



Никитский ботанический сад – Национальный научный центр (НБС-ННЦ)



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



Государственное бюджетное учреждение «Волгоградский региональный ботанический сад»



Государственное научное учреждение «Центральный ботанический сад» Национальной академии наук Беларуси

Материалы

**VI Международной научно-практической конференции
«Биотехнология как инструмент сохранения
биоразнообразия растительного мира
(физиолого-биохимические, эмбриологические,
генетические и правовые аспекты)»**
*г. Ялта, Республика Крым, Россия
12 – 17 октября 2014 г.*

Симферополь
ИТ «АРИАЛ»
2014

*Печатается по постановлению Ученого совета Никитского ботанического сада –
Национального научного центра № 12 от «11» сентября 2014 г.*

Оргкомитет конференции

Председатель оргкомитета:

д.б.н., проф. **О.В. Митрофанова**, заведующий лабораторией биотехнологии и вирусологии растений НБС-ННЦ

Зам. председателя: д.б.н. **И.В. Митрофанова**, заведующий отделом биологии развития растений, биотехнологии и биобезопасности НБС-ННЦ

Члены научного комитета:

д.б.н., академик НАН Украины, проф., **Я.Б. Блюм**, директор ГУ Институт пищевых биотехнологий и геномики НАН Украины; д.б.н., **А.С. Демидов**, директор Главного ботанического сада им. Н.В. Цицина РАН; д.б.н., **Е.А. Калашникова**, профессор кафедры генетики и биотехнологии Российского государственного аграрного университета – МСХА им. К.А. Тимирязева; д.б.н., **А.М. Носов**, профессор кафедры физиологии растений биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова; д.с.-х.н., **Ю.В. Плугатарь**, директор Никитского ботанического сада – Национального научного центра; д.б.н., академик АН Республики Беларусь, **В.Н. Решетников**, почетный директор Государственного научного учреждения «Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси»; д.б.н., **В.В. Титок**, директор Государственного научного учреждения «Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси»; д.б.н., проф., **С.В. Шевченко**, заведующий лабораторией репродуктивной биологии и физиологии растений НБС-ННЦ; д.мед.н., **А.М. Ярош**, зам. директора по научной работе НБС-ННЦ; к.б.н., **Губанова Т.Б.**, старший научный сотрудник лаборатории физиологии и репродуктивной биологии растений НБС-ННЦ; к.б.н., **О.И. Коротков**, директор Государственного бюджетного учреждения «Волгоградский региональный ботанический сад»; к.с.-х.н., **О.И. Молканова**, зав. лабораторией биотехнологии растений Главного ботанического сада им. Н.В. Цицина РАН; к.б.н., **А.Е. Палий**, зав. измерительной лабораторией НБС-ННЦ; к.б.н., **С.Е. Садогурский**, ведущий научный сотрудник лаборатории флоры и растительности НБС-ННЦ; к.б.н., **Е.В. Спиридович**, зав. лабораторией прикладной биохимии Государственного научного учреждения «Центральный ботанический сад» Национальной академии наук Беларуси.

Секретарь оргкомитета: к.б.н. **А.И. Ругузова**, старший научный сотрудник лаборатории репродуктивной биологии и физиологии растений НБС-ННЦ

Митрофанова И.В.

М 67 Материалы VI Международной научно-практической конференции «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира (физиолого-биохимические, эмбриологические, генетические и правовые аспекты)» г. Ялта, Республика Крым, Россия. 12 – 17 октября 2014 г. – Симферополь : ИТ «АРИАЛ», 2014. – 290 с.

ISBN 978-617-648-309-0

© Никитский ботанический сад –
Национальный научный центр, 2014 г.

© ИТ «АРИАЛ», 2014

ISBN 978-617-648-309-0



Nikitsky Botanical Gardens – National Scientific Centre
(NBG-NSC)



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



State Budget Institution Volgograd Regional Botanical
Garden



State Scientific Institution Central Botanical Garden of the
National Academy of Sciences of Belarus

Proceedings
of the VI International Scientific and Practical Conference
«**Biotechnology as an Instrument for Plant Biodiversity Conservation**
(*physiological, biochemical, embryological, genetic and legal aspects*)»
Yalta, Crimea, Russia
October 12-17, 2014

PP «ARIAL»
Simferopol
2014

Organizing Committee

Chairmen:

Dr.Sci., Prof. **O.V. Mitrofanova**, the Head of Plant Biotechnology and Virology Laboratory at NBG-NSC

Vice-chairman: Dr.Sci., **I.V. Mitrofanova**, the Head of Plant Developmental Biology, Biotechnology and Biosafety Department at NBG-NSC

Scientific Organizing Committee:

Dr.Sci., Academician of NAS of Ukraine, Prof. **Ya.B. Blume**, the Director of the Institute of Food Biotechnology and Genomics NAS of Ukraine; Dr.Sci., **A.S. Demidov** the Director of N.V. Tsytsin Main Botanical Garden of RAS; Dr.Sci., **E.A. Kalashnikova**, Prof. of the Department of Genetics and Biotechnology at the Russian Timiryazev State Agrarian University; Dr.Sci., **A.M. Nosov**, Prof. of the Department of Plant Physiology in the Faculty of Biology at Lomonosov Moscow State University; Dr.Sci., **Yu.V. Plugatar**, the Director of Nikitsky Botanical Gardens - National Scientific Centre; Dr.Sci., Academician of NAS of Belorus, **V.N. Reshetnikov** the Honourable Director of the State Scientific Institution Central Botanical Garden of NAS of Belorus; Dr.Sci., **V.V. Titok**, the Director of the State Scientific Institution Central Botanical Garden of NAS of Belorus; Dr.Sci., Prof., **S.V. Shevchenko**, the Head of Plant Reproductive Biology and Physiology Laboratory at NBG-NSC; Dr.Sci., **A.M. Yarosh**, the Vice-director on Scientific Work of NBG-NSC; Ph.D., **T.B. Gubanova**, the Researcher of the Laboratory of Physiology and Reproductive Biology of Plants at NBG-NSC; Ph.D., **O.I. Korotkov**, the Director of State Budget Institution Volgograd Regional Botanical Garden; Ph.D., **O.I. Molkanova**, the Head of Biotechnology Laboratory at N.V. Tsytsin Main Botanical Garden of RAS; Ph.D., **A.E. Paliy**, the Head of Testing Laboratory at NBG-NSC; Ph.D., **S.Ye. Sadogursky**, the Leading Researcher of Flora and Vegetation Laboratory at NBG-NSC; Ph.D., **E.V. Spiridovich**, the Head of the Laboratory of Applied Biochemistry of the State Scientific Institution Central Botanical Garden of NAS of Belorus.

Secretary: Ph.D. **A.I. Ruguzova**, the Researcher of Plant Reproductive Biology and Physiology Laboratory at NBG-NSC

Mitrofanova I.V.

M 67 Proceedings of the VI International Scientific and Practical Conference «Biotechnology as an Instrument for Plant Biodiversity Conservation (physiological, biochemical, embryological, genetic and legal aspects)» Yalta, Crimea, Russia. October 12-17, 2014. – Simferopol : PP «ARIAL», 2014. – 290 p.

