верхотуров В.В. 66, 244
Веселов А.П. 206, 210, 334
Веселов Д.С. 254
Веселов С.Ю. 254
Веселова С.В. 56, 256
Видершпан А.Н. 212
Виноградова Г.Ю. 308
Виноградова С.В. 174
Власова А.Б. 160
Волков Я.А. 176
Володин В.А. 176
Володина Н.А. 212
Воронков А.С. 260
Гаевский Н.А. 326
Галин И.Р. 122
Гарипова С.Р. 258
Гарифуллина Д.В. 258
Гвасалия М.В. 96
Гогинашвили Н.В. 24
Головацкая И.Ф. 212
Голощапов А.Н. 266
Гончарук Е.А. 260
Гориславец С.М. 176
Горчакова Ю.А. 260
Горшкова Е.М.120
Горшкова Т.А. 276, 294
Граскова И.А. 236
Гребенникова О.А. 252
Гречкин А.Н. 296
Грошева Е.В. 26
Губаз С.Л. 96
Губанова Т.Б. 262
Гумерова Е.А. 58, 202
Данилова А.Н. 64,188
Дерябин А.Н. 264
Доанг Жанг 130
Долгов С.В. 186, 190
Домблидес А.С. 28
Домблидес Е.А.28
Дубровина А.С. 170, 178, 226, 284
Евдокимова Е.Е. 310
Евсеева Н.В. 150
Евтюгин В.Г. 58
Егорова И.Н. 30, 148
Егорова Н.А. 82, 140
Еникеев А.Г. 214
Еремеева Е.Н. 216
Жданова И.В. 46
Железниченко Т.В. 248
Живетьев М.А. 236
Жигачева И.В. 266
Жигачева И.В. 280
Жоламанова С.Ж. 152
Жужжалова Т.П. 224

Жуковская Н.В. 268
Загоскина Н.В. 218, 328
Зайцев Д.Ю. 122
Зайцева И.А. 312
Зайцева Ю.Г. 84
Закубанский А.В. 180
Замятнин (мл.) А.А. 220
Зарипова А.А. 86
Заячковская Т.В. 28
Землянухина О.А. 88, 222
Зибарева Л.Н. 248
Зинатуллина А.Е. 314
Зобова Н.В. 292
Зыкова В.К. 32
Ибрагимов Р.И. 300
Иваницкая А.С. 110
Иванов В.Б. 268
Иванова Н.Н. 46, 90
Иванчина Н.В. 258
Ильницкий О.А. 272
Искакова А.Б. 18, 292
Калаев В.Н. 88, 222
Калашникова Е.А. 132, 224, 286
Календарь Р.Н. 12, 64, 188
Кан Л.Ю. 28
Карашолакова Л.Н. 152
Карсункина Н.П. 108, 282, 286
Касимова Р.И. 300
Кашин А.С. 150
Киракосян Р.Н. 224
Киселев К.В. 170, 178, 194, 226, 284
Клименко З.К. 32
Клушевская Е.С. 270
Ковальчук И.Ю. 162
Ковзунова О.В. 248
Козмик Р.В. 52
Коломиец Т.М. 96, 208
Комжа А.Л. 306
Кондратьева А.М. 196
Кондрацкая И.П. 182
Коновалова Л.Н. 94, 154, 156
Коновалова Т.Ю. 34
Корнацкий С.А. 36
Коротков О.И. 130
Коротцева И.Б. 28
Корсакова С.П. 272
Костиков Д.К. 228, 230
Костикова В.А. 230
Костюкова Ю.А. 58
Кочерыгина Е.В. 236
Кочиева Е.З. 192
Кочкин Д.В. 242
Крахмалева И.Л. 156
Кривошеев М.М. 320
Крицкая Т.А. 150
Круглова Н.Н. 122
Кудоярова Г.Р. 254
Кудрявцев А.М. 192
Кудрявцева Л.П. 50
Кузнецова Е.Н. 38
Кузнецова Н.Ф. 40, 270
Кузьмина Т.Н. 322
Кукушкина Т.А. 228
Купешев Ж.С. 10, 64
Куприянов А.Н. 42
Курченко В.П. 232
Кухарчик Н.В. 74
Кучер Е.Н. 274, 298
Кучина Т.Г. 92
Кушнаренко С.В. 152
Лайков А.В. 58
Лапшин П.В. 218
Ларионова О.Е. 292
Ларская И.А. 274, 294
Ласточкина О.В. 278
Лебедев В.Г. 76
Леонов М.П. 290
Лесникова-Седошенко Н.П. 46
Логачёва М.Н. 58
Лукаткин А.С. 100
Любимова Е.И. 94
Machs E.M. 173
Mishustina S.A. 153
Mapelli Sergio 53
Mattana Monica 53
Максимов И.В. 56, 256, 300
Малаева Е.В. 154
Маляровская В.И. 96, 174, 208
Манаков Ю.А. 44
Манвелидзе З.К. 24
Мапелли Сержио 52
Марко Н.В. 66, 234
Маркова О.В. 258
Маркова Ю.А. 236
Маслова М.В. 26
Маттана Моника 52
Мачс Э.М. 172
Машкина О.С. 98
Медведева Ю.В. 212
Мельникова Н.Е. 126
Мемиадзе Н.В. 24
Миль Е.М. 280
Минчева Е.В. 30
Мирошниченко Н.Н. 316
Митрофанова И.В. 10, 46, 82, 90, 180, 252, 322