ISBN 978-617-648-309-0

ПЛЕНАРНЫЕ ДОКЛАДЫ

PLENARY REPORTS

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ОЦЕНКИ И СОХРАНЕНИЯ БИОРАЗНООБРАЗИЯ РАСТЕНИЙ

Е.З. Кочиева

Центр “Биоинженерия” РАН

Москва, Россия, e-mail: kochieva@biengi.ac.ru

В последнее десятилетие достигнут значительный прогресс в области применения молекулярно-генетических методов для оценки генетических ресурсов растений и сохранения биоразнообразия как *ex situ*, так и *in situ*. В настоящее время применение молекулярных методов стало практически обязательной практикой при определении филогении и эволюции видов растений, а также при оценке видового биоразнообразия. Молекулярные методы применяются для определения степени генетической изменчивости в пределах вида и между видами, а также для выявления структуры популяций.

Использование молекулярных методов позволяет обнаруживать изменения, происходящие на уровне ДНК, и тем самым получить ценные данные по оценке биоразнообразия генетических ресурсов и его сохранения. Правильная таксономическая идентификация образцов и видов растений является основополагающим в исследованиях биоразнообразия. Для оценки видового разнообразия крайне важно, чтобы каждый образец был классифицирован довольно точно. Идентификация видов и популяций, находящихся под угрозой исчезновения, имеет крайне важное значение для разработки соответствующих стратегий сохранения, так как их генетическая структура довольно сильно отличается от родственных видов, имеющих более широкие ареалы.

Значительные достижения в области молекулярной биологии и генетики за последние несколько лет обеспечили исследователей, занимающихся проблемами биоразнообразия и сохранения генетических ресурсов растений, целым рядом новых методов, основанных на детекции вариабельности ДНК, для легкой и надежной видовой идентификации растений. Многие из этих молекулярных методов уже успешно использованы для изучения уровня и распределения изменчивости у популяций и видов и для решения филогенетических и таксономических проблем.

В докладе будут обсуждаться различные методы моно- и мультилокусного молекулярного анализа, в том числе AFLP, RAPD, ISSR, EcoTILLING, SNP генотипирование, и их применение для оценки и сохранения биоразнообразия генетических ресурсов растений.

MOLECULAR GENETIC METHODS AND THEIR APPLICATION IN PLANT BIODIVERSITY STUDIES AND CONSERVATION

E.Z. Kochieva

Center “Bioengineering” RAS

Moscow, Russia, e-mail: kochieva@biengi.ac.ru

In last decade, there has been a significant progress in the application of molecular genetic techniques for assessing plant genetic resources and biodiversity conservation, including *ex situ* and *in situ* conservation. Nowadays molecular methods become a “must be” technique in studies of species phylogeny and evolution or in assessing the biodiversity richness of a given territory, and have been applied to increase the understanding of the distribution and extent of genetic variation within and between species and territories.

Molecular methods provide valuable data on biodiversity and conservation through their ability to detect variation at the DNA level. Accession/species identification is of the fundamental importance in plant biodiversity studies. For estimation of species diversity, it is essential that each accession can be classified quite accurately. Taxonomic units and endangered species identification, which genetic structure is rather distinct from their more abundant relatives, is important in the development of appropriate conservation strategies. The emergence of DNA-based markers has changed species identification techniques.

The dramatic advances in molecular genetics over the last few years have provided researchers involved in biodiversity studies and the conservation of plant genetic resources with a range of new techniques for easy and reliable identification of plant species. Many of these techniques have been successfully used to study the extent and distribution of variation in species gene-pools and to answer typical evolutionary and taxonomic questions.

In the talk application and efficiency of different mono- and multiloci molecular methods, including AFLP, RAPD, ISSR, EcoTILLING, SNP genotyping for biodiversity assessment and conservation of plant genetic resources will be discussed.

СТРАТЕГИЯ ОЗДОРОВЛЕНИЯ, РАЗМНОЖЕНИЯ И СОХРАНЕНИЯ *IN VITRO* ДЕКОРАТИВНЫХ, ПЛОДОВЫХ, ЭФИРОМАСЛИЧНЫХ И ЛЕКАРСТВЕННЫХ КУЛЬТУР

И.В. Митрофанова, О.В. Митрофанова

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр,
298648, Республика Крым, г. Ялта, пгт. Никита, e-mail: in_vitro@ukr.net

Развитие декоративного садоводства, плодородства, производства эфиромасличных и лекарственных культур в настоящее время невозможно без использования биотехнологических методов оздоровления, размножения и сохранения растений.

В Никитском ботаническом саду на протяжении многих лет ведется интродукция, акклиматизация, селекция декоративных, плодовых, эфиромасличных и лекарственных растений. Собрана богатейшая коллекция, представленная видами, сортами и формами из Средиземноморья, Европы, Америки, Азии, Японии и Африки.

Современные биотехнологические методы в комплексе с другими методами биологических исследований разных видов и сортов растений являются связующим звеном в общей стратегии биобезопасности любого государства. Антропогенное воздействие вносит свои коррективы в глобальную программу сохранения биоразнообразия растительного мира. Проведение мониторинга распространения фитопатогенов как в агроценозах, так и биоценозах является неотъемлемой частью исследований научных учреждений.

При создании любых растительных биотехнологий необходимо учитывать систему оздоровления, состоящую из последовательных блоков и включающую целый комплекс методов освобождения растений от патогенов (термотерапия, хемотерапия и т.д.). Рассматривая вопросы размножения, следует сосредоточить свое внимание на высокоэффективных методах, обеспечивающих стабильное и массовое размножение изучаемых объектов. Здесь важную роль играет разработанный и выбранный для конкретных целей путь регенерации растений *in vitro*. Сохранение растительных объектов *in vitro* тесно связано как с оздоровлением, так и с размножением растений. Процесс депонирования растений в виде медленно растущих коллекций зависит от ряда факторов, таких как генотип, питательная среда, осмотик и его концентрация, ретардант и его концентрация, температура, освещенность. Главный критерий оценки депонирования это жизнеспособность эксплантов, помещаемых в условия низких положительных температур и их последующая регенерационная способность.

Таким образом, нами выработаны критерии оценки состояния растительных объектов в условиях *in vitro* и показана необходимость комплексной работы, направленной на оздоровление, размножение и сохранение декоративных, плодовых, эфиромасличных и лекарственных культур.

STRATEGY OF VIRUS-FREE ORNAMENTALS, FRUITS, ESSENTIAL OIL AND MEDICAL CULTURES OBTAINING, PROPAGATION AND CONSERVATION *IN VITRO*

Irina Mitrofanova, Olga Mitrofanova

Nikita Botanical Gardens – National Scientific Center

298648, Crimea, Yalta, Nikita, e-mail: *in_vitro@ukr.net*

Today development of ornamental gardening, horticulture, essential oils and medical plants production are impossible without using biotechnology methods of virus-free plants obtaining, their propagation and conservation.

In Nikita Botanical Gardens (NBG) during many years introduction, adaptation, breeding of ornamentals, fruits, essential oils and medicinal plants has been carried out. NBG have a large collection of different plant species, cultivars and forms from Mediterranean area, Europe, America, Asia, Japan and Africa.

Modern biotechnology methods in combination with other methods of biological investigations of plant species and cultivars are the connection link in general strategy of biosafety in all countries. Anthropogenic pressure gives its corrections to the global program of plant biodiversity conservation. Monitoring of phytopathogens` distribution in agrocenosis and biocenosis is an integral part of investigations in research institutes.

During of any plant biotechnology creation it is necessary to take into account the improvement system consisted of successive blocks and included the total complex of methods of virus-free plants obtaining (thermotherapy, chemotherapy and etc.). Discussing the propagation questions the attention should be paid to high effective methods that ensured stable and mass propagation of studied objects. Worked out and chosen for concrete purpose the way of plant regeneration *in vitro* plays the important role here.

Conservation of plants *in vitro* is closely connected with plants improvement and propagation. Plants deponation process as slowly-growth collection has been depended on a number of factors such as genotype, culture medium, type and concentration of osmotic and retardant, temperature, illumination. The main criterion of evaluation during conservation is explants viability, placed in conditions of low positive temperatures and their next regeneration ability.

Thus, we have worked out the criterions of evaluation of plants capability *in vitro* and necessity of complex work, directed to improvement, propagation and conservation of ornamentals, fruits, essential oil and medical cultures has been shown.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ ПРОМЫШЛЕННОГО ПОЛУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

А.М. Носов, Д.В. Кочкин

Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова.

Москва, Воробьевы Горы, 1, 12

Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН

Москва, Ботаническая, 35, e-mail: al_nosov@mail.ru

Биологически-активные вещества растительного происхождения играют важнейшую роль в современной медицине. Их использование часто ограничено доступностью растительных ресурсов и может представлять серьезную угрозу для редких видов лекарственных растений. Культуры клеток высших растений являются возобновляемым источником ценных вторичных метаболитов, однако до настоящего времени известны лишь единичные примеры их коммерческого применения. Причинами этого являются недостаточная продуктивность культур клеток по вторичным метаболитам и высокая стоимость их выращивания. Используя традиционные методы – селекцию продуктивных штаммов, оптимизацию сред, элиситацию, добавление предшественников синтеза можно повысить продуктивность культур клеток растений на один-два порядка. Однако, синтез многих вторичных соединений в культуре клеток не получен, что может быть обусловлено ее спецификой как биологической системы – экспериментально созданной популяции соматических клеток. Принципы развития этой системы основаны на автоселекции клеток по признаку интенсивной и/или устойчивой пролиферации. Вторичный метаболизм в клетках *in vitro*, очевидно, должен отличаться от такового в клетках интактных растений. В культуре клеток все соединения должны образовываться в пролиферирующей гетеротрофной клетке с небольшим количеством пластид и вакуолей. Можно предположить, что при отборе клеток по интенсивности пролиферации будут активно и стабильно образовываться соединения, способствующие росту и делению клеток. Для культур клеток *Dioscorea deltoidea* показано, что в клетках *in vitro* образуются только фураностаноловые гликозиды, которые имеют антиоксидантные свойства и способствуют пролиферации клеток. Содержание фураностаноловых гликозидов в биомассе клеток составляет 6-12% к сухой биомассе и стабильно в течение почти 40 лет выращивания культуры. Основными гликозидами культуры клеток диоскореи дельтовидной являются протодиосцин и дельтозид, а также их 26-S-изомеры, которые в интактных растениях в детектируемых количествах не обнаружены. В культурах клеток 2 видов женьшеня *Panax ginseng* и *P. japonicus* образуются как минимум 7 тритерпеновых гликозидов (гинзенозидов), содержание которых в клетках *in vitro* может достигать 5-8% в сухой биомассе. В отличие от фураностаноловых гликозидов диоскореи, их содержание часто нестабильно и зависит от условий культивирования. В клетках женьшеня *in vitro* гинзенозиды представлены преимущественно гинзенридами Rg-группы (агликон-протопанаксатриол). В последнее время установлено, что гинзенозиды Rb-группы также присутствуют в клетках в значительных количествах, но находятся в виде сложных эфиров с малоновой кислотой, что связано, вероятно, с необходимостью их вакуолярной компартментации. В отличие от образования тритерпеноидов, формирование дитерпеноидов (стевиол-гликозидов) в культурах клеток стевии *Stevia rebaudiana*, начинается только в миксотрофных культурах клеток и коррелирует с формированием в них хлоропластов. Несмотря на особенности вторичного метаболизма в клетках высших растений *in vitro*, а во многом благодаря им, культуры клеток являются перспективными источниками промышленно-ценных вторичных метаболитов для медицины, пищевой и косметической промышленности. Обсуждаются проблемы выращивания культур клеток в биореакторах промышленного объема для получения коммерчески ценных вторичных метаболитов.

APPLICATION OF CELL TECHNOLOGIES FOR PRODUCTION OF PLANT DERIVED BIOACTIVE SUBSTANCES OF PLANT ORIGIN

A.M. Nosov, D.V. Kochkin

M.V.Lomonosov Moscow State University, Biology Department

Moscow, Vorob'evi Gory, 1, 12

K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology

Russia, Moscow, Botanicheskaya 35, e-mail: al_nosov@mail.ru

Bioactive substances of plant origin are known to play a very important role in modern medicine. Their use, however, is often limited by availability of plant resources and may jeopardize rare species of medicinal plants. Plant cell cultures can serve as a renewable source of valuable secondary metabolites. To the date, however, only few examples of their commercial use are known. The main reasons for such a situation are the insufficient production of secondary metabolites and high cultivation costs. It is possible to increase the performance of plant cell cultures by one or two orders of magnitude using traditional methods, such as selection of highly productive strains, optimization of the medium composition, elicitation, and addition of precursors of secondary metabolite biosynthesis. Nevertheless, the attempts of the production of many secondary metabolites in plant cell culture were unsuccessful so far, probably due to the peculiarities of the cell culture as an artificial population of plant somatic cells.

Plant cell culture is traditionally viewed as a unique artificially created biological system represented a heterogonous population of dedifferentiated cells. This system undergoes a continuous process of autoselection based on the intensity and stability of cell proliferation.

The specifics of formation and regulation of isoprenoid biosynthesis in plant cells *in vitro* based on literature survey and our research results has been discussed. Secondary metabolism in plant cell culture is likely to be differing from that in the intact plants. All the metabolites are to be formed and compartmentalized within a single heterotrophic proliferated cell with sparse or undeveloped vacuoles and plastids. It was hypothesized that cell cultures would preferably produce metabolites that promote cell proliferation and growth.

Indeed, cell cultures of *Dioscorea deltoidea* were demonstrated to accumulate only furostanol glycosides, which promoted cell division. Furostanol glycoside content of *Dioscorea* strain DM-0.5 was up to 6-12% by dry biomass. Plant cells *in vitro* synthesize both glycosides which are located in leaves (protodioscine) and rhizome (deltoside) of the intact plants. It should be note, that cultivated cells additionally contain 26-S isomers which are not found in the intact plants.