Митрофанова О.В. 46, 180
Митюшкина Т.Ю. 190
Мишустина С.А.152
Мокшин Е.В. 100
Молканова О.И. 118, 156
Мурасева Д.С. 158
Муратова С.А.102, 112, 124
Мухаметвафина А.А. 86
Набиева А.Ю 104
Нам И.Я. 182
Нгуен Т.Ф. 244
Нечаева Т.Л. 218, 328
Никитина Е.В. 106
Никифоров А.Р. 46
Никифорова Н.В. 108, 282
Николаева Т.Н. 218
Новаковская А.П. 12
Новиков А.В. 48
Новикова Т.И. 84, 158
Носов А.М. 242
Нужная Т.В. 256
Овчинникова В.Н. 108, 282
Огнева З.В. 284
Омеличкина Ю.В. 66
Осин Ю.Н. 58
Осокина Н.В. 286
Пак М.Э. 110
Палий А.Е. 238, 252
Папихин Р.В. 102, 112
Пахарькова Н.В. 326
Пенкина М.В. 278
Перфильева А.И.288
Петров А.Н. 244
Пищева Г.Н. 114
Плаксина Т.В. 116
Плугатарь Ю.В. 272
Полубоярова Т.В. 104
Полякова Т.А. 230
Праздников В.Р. 118
Пролётова Н.В. 50
Пусенкова Л.И. 278
Пынтя М.А. 318
Пынтя М.А. 52
Работягов В.Д. 238
Рахимбаев И.Р. 152
Рахманкулова З.Ф.330
Решетник Г.В. 290
Решетников В.Н. 134, 160
Ржевский С.Г. 196
Рипбергер Е.И. 22
Рисованная В.И. 176
Рихванов Е.Г. 288
Рожанская О.А. 54, 120
Ромаданова Н.В. 152
Румянцев С.Д. 56
Румянцева Н.И. 58, 202
Рущук А.Д. 62
Саймова А.С. 110
Сакалы Н.И. 52
Сальников В.В. 58
Самарина Л.С. 174
Сафронова Г.И. 130
Сахарова А.Н. 184
Сельдимирова О.А. 122
Семенов А.А. 214
Семенов А.В. 310
Сергеева Л.Е. 332
Сидорова Т.Н. 186
Синицына Ю.В. 334
Скрипникова Е.В. 60, 336
Скрипникова М.К. 60, 336
Снигирь Е.А. 184
Собчук Н.А. 298
Соколенко Г.Г. 240
Соколова Л.Б. 306
Солопов В.А. 112, 124
Сорокина Г.А. 326
Сосина А.В. 124
Спивак В.А. 150
Спиридович Е.В. 160
Ставцева И.В. 82
Стахеева Т.С. 156
Степанова А.И.128
Столепченко В.А. 182
Стручкова И.В. 126, 334
Ступко В.Ю. 292
Субботина Н.С. 102
Сумарукова О.В. 48
Супрунова Т.П. 184
Сурманидзе Д.Д. 24, 146
Сушинская Н.В. 232
Табацкая Т.М. 98
Тагиманова Д.С. 12, 188
Терехин В.Е. 210
Терлецкая Н.В. 292
Тимербаев В.Р. 190
Тимин О.Ю.62
Тимина О.О. 62
Тимофеева С.Н. 128
Тохтарь В.К. 130
Тохтарь Л.А. 130
Третьякова И.Н. 110
Трифонова А.А. 192
Трофимова О.И. 276
Трофимова О.И. 294
Трунова Т.И. 264

Тургунов М. 106
Турдиев Т.Т. 162
Туржанова А.С. 12
Тхао Нгуен Тхьи Фыонг 132
Тюнин А.П. 194
Увашов А.О. 12
Уразова Т.С. 120
Федина Е.О. 296
Федулова Т.П. 196
Феоктистова Я.А. 320
Фершалова Т.Д. 104
Филипеня В.Л. 134, 164
Филиппов Е.Г. 172
Филюшин М.А. 198
Фоменко Т.И. 160
Фролов С.Н. 162
Фурсова А.И. 274
Хай Нгуен Тхань 132
Хайруллин Р.М. 258
Ханды М.Т. 242
Хапилина О.Н. 12, 64, 188
Химич Г.А. 28
Хохлов С.Ю. 90
Христенко В.С. 170, 178
Цивилева О.М. 244
Цыбуля Н.В. 246
Чавдарь Н.С. 62
Челомбит С.В. 46, 180, 252
Чередниченко М.Ю. 80, 92, 124
Черкасова Н.Н. 222
Чернец А.М. 166
Чернышова М.П. 244
Чечёткин И.Р. 296
Чигинцова А.Е. 212
Чижик О.В. 134, 164, 182
Чирков С.Н. 180, 252
Чмелева С.И. 274, 290, 298
Шарипова Г.В. 254
Шафикова Т.Н. 66
Шевченко С.В. 322
Шевчук О.М. 68
Шевырева Н.А. 34
Шестибратов К.А. 76
Шилова Т.В. 120
Шипунова А.А. 136
Шмыкова Н.А. 28
Шплихалова А.В. 274
Шуйская Е.В. 70, 330
Эрст А.А. 248
Юдакова О.И. 128
Юдинцев А.В. 126
Юлдашев Р.А. 278
Юрасов Н.А. 244
Юрлова А.В. 126
Юхимук А.Н. 160
Якимова О.В. 138
Ярин А.Ю. 296
Яруллина Л.Г. 300
Яруллина Л.М. 300