Panax ginseng and *Panax japonicus* plant cell cultures synthesize as minimum seven triterpene glycosides (ginsenosides), the productivity of these compounds was up to 6.0-8.0% on dry biomass. The ginsenosides in the plant cell cultures were represented mostly by Rg-group. Ginsenosides of Rb-group were mainly detected in the forms of malonyl-esters caused probably by their specific intracellular localization.

By contrast, the detectable synthesis of diterpene steviol-glycosides in cultivated cells of *Stevia rebaudiana* initiated in the mixotrophic cultures during chloroplast formation only.

Despite these differences, or mainly due to them, plant cell cultures have become an attractive source of phytochemicals in alternative to collecting wild plants. It provides a guideline to bioreactor-based production of isoprenoids using undifferentiated plant cell cultures.

ГАРМОНИЗАЦИЯ ПРАВИЛ ПРЕДОСТАВЛЕНИЯ, ДОСТУПА И ТРАНСГРАНИЧНОЙ ПЕРЕДАЧИ ДЕПОНИРОВАННЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ОБЪЕКТОВ *IN VITRO*, В ТОМ ЧИСЛЕ РЕДКИХ И ЭНДЕМИЧНЫХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ

**В.Н. Решетников¹, И.В. Митрофанова², А.М. Носов³, О.И. Молканова⁴,
О.И. Коротков⁵, Т.И. Фоменко¹, Е.В. Спиридович¹**

¹Центральный ботанический сад НАН Беларуси,
220012, Минск, ул. Сурганова, 2В, e-mail: A.spiridovich@cbg.org.by

²Никитский ботанический сад - Национальный научный центр
298648, Республика Крым, Ялта, пгт. Никита,
e-mail: irimitrofanova@yandex.ua

³Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН
127276, Москва, ул. Ботаническая, 35, e-mail: al_nosov@mail.ru

⁴Главный ботанический сад им. Н.В.Цицина РАН
127276, Москва, ул. Ботаническая, 4, e-mail: molkanova@mail.ru

⁵Волгоградский региональный ботанический сад
400007, Волгоградская обл., Волгоград, Поселок Metallургов, 68,
e-mail: vrbs@list.ru

Актуальность проблемы состоит в разработке общей методологии комплексного изучения вопросов сохранения *in vitro* и практического использования эндемиков и редких видов растений, как компонента Национальной стратегии сохранения биоразнообразия растений в России, Украины и Беларуси. В 2002 году была принята Глобальная Стратегия Сохранения Растений, основной целью которой было остановить продолжающийся процесс утраты биоразнообразия растений. Например, в составе флоры Беларуси известно около 12 тыс. видов, из них около 2,1 тыс. видов высших и более 9 тыс. низших растений (водоросли, лишайники) и грибов. За последнее столетие на территории Беларуси исчезло около 70 аборигенных видов дикорастущих растений. Проблемы, стоящие перед сохранностью редких растений, многие виды которых уже безвозвратно потеряны, могут быть решены путем создания семенных банков и банков клеток и культур тканей. Как проект межгосударственной целевой программы Евразийского экономического сообщества «Инновационные биотехнологии» было предложено создание Коллекции *in vitro* редких и эндемичных видов растений дикорастущей флоры Беларуси, России, Кыргызстана на основе природных источников и существующих коллекций *in vitro* стран ЕврАзЭС с целью сохранения генофонда и биоразнообразия, реинтродукции и подходов к их промышленному использованию для получения биотехнологического растительного сырья. Обмен опытом при создании и/или развитии национальных коллекций культур растительных клеток, меристем, стерильных растений *in vitro* редких и эндемичных видов растений, в том числе их депонирование при пониженных температурах и криосохранение; проведение школ (семинаров) и/или стажировок по методам получения и характеристики культур клеток, органов, тканей и растений *in vitro* редких и эндемичных видов, а также создание общих для ЕврАзЭС баз данных по этим коллекциям, обеспечит согласованное взаимодействие специалистов разных стран с учетом национальных законодательств и ведения Красных книг.

HARMONIZING RULES OF THE GRANTED, ACCESS AND CROSS-BORDER TRANSMISSION OF PLANT FACILITIES DEPOSITED *IN VITRO*, INCL. RARE AND ENDEMIC PLANT SPECIES

V. Reshetnikov¹, I. Mitrofanova², A. Nosov³, O. Molkanova⁴, O. Korotkov⁵,
T. Fomenko¹, A. Spiridovich¹

¹Central Botanical Gardens NAS of Belarus

Minsk, 270012, Surganova str. 2B, e-mail: A_Spiridovich@cbg.org.by

²Nikitsky Botanical Gardens - National Scientific Centre

298648, Yalta, Crimea, e-mail: irimitrofanova@yandex.ua

³Institute of plant physiology of K.A.Timiryazev of the Russian Academy of Sciences
127276, Moscow, Botanicheskaya St., 35, e-mail: al_nosov@mail.ru

⁴Main Botanical Garden of the Russian Academy of Sciences

127276, Moscow, Botanicheskaya St., 4, e-mail: molkanova@mail.ru

⁵Volgograd Regional Botanic Garden

400007, Volgograd Region., Volgograd, Village of Metallurgists, 68,
e-mail: vrbs@list.ru

Urgency of the problem is to develop a common methodology for the integrated study of the *in vitro* conservation and practical use of the endemic and rare plant species, as part of the National plant Biodiversity Strategy in Russia, Ukraine and Belarus.

The Global Strategy for Plant Conservation had been adopted in 2002, the main aim of this document was to stop the ongoing process of the loss of plant biodiversity. For example, the Belarus flora is about 12 thousand species, where about 2.1 thousand species of higher and more than 9 thousand lower plants (algae, lichens) and fungi are presented. More than 70 native species of wild plants has been lost over the last century on the territory of Belarus.

Many species of rare plants have irrevocably lost. The problem can be solved by establishing seed banks and banks of cells and tissue cultures. The project of interstate target program of the Eurasian Economic Community "Innovative Biotechnology" has proposed the creation of *in vitro* collections of rare and endemic species of wild flora of Belarus, Russia, Kyrgyzstan based on natural sources and on the examples of existing *in vitro* collections of EurAsEC countries. It is necessary to conserve genetic resources and biodiversity, and to develop the reintroduction approaches and industrial use of biotechnological plant materials.

Exchange of the experience in the creation and / or development of national *in vitro* collections of plant cells, meristems, sterile plants of rare and endemic plant species of, including their deposition at lower temperatures and krioconservation, holding schools (seminars) and / or training on the preparation and characteristics of cell cultures, organs, tissues, and *in vitro* plants of rare and endemic species, and the creation of common databases for the EurAsEC of these collections will provide the coordinated interaction of specialists from different countries in accordance with national legislation and the Red Data Book.

КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ ХВОЙНЫХ ЧЕРЕЗ СОМАТИЧЕСКИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ; ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ

И.Н. Третьякова, Е.В. Ворошилова, А.С. Иваницкая, М.Э. Пак

Учреждение российской академии наук. Институт леса им. В.Н. Сукачева
СО РАН

660036, Красноярск, Академгородок 50, стр.28, e-mail: culture@ksc.krasn.ru

За 29 лет с момента открытия соматического эмбриогенеза (СЭ) у *Picea abies* (Накман et al., 1985) был накоплен определенный фактический материал по изучению морфологических, гистологических, физиологических и молекулярных особенностей формирования соматических зародышей у голосеменных растений. Однако механизм этого феномена у хвойных растений остается слабо изученным. На основании цитоэмбриологических исследований, нами была построена цитофизиологическая модель индукции СЭ у видов семейства *Pinaceae*. Согласно этой модели, индукция СЭ наблюдалась только у эксплантов единичных деревьев – доноров. Первая морфогенетическая реакция клеток в культуре зародышей и культуре мегагаметофитов шла под действием ауксинов – клетки становились восприимчивыми, что выражалось в их удлинении (до 300-500 мк). На следующем этапе удлинённые клетки подвергались поляризации. Поляризованные клетки в культуре мегагаметофитов и культуре зародышей «вспоминали» свою историю: у первых формировался ценоцит, как у свободной ядерной женского гаметофита, а у вторых – поляризованная клетка, напоминающая «зиготу». В культуре мегагаметофитов свободные ядра смещались к одному из полюсов клетки, где формировали эмбрионид. В культуре зародышей вытянутые клетки подвергались асимметричному делению с образованием инициалей и клеток-трубок. В пролиферирующей культуре зародышей и мегагаметофитов эмбрионные клетки (инициали) претерпевали многочисленные деления и формировали глобулы зародышей, на дистальном конце которых образовывались эмбриональные трубки, слагающие суспензор. На этом этапе шла экспрессия эмбрионного потенциала. В эмбрионном каллусе, наряду с образованием глобул зародышей, происходило активное деление вытянутых эмбриональных трубок с отчленением новых инициалей и новых эмбриональных трубок. Клетки пролиферирующей эмбрионально-суспензорной массы приобретали статус стволовых. На данном этапе происходило включение саморегулирующейся программы эмбрионального развития – шло формирование соматических зародышей. При субкультивировании каллусов на среды АИ и LV, дополненные АБК, у соматических зародышей наблюдалась активная дифференциация тканей и вызревание зародышей, которые при переносе их на безгормональные среды прорастали. Разработанная нами биотехнология используется в плантационном лесовыращивании хвойных в Сибири.

CLONAL MICROPROPOGATION OF CONIFERS BY SOMATIC EMBRYOGENESIS: THEORY AND APPLICATIONS

Iraida N. Tretyakova, E.V. Voroshilova, A.S. Ivanitskaya, M.E. Pak

V.N. Sukachev Institute of Forest, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences.

660036, Russia, Krasnoyarsk, Akademgorodok, 28/50,

e-mail: *culture@ksc.krasn.ru*

Over 29 years, since somatic embryogenesis (SE) was found in *Picea abies* (Hakman et al., 1985), a considerable body of facts has been developed regarding morphological, histological, physiological, and molecular characteristics of somatic embryo formation in gymnosperms. However, the mechanisms controlling this phenomenon in conifers are still little studied. We used the results of our cytoembryological studies to build a cytophysiological model of SE induction in species of *Pinaceae* family. With this model, SE was induced in explants of only few donor-trees. During the initial auxin-triggered morphogenetic reaction, cells in an embryonic and megagametophyte cultures became competent, which competence was clear from their growing in length to 300-500 μm . At the next stage, the elongated cells were subjected to polarization. The polarized cells in both cultures ‘remembered’ their history: while coenocyte like in a free-nucleus female gametophyte developed in cells in the megagametophyte culture, in those in the embryonic culture polarized cells began to resemble ‘zygotes’. In the megagametophyte culture, free nuclei move to either cell pole to form embryoids. In the embryonic culture, elongated cells divided asymmetrically to form initials and tube-cells. In the proliferating megagametophyte and embryonic cultures, embryogenic cells (initials) experienced multiple divisions and formed embryo globules, at the distal ends of which embryonic tubes developed, which made up suspensor. This was the stage where the embryo production potential was exhibited. In embryogenic calluses, elongated embryonic tubes divided intensively and new initials and new embryonic tubes occurred, along with embryo globule formation. Cells of the proliferating embryonic suspensor mass became stem cells. At this stage, a self-regulated embryo development program was triggered, i.e. somatic embryo formation was in process. After the calluses had been transferred to ABA-supplemented AI and LV media, tissues differentiated intensively in embryos and embryos matured. When transferred to hormone-free media, mature embryos germinated. The biotechnology we developed is nowadays used to establish conifer plantations in Siberia.

К ВОПРОСУ О РЕПРОДУКТИВНОЙ БИОЛОГИИ ЦВЕТКОВЫХ РАСТЕНИЙ КРЫМА

С.В. Шевченко

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр

298648, Республика Крым, г. Ялта, пгт Никита

e-mail: *shevchenko_nbs@ukr.net*

Процессы репродукции играют чрезвычайно важную роль в естественном воспроизведении растительного покрова, сохранении фиторазнообразия, восстановлении нарушенного антропогенной нагрузкой равновесия в биотопах. Изучение всех этапов репродуктивного цикла позволяют выявить закономерности формирования репродуктивных структур, которые могут быть использованы для решения спорных вопросов систематики и филогении, создания новых форм и сортов хозяйственно значимых культур, а также для пополнения фактического материала по общей эмбриологии растений и антропоэкологии. В Никитском ботаническом саду в течение многих лет проводятся исследования репродуктивных процессов ряда видов цветковых растений в пределах их природного ареала в Крыму (*Arbutus andrachne* L., *Pistacia mutica* Fisch. Et Mey., *Fumana thymifolia* L., *Paeonia tenuifolia* L., *Campanula sibirica* L., *C. taurica* Juz., *C. talievii* Juz., *Glaucium flavum* Crantz и др.) и интродуцированных на Южный берег Крыма видов (*Asimina triloba* (L.) Dunal., *Davidia involucrata* Baill., *Camptotheca acuminata* Decne, *Olea europaea* L., *Zizyphus jujuba* Mill., *Magnolia grandiflora* L., *Magnolia kobus* var. *boreales* Sarg., *Liriodendron tulipifera* L., *Passiflora caerulea* L., *Passiflora incarnata* L.). В результате определены типы формирования генеративных структур, показана взаимозависимость генезиса мужских и женских элементов, а также согласованность процесса цветения и действий насекомых-опылителей. Выявлены специфические приспособления, обеспечивающие эффективность опыления и последующие процессы оплодотворения и формирования семян, а также особенности диссеминации. Показано, что сроки и продолжительность того или иного этапа репродуктивного цикла в значительной степени зависят от условий произрастания, что особенно четко проявляется у интродуцированных видов. На примере изученных видов сделано заключение о пластичности и надежности системы репродукции цветковых растений, об адаптивной направленности эволюционных преобразований репродуктивных структур для обеспечения важнейших этапов воспроизведения и размножения – опыления и диссеминации, а также показано значение знаний репродуктивной биологии для развития различных направлений ботанической науки.

TO THE QUESTION OF THE REPRODUCTIVE BIOLOGY OF FLOWERING PLANTS OF THE CRIMEA

S.V. Shevchenko

Nikita Botanical Gardens – National Scientific Centre

298648, Crimea, Yalta, Nikita, e-mail: shevchenko_nbs@ukr.net

Processes of the reproduction play an important role in natural multiplication of the plants, preservation of phytodiversity, reconstruction of the broken balance in the biotopes by anthropogenic loading.