Abdulalishoeva S.F. 75
Ahmadov A.Kh. 79
Akhalkatsi M. 25
Akhmetova A.Sh. 87
Akulov A.N. 59, 203
Alatortseva T.A. 305
Albantova A.A. 281
Alekseeva H. 205
Aleynova O.A. 171, 179, 227
Al-Melhem S.144
Al-Sabah L. 144
Altayeva N. 19
Amenov A.A. 13, 189
Andronova E.V. 173, 311
Apanasova N.V. 305
Aralbaeva M.M. 153
Ashkanani J.144
Azarova A.77
Badulina A.A. 249
Bagmanyan I.A. 233
Banaev E.V. 229
Baraeva N.A. 175
Baranova O.G. 39
Barinova Yu.L. 129
Batukaev A.A. 79
Batukaev M.S. 79
Bekchterev V.N. 209
Bekuzarova S.A. 307
Belousov V.V. 299
Belova M.M. 81
Berezina E.V. 129, 207, 211
Binyukov V.I. 281
Blufard A.S. 297
Blyudneva E.A. 151
Bobkova N.V. 125
Bobodzhanova Kh.I. 21, 75
Boldina O.N. 31
Bolkvadze Ts.V. 147
Bolshakova E.V. 101
Bome A.Y. 23
Bome N.A. 23
Boyarkina S.V. 67
Boyko E.V. 213
Brailko V.A. 253
Brilkina A.A. 129, 207
Brilkina A.A. 211
Bronnikova L. 333
Bujazha Diego 143
Bukin Yu.S. 67
Burkhanova G.F. 257
Burkhanova G.F. 57
Burlakova E.B. 267
Bystrova Elena 269
Chavdar N.S. 63
Chechetkin I.R. 297
Chelombit S.V. 47, 181, 253
Cherednichenko M.Yu. 127
Cherednichenko M.Yu. 81, 93
Cherkasova N.N. 223
Chernyshova M.P. 245
Chigintsova A.E. 213
Chirkov S.N. 181, 253
Chizhik O.V. 137, 165, 183
Chmeleva S.I. 275, 291, 299
Cozmic Radu V. 53
Danilova A.N. 65, 189
Deryabin Alexander 265
Doang Zhang 133
Dolgov S.V. 187, 191
Domblides Arthur S. 29
Domblides Elena A. 29
Dradi Giuliano 143
Dubrovin A.S. 171, 179, 227, 285
Egorova I.N. 31, 149
Egorova N.F. 83, 141
Enikeev A.G. 215
Eremeeva E.N. 217
Erst A.A. 249
Evdokimova E.E. 311
Evseeva N.V. 151
Evtyugin V.G. 59
Fedina E.O. 297
Fedulova T.P. 197
Feoktistova Ya.A. 321
Fershalova T.D. 105
Filipenia V.L. 137, 165
Filippov E.G. 173
Filyushin M.A. 199
Fomenko T.I. 161
Frolov S.N. 163
Fursov A.I. 275
Furuichi T. 254, 255
Gaevsky N.A. 327
Galin I.R. 123
Garifullina D.V. 259
Garipova S.R. 259
Goginashvili N.25
Goloschapov A.N. 267
Golovatskaya I.F. 213
Goncharuk E.A. 261
Gorchakova Y.A. 261
Gorshkova E.M. 121
Gorshkova T.A. 277, 295
Goryslavets S.M. 177

Graskova I.A. 237
Grebennikova O.A.253
Grechkin A.N. 297
Grosheva E.V. 27
Gubanova T.B. 263
Gubaz S.L. 97
Gumerova E.A. 59, 203
Gvasalia M. 97
Hai Nguyen Thanh 135
Hairullin R.M. 259
Ibragimov R.I. 301
Ilnitsky O.A. 273
Iskakova A.17, 293
Ivanchina N.V. 259
Ivanitskaya A.S. 111
Ivanov Victor 269
Ivanova N.N. 47, 91
Jain S. Mohan 14
Jibi S.144
Kalaev V.N. 89, 223
Kalashnikova E.A. 135, 225, 287
Kalendar R.N. 13, 65, 189
Kamenetsky Rina 142
Kan Ludmila Y. 29
Karsunkina N.P. 109, 283, 287
Kashin A.S. 151
Kasimova R.I. 301
Katsuhara M. 254, 255
Khandy M.T. 243
Khapilina O.N. 13, 65, 189
Khimich Galina A. 29
Khokhlov S.Y. 91
Khristenko V.S. 171, 179, 227
Kirakosyan R.N. 225
Kiselev K.V. 171, 179, 195, 227, 285
Klushevskaya E.S. 271
Klymenko Z.K. 33
Kocherygina E.V. 237
Kochieva E.Z. 193
Kochkin D.V.243
Kolomiets T.M. 97, 209
Komga A.L. 307
Kondratskaya I.P. 183
Kondratyeva A.M. 197
Konovalova L.N. 95, 15, 157
Konovalova T.Yu. 35
Kornatskiy S.A. 37
Korotkov O.I. 133
Korotseva Irina B. 29
Korsakova S.P. 273
Kostikov D.K. 229, 231
Kostikova V.A. 231
Kostyukova Yu.A. 59
Kovalchuk I.Y. 163
Kovzunova O.V. 249
Krakhmalyova I.L. 157
Kritskaya T.A. 151
Krivosheev M.M. 321
Kruglova N.N. 123
Kucher E.N. 275, 299
Kuchina T.G. 93
Kudoyarova G.R. 255
Kudryavtsev A.M. 193
Kudryavtseva L.P. 51
Kukharchik N.V. 75
Kukushkina T.A. 229
Kupeshev Z.S. 13, 65
Kuprijanov A.N. 43
Kurchenko V.P. 233
Kusmina T.N. 323
Kuznetsova N.F. 41, 271
Kuznetsova E.N. 39
Laikov A.V. 59
Lambardi Maurizio 15
Lapsin P.V. 219
Larionova O.Ye. 293
Larskaya I.A. 277, 295
Lastochkina O.V. 279
Lebedev V.77
Leonov M.P. 291
Lesnikova-Sedoshenko N.P. 47
Logacheva M.N. 59
Lukatkin A.S. 101
Lyubimova E.I. 95
Maksimov I.V. 257, 301
Maksimov I.V. 57
Malaeva E.V. 155
Malyarovskaya V.I. 97, 175, 209
Manakov Yu.A. 45
Manvelidze Z.25
Marko N.V. 69, 235
Markova O.V. 259
Markova Y.A. 237
Mashkina O.S. 99
Maslova M.V. 27
Medvedeva Yu.V. 213
Melnikova N.E. 129
Memiadze N. 25
Meneghini Massimiliano 143
Mil E.M. 281
Mincheva E.V. 31
Miroshnichenko N.N. 317
Mitiouchkina T.Yu. 191

Mitrofanova I.V. 11, 47, 83, 91, 181, 253, 323
Mitrofanova O.V. 47, 181
Mokshin E.V. 101
Molkanova O.I. 119, 157
Mukhametvafina A.A. 87
Muraseva D.S. 159
Muratova S.A. 103, 113, 125
Nabieva A.Yu. 105
Nam I.Y. 183
Nechaeva T.L. 219, 329
Nguyen T.P. 245
Nikiforov A.R. 47
Nikiforova N.V. 109, 283
Nikitina E.V. 107
Nikolaeva T.N. 219
Nosov A.M. 243
Novakovskaya A.P. 13
Novikov A.V. 49
Novikova T.I. 85, 159
Nuzhnaya T.V. 257
Ogneva Z.V. 285
Omelichkina Yu.V. 67
Osin Yu.N. 59
Osokina N.V. 287
Ovchinnikova V.N. 109, 283
Ozudogru E. Aylin 145
Pakharkova N.V. 327
Paliy A.E. 239, 253
Papikhin R.V. 103, 113
Park M.E. 111
Penkina M.V. 279
Perfileva A.I. 289
Petrov A.N. 245
Pintea Maria A. 53, 319
Pishcheva G.N. 115
Plaksina T.V. 117
Plugatar Yu.V. 273
Poluboyarova T.V. 105
Polyakova T.A. 231
Prazdnikov V.R. 119
Proletova N.V. 51
Pusenkova L.I. 279
Rabotyagov V.D. 239
Rakhimbaev I.R. 153
Rakhmankulova Z.F. 331
Reshetnik G.V. 291
Reshetnikov V.N. 137, 161
Rikhvanov E.G. 289
Ripberger E.I. 23
Risovannaya V.I. 177
Romadanova N.V. 153
Roncasaglia Romano 143
Rozhanskaya O. A. 53, 121
Rumyantsev S.D. 57
Rumyantseva N.I. 59, 203
Ruschuk A.D. 63
Rzhevsky S.G. 197
Sacali Natalia I. 53
Safronova G.I. 133
Sakharova A. 185
Salnikov V.V. 59
Samarina L.S. 175
Saymova A.S. 111
Schestibratov K.77
Seldimirova O.A. 123
Semenov A.A. 215
Semeonov A.V. 311
Sergeeva L.333
Shafikova T.N. 67
Sharipova G.V. 255
Shevchenko S.V. 323
Shevchuk O.M. 69
Shevyryeva N.A. 35
Shilova T.V. 121
Shipunova A.A. 139
Shmykova Natalia A. 29
Shplikhalova A.V. 275
Shuyskaya E.V. 71, 331
Sidorova T.N. 187
Sinitsyna Yu.V. 335
Skripnikova E.V. 61, 337
Skripnikova M.K. 61, 337
Snigir E. 185
Sobchuk N.A. 299
Sokolenko G. 241
Sokolova L.B. 307
Solopov V.A. 113, 125
Sorokina G.A. 327
Sosina A.V. 127
Spiridovich E.V. 161
Spivak V.A. 151
Staheeva T.S. 157
Stavtseva I.V. 83
Stepanova A.I. 131
Stolepchenko V.A. 183
Struchkova I.V. 129, 335
Stupko V.Yu. 293
Subbotina N.S. 103
Sudhersan C.144
Sumarukova O.V. 49
Suprunova T. 185
Surmanidze D.D. 25, 147
Sushinskaja N.V. 233