Study of all stages of the reproductive cycle permit to discover basic laws of the reproductive structures formation which may be used for decision of disputable questions in plant systematization and philogenation, for creation new forms and varieties of valuable cultures, and for the replenishment of factual material in plants embryology and antecology.

In Nikita Botanical Gardens during many years the investigations of the reproductive processes in the species of the flowering plants in the conditions of their natural area in the Crimea (*Arbutus andrachne* L., *Pistacia mutica* Fisch. Et Mey., *Fumana thymifolia* L., *Paeonia tenuifolia* L., *Campanula sibirica* L., *C. taurica* Juz., *C. talievii* Juz., *Glaucium flavum* Crantz at c.), and the introduced species on the Southern Coast of Crimea (*Asimina triloba* (L.) Dunal., *Davidia involucrata* Baill., *Camptotheca acuminata* Decne, *Olea europaea* L., *Zizyphus jujuba* Mill., *Magnolia grandiflora* L., *Magnolia kobus* var. *boreales* Sarg., *Liriodendron tulipifera* L., *Passiflora caerulea* L., *Passiflora incarnata* L.) have been carried out.

As a result the types of generative structures formation have been determined, the interconnection of male and female elements genesis and the coordination of flowering processes and the actions of insects-pollinators have been shown.

Specific adaptations provided the effective processes of pollination, fertilization and seeds formation, and also dissemination has been presented. It's been shown that periods and duration of reproductive cycle stages in plants depend on the condition of vegetation, which has been displayed especially clearly in the introduced species.

The conclusions about plasticity and reliability of the reproduction system of the flowering plants, about adaptive direction of the evolutionary transformations of the reproductive structures for the guarantee of the most important stages of reproduction and multiplication – fertilization and dissemination have been made, and also the significance of knowledge of reproductive biology for the development of the different direction of the botanical science has been shown.

HELIANTHUS GENUS: THE USE IN SUNFLOWER BREEDING, RECENT DEVELOPMENTS IN WILD SUNFLOWER SPECIES AND PLANT CONSERVATION UTILIZING FROM BIOTECHNOLOGY

Yalcin Kaya

Trakya University Havsa MYO,
Havsa, Edirne, Turkey, e-mail: yalcinkaya22@gmail.com

Helianthus genus consisting 52 species called as sunflower has very valuable sources to use for vegetable oil, confectionery, birdseed and ornamental purposes, etc. Conservation of genetic resources both in sunflower and also other crops is so essential and plays the vital role for biodiversity in sustaining the mankind and earth for future food security and for developing new crop varieties for future generations. Recent progresses in biotechnology have generated new opportunities and expanded for conservation and utilization of sunflower genetic resources. For instance, molecular marker techniques offer the assuring plant breeding more precise and faster and used for screening of germplasm to study genetic diversity, identifying germplasm collections efficiently, testing wild accession for stability and reliability, and determining taxonomic relationships. *In vitro* culture and cryopreservation techniques have made easier for collecting and conserving genetic resources especially which have difficulty to conserve as seeds. Analyzing variations in the DNA level of sunflower plants have already been used to study the extent and distribution of variation in species gene-pools and to investigate evolutionary and taxonomic relationships among sunflower populations. On the other hand, the genetic potential of crop production has been widen by integration of biotechnology and molecular methods in conventional breeding especially transferring useful genes from sunflower wild species until today. Interspecific hybridization and introgression has been often also used successfully in sunflower breeding to transfer many useful characters (drought and salinity resistance, source of *cms*, disease resistance, etc.) due to difficulties for crossing between wild and cultivated ones. Especially embryo rescue method has been used commonly in sunflower to overcome these barriers. Recent investigations utilizing molecular tools indicated that genetic diversity of cultivated sunflower was much wider than previously thought because of that many crosses and gene transfers from wild species have been performed until today. On the other hand, the use of new uniform and high yielding varieties used in modern agriculture causes the erosion of genetic diversity of landraces, old and local cultivars. Biotechnology and molecular tools will help to detect for domestication and contamination ratios of wild sunflower species with alien genes in home lands.

AN OVERVIEW OF BIOTECHNOLOGY AND MUTATION BREEDING FOR FEEDING THE WORLD

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 new challenges such as climate change, human population growth, etc., which threaten to sustain food production worldwide. There are visible signs on the negative impact on world food production and rise in food price. Mutations are induced to enhance the mutation frequency rate since the rate of spontaneous mutations is very low and difficult to exploit by the plant breeders. Over 3000 officially released mutant varieties have been released worldwide (www.iaea.org). The main advantage of mutagenesis is the selection of mutants with multiple traits. By transgenic approach, single gene trait transgenic plants have been produced; moreover, consumers are not ready to accept genetically modified food. Bio-safety regulations are not applied to mutants. By using *in vitro* techniques plant regeneration is successful of all major food and horticultural crops. Micropropagation via organogenesis is routinely used for clonal propagation of ornamental plants and other vegetative propagated plants, especially woody and fruits trees. Explant, e.g. shoot meristem is treated with mutagen and regenerate shoots followed by root formation; mutants are selected under the selection pressure e.g. disease, salt, drought. The selected mutant plants are transferred and evaluated in the greenhouse and finally to the field evaluation and use them for crossing with other varieties. An overview will highlight several mutants in different crops- tomato (drought and salt tolerant), banana (Black sigatoka and Fusarium wilt tolerant), date palm (Bayoud disease), and strawberry (*Phytophthora cactorum* tolerant), wheat (salt tolerant, and resistance to yellow rust, sesame (insect resistance), and rice (dwarf, salt tolerant).

СЕКЦИЯ 1.
SECTION 1.

ИЗУЧЕНИЕ БИОРАЗНООБРАЗИЯ РАСТЕНИЙ
IN VITRO, IN SITU И EX SITU

INVESTIGATIONS OF PLANT BIODIVERSITY
IN VITRO, IN SITU AND EX SITU

ОЗДОРОВЛЕНИЕ МИКРОРАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ ОТ ВИРУСОВ МЕТОДОМ КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ

О.Ю. Антонова, Е.А. Крылова, А.Р. Шувалова, О.Ю. Шувалов, Т.А. Гавриленко

Всероссийский научно-исследовательский институт растениеводства им. Н.И. Вавилова, РАСХН

Россия, Санкт-Петербург, e-mail: olgaant326@mail.ru

Для надежного сохранения коллекций вегетативно размножаемых культур и, в частности картофеля, необходимы регулярный контроль фитосанитарного статуса образцов и разработка эффективных методов элиминации вирусных патогенов. В данной работе мы провели оздоровление *in vitro* растений картофеля с использованием модифицированных методов комплексной термо- и хемотерапии.