Tabatskaya T.M. 99
Tagimanova D.S. 13, 189
Terekhin V.E. 211
Terletskaya N.N. 293
Thammasiri Kanchit 167
Thao Nguyen Thi Phuong 135
Timerbaev V.R. 191
Timin O.Yu. 63
Timofeeva S.N. 131
Tokhtar L.A. 133
Tokhtar V.K. 133
Tretyakova I.N. 111
Trifonova A.A. 193
Trofimova O.I. 277, 295
Trunova Tamara 265
Tsivileva O.M. 245
Tsybulya N.V. 247
Turdiyev T.T. 163
Turgunov M. 107
Turzhanova A.S. 13
Tyunin A.P. 195
Urazova T.S. 121
Uvashov A.O. 13
Vainstein Alexander 16
Vasilyeva O.G. 157
Vasko P.P.183
Vaynovskaya I.F. 161
Vedyashkina O.A. 101
Verkhoturov V.V. 67, 245
Verulidze G.R. 147
Veselov A.P. 207, 211, 335
Veselov D.S. 255
Veselov S.Yu. 255
Veselova S.V. 57, 257
Vidershpan A.N. 213
Vinogradova G.Yu.309
Vinogradova S.V. 175
Vlasava N.B. 161
Volkov Y.A. 177
Volodin V.A.177
Volodina N.A. 213
Voronkov A.S. 261
Yakimova O.V. 141
Yarin A.Yu. 297
Yarullina L.G. 301
Yarullina L.M. 301
Yegorova N.A. 83, 141
Yudakova O.I. 131
Yudintsev A.V. 129
Yukhimuk A.N. 161
Yuldashev R.A. 279
Yurasov N.A. 245
Yurlova A.V. 129
Zagoskina N.V. 219, 329
Zaitseva I.A. 313
Zakubanskiy A.V. 181
Zamyatnin Jr. A.A. 221
Zaripova A.A. 87
Zayachkovskaya Tatyana V. 29
Zaytsev D.Yu. 123
Zaytseva Yu.G. 85
Zemlyanuhina O.A. 89, 223
Zhdanov I.V. 47
Zheleznichenko T.V.249
Zhigacheva I.V. 267, 281
Zhivetyev M.A. 237
Zholamanova S.Zh. 153
Zhukovskaya Natalia 269
Zhuzhzhalova T.P. 223
Zibareva L.N. 249
Zinatullina A.E. 315
Zobova N.V. 293
Zykova V.K. 33

Научное издание

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.

В авторской редакции

Формат 60x84/8. Усл. печ. л. 40,9. Тираж 300 экз.

ИЗДАТЕЛЬСТВО ТИПОГРАФИЯ «АРИАЛ».
295034, Республика Крым, г. Симферополь, ул. Севастопольская, 31-а/2,
тел.: +7 978 71 72 901, e-mail: it.arial@yandex.ru
www.arial.3652.ru

Отпечатано с оригинал-макета в типографии ИП Бражников Д.А.
295053, Республика Крым, г. Симферополь, ул. Оленчука, 63,
тел. +7 978 71 72 902, e-mail: braznikov@mail.ru.