Материалом для исследований послужили 110 растений 107 образцов четырех культурных и семи диких видов картофеля. Предварительно все растения были протестированы на присутствие вирусов MBK, YBK, SBK, ВСЛК и ХВК методом ОТ-ПЦР с праймерами, специфичными к различным последовательностям вирусных геномов (Singh, 1999; Reiman, Xie, 2006; Xu et al., 2010). Большинство отобранных для исследования растений (71,8%) содержало несколько вирусов в различных сочетаниях, а у 10% из них, в основном у аборигенных чилийских сортов, были диагностированы четыре-пять вирусов одновременно. Наиболее распространенными оказались вирусы MBK, SBK и YBK (соответственно 70,9%, 55,5% и 54,5% от числа изученных растений).

Оздоровление проводили с использованием модифицированного метода комплексной термо- и хемотерапии в двух модификациях – ‘А’ и ‘В’. В обеих схемах микрочеренки помещали на безгормональную среду MS с рибавирином (50 мг/л) и подвергали воздействию повышенной температуры (36°C). Схема ‘А’ включала три цикла комплексной терапии продолжительностью 4 недели каждый, после этого растения дополнительно выдерживали на среде с рибавирином в течение месяца при 26°C. Схема ‘В’ была использована для образцов, сильно угнетавшихся при повышенных температурах, в ней был опущен один из этапов термообработки и растения дольше (6–8 недель) росли на среде с рибавирином.

После завершения терапии клоны были повторно протестированы на наличие вирусов методом ОТ-ПЦР. Частота элиминации вирусов составила от 52,5% (SBK) до 85,7% (ХВК). Было получено 48 клонов (43,6% от числа прошедших процедуру оздоровления), полностью свободных от тестируемых вирусов. Из них 13 клонов были оздоровлены от 3–4 вирусов одновременно. Статистически значимых различий в эффективности схем ‘А’ и ‘В’ выявлено не было. Свободные от вирусных инфекций микрорастения будут служить основой для создания криоколлекции картофеля.

VIRUS ERADICATION OF POTATO MICROPLANTS USING THE METHOD OF COMBINED THERAPY

**O.Y. Antonova, E.A. Krylova, A.R. Shuvalova, O.Y. Shuvalov,
T.A. Gavrilenko**

N.I. Vavilov All-Russian Research Institute of Plant Industry RAAS

Russia, Saint-Petersburg, e-mail: *olgaant326@mail.ru*

Potato species are host to the largest number of viruses. Viral diseases are easily transmitted from one year to the next causing accumulation of viruses. Therefore, reliable preservation of potato collections requires the regular monitoring of the phytosanitary status of the accessions and the development of effective methods of viruses elimination. Thermo- and chemotherapy are used for production virus-free plants. In this research we propose modified complex approach for virus eradication of potato *in vitro* plants.

One hundred ten microplants of 107 accessions of 4 cultivated and 7 wild potato species were involved into *in vitro* virus eradication program. Presence of viruses in plants before eradication was analyzed using RT-PCR with virus specific primers (Singh, 1999; Peiman, Xie, 2006; Xu et al., 2010). Most plants (71.8%), especially Chilean landraces, were infected by the multiple viruses (up to five viruses simultaneously). The viruses PVM, PVS and PVY have been shown to be the most widespread (70.9%, 55.5% and 54.5% respectively).

We used a complex therapy as combination of thermo- and chemotherapy with ribavirin (50 mg/L). The method was developed in two modifications - 'A' and 'B'. In both schemes the cuttings of *in vitro* potato plants were cultured in **hormone** free MS medium with ribavirin at +36°C. Scheme 'A' includes three 4-weeks stages of complex therapy (ribavirin and 36°C), finally the plants were exposed 4 weeks in ribavirin-MS medium at 25°C. Scheme 'B' was used for the accessions which were not resistant to high temperature treatment. In the B program one step of thermotherapy was absent and these plants were grown for a longer time (6-8 weeks) in ribavirin medium at room temperature.

The presence/absence of viruses in eradicated plants was tested by RT-PCR with specific primers. The frequency of viruses' elimination in the eradicated plants varied from 52.5% (PVS) to 85.7% (PVX). Efficiency of two therapy methods was compared; there was no statistical significant difference between two programs. 48 virus-free plants were obtained using both methods. 13 of these plants were eradicated simultaneously from multiple virus infections (3-4 viruses). The virus-free microplants will be included in the program for cryopreservation and will serve as a basis to create potato cryo-collections.

This research was supported by grant ISTC 3329.

ИЗУЧЕНИЕ СПОСОБНОСТИ ПШЕНИЦЫ ТЕТРАПЛОИДНОЙ TRITICUM DICOCUM (SCHRANK) SCHUEBL К ИНДУКЦИИ НОВООБРАЗОВАНИЙ IN VITRO

А.А. Доброва, И.С. Замбрибоц, О.Л. Шестопап
Селекционно-генетический институт – Национальный центр семеноводства и сортоизучения
65036, Украина, Одесса, Овидиопольська дорога, 3,
e-mail: dobrovaann@gmail.com

Полбы и двозернянки используются в селекционной практике для обогащения генотипов мягкой пшеницы новыми полезными признаками, в частности, высоким содержанием белка в зерне, устойчивостью к грибным болезням, засухоустойчивостью, морозостойкостью и другими (Дорофеев, 1987). Изучение гаплопродукционной способности тетраплоидной пшеницы представляет научный и практический интерес.

Целью данной работы было изучение способности к индукции новообразований тетраплоидной пшеницей *Triticum dicocum* (Schrank) Schuebl. Материалом служили ярые и озимые формы пшеницы. Культивирование проводилось согласно разработанной методике. Озимые формы тестировались на двух питательных средах: ВAD-1 и 190-2, ярые формы – на средах С17 и М42 и их модификациях С17н, С17В, СМ и М42н. с одинаковым содержанием гормонов (2 мг/л 2,4-Д, 0,5 мг/л кинетина) и источников углерода (60 г/л сахарозы и 17,5 г/л глюкозы) (Замбриборц, 2013).

Показано, что на уровень индукции новообразований влиял как генотип исследуемых растений, так и среды для культивирования. Озимый сорт *T. dicocum* var *rufum* не сформировал новообразований. Ярая форма *T. dicocum* var *rufum* сформировала новообразования с частотой от $2,53 \pm 0,69$ шт. на 100 пыльников (среда М42н) до $5,61 \pm 1,57$ шт. на 100 пыльников (среда 190-2). Озимые формы *T. dicocum* var *atratum* и *T. dicocum* var *triccocum* сформировали новообразования на среде ВAD-1 с частотой $1,21 \pm 0,32$ шт. на 100 пыльников та $1,23 \pm 0,5$ шт. на 100 пыльников соответственно. Максимальный уровень индукции новообразований для ярых форм наблюдался на питательных средах 190-2 и модификациях питательных сред С17н, СМ и С17В.

Таким образом была протестирована способность пяти генотипов тетраплоидных двозернянок к индукции новообразований в культуре пыльников *in vitro* и определены оптимальные условия для индукции новообразований этими формами.

INVESTIGATION OF THE TETRAPLOID WHEAT TRITICUM DICOCCUM (SCHRANK) SCHUEBL ABILITY TO THE IN VITRO INDUCTION

H.A. Dobrova, I.S. Zambriborsh, O.L. Shestopal

The Plant Breeding and Genetics Institute – National Center of Seed & Cultivar Investigation National Academy of Agricultural Science of Ukraine
65036, Ukraine, Odessa, Ovidiopolska road, 3, e-mail: dobrovaann@gmail.com

Triticum spelta and *Triticum dicoccum* are used in breeding for the enrichment of bread wheat genotypes with new useful features, in particular, high level of the protein content in grain, resistance to the fungal diseases, drought, frost and other (Dorofeev, 1987). Investigation of the tetraploid wheat haploid production ability has scientific and practical interest.

The aim of this work was studying *in vitro* the tetraploid wheat *Triticum dicoccum* (Schrank) Schuebl induction ability. The plant materials: spring and winter wheat. Culture was carried out according to the developed technique. Winter forms was tested on two nutrient media: BAD-1 and 190-2, spring forms - on C17 and M42 media and their modifications: C17n, C17B, CM and M42n with the same hormones content (2 mg/l 2,4-D, 0.5 mg/l kinetin) and sources of carbon (60 g/l sucrose and 17.5 g/l glucose) (Zambriborsch, 2013).

It was shown that the plants genotype and culture media affected the level of induction. Winter form *T. dicoccum* var *rufum* did not produce new formation. The frequency of spring form *T. dicoccum* var *rufum* induction was from 2.53 ± 0.69 pc. per 100 anthers (media M42n) to 5.61 ± 1.57 pc. per 100 anthers (media 190-2). Winter forms *T. dicoccum* var *atratum* and *T. dicoccum* var *triccoccum* produce new formations on BAD-1 media with a frequency of 1.21 ± 0.32 pc. per 100 anthers and 1.23 ± 0.5 pc. per 100 anthers respectively. The maximum level of induction for spring forms was observed on nutrient medium 190-2 and nutrient modified media C17n, CM and C17B.

Thus the *in vitro* induction ability of five tetraploid genotypes of *T. dicoccum* was tested. The optimal conditions for the induction of these forms were investigated.

ОСОБЕННОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *IN VITRO* *DESCHAMPSIA ANTARCTICA* DESV. С РАЗНЫХ МЕСТ ПРОИЗРАСТАНИЯ В ПРИБРЕЖНОЙ АНТАРКТИКЕ

О.М. Загричук¹, Н.М. Дробык¹, И.Ю. Парникоза², И.А. Козерецкая³,
В.А. Кунах²

¹Тернопольский национальный педагогический университет имени
Владимира Гнатюка

Украина, Тернополь, e-mail: zagrichuk_oks@mail.ru

²Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины

Киев, Украина, e-mail: kunakh@imbg.org.ua

³Киевский национальный университет имени Тараса Шевченка

Украина, Киев, e-mail: iryna.kozeretska@gmail.com

Deschampsia antarctica Desv. является уникальным представителем семейства злаковых, что вегетирует в особо суровых условиях Антарктики (Alberdi et al., 2002). Целью работы было сравнение условий ввода и культивирования *in vitro* *D. antarctica* из разных мест произрастания в прибрежной Антарктике.

В работе использовали семена, собранные на архипелаге Аргентинские острова (Галиндез, Скуа), а также на островах Ялур, Барселот, Дарбо, Лейхел и мысе Расмуссен в течение 2005–2011 годов. Благоприятным для всхожести семян был период астрального лета в Антарктике (ноябрь–февраль). Показатель прорастания семян из разных локалитетов лежал в пределах 15–55%. Чаще всего на протяжении года проросли семена с о. Галиндез, а самый высокий показатель прорастания был для семян с о. Дарбо. Прорастание семян происходило с 7 по 80 сутки.

Для клонального микроразмножения оптимальной оказалась среда В₅ (Gamborg, Eveleigh, 1968), дополненная 0,1 мг/л кинетина (Кин). Укоренение растений происходило на 6–10 сутки достигало 95%. Существенных различий относительно укоренения растений с разных мест произрастания нами не обнаружено. Наиболее эффективно каллусообразование происходило на эксплантах растений-доноров с о. Галиндез (41–100%) и о. Ялур (62–65%) на питательных средах В₅ и В₅/2 с добавлением 0,9–1 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) и 6-бензиламинопурина 0,09–0,1 мг/л БАП. Наиболее низкими были показатели каллусогенеза на эксплантах растений с о. Дарбо на среде В₅ с 0,5 мг/л 2,4-Д и 0,1 мг/л БАП (4,3%) и с о. Ялур на среде ШХ (Schenk, Hildebrandt, 1972), дополненной 0,5 мг/л 2,4-Д и 0,1 мг/л БАП (6,5%). Обнаружена способность *D. antarctica* к спонтанной регенерации побегов из каллуса при выращивании в условиях освещения на средах В₅, МС (Murashige, Skoog, 1962) и ШХ, дополненных 2,4-Д и БАП. Эффективность регенерации побегов из каллуса от растений с о. Галиндез была выше (на 30–40%) по сравнению с другими образцами. Наиболее низкой была регенерационная способность каллуса корневого происхождения от растений с о. Скуа (10%) и каллуса стеблевого происхождения от растений с о. Дарбо (30%).

Таким образом, нами установлено, что в большинстве случаев интенсивность прохождения процессов жизнедеятельности *in vitro* зависела от места произрастания исходных растений *D. antarctica*.

DETAILS OF *DESCHAMPSIA ANTARCTICA* DESV. CULTIVATION *IN VITRO* DERIVED FROM DIFFERENT LOCALITIES OF VEGETATION IN THE MARITIME ANTARCTIC

O.M. Zagrychuk¹, N.M. Drobyk¹, I.Yu. Parnikoza², I.A. Kozeretska³
V.A. Kunakh²

¹ Volodymyr Hnatiuk Ternopil' National Pedagogical University

Ukraine, Ternopil', e-mail: zagrychuk_oks@mail.ru

² Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine

Ukraine, Kyiv, e-mail: kunakh@imbg.org.ua

³ Taras Shevchenko Kyiv National University

Ukraine, Kyiv, e-mail: iryana.kozeretska@gmail.com

Deschampsia antarctica Desv. is the unique member of the herbaceous family, which vegetates in a particularly harsh environment of Antarctica (Alberdi et al., 2002). The aim of the study was to compare the conditions of introduction and cultivation *in vitro* of *D. antarctica* from different habitats in maritime Antarctic.

In this study, the seeds were collected at Argentine Islands Archipelago (Islands Galindez, Skua) and the islands Yalour, Berthelot, Darboux, Lahille and Cape Rasmussen during 2005–2011 years. The most favorable period for seed germination *in vitro* was during astral summer in Antarctica (November–February). Index of seed germination from different localities varied from 15 to 55%. During the year the seeds, which were collected from island Galindez, were sprouting most often, whereas the highest germination index was observed for the seeds from island Darboux. The seeds germinated between 7 and 80 days.

For micropropagation *in vitro* B₅ medium (Gamborg, Eveleigh, 1968), supplemented with 0.1 mg/l kinetin (Kin) proved to be optimal. Plants rooting occurred between 6 and 10 days and made up to 95%. No significant differences regarding the rooting of plants from different habitats were found. Among the tested variants the callus formation took place most effectively on explants of donor plants from island Galindez (41–100%) and from Yalour (62–65%) on nutrient media B₅ and B₅/2 with the addition of 0.9–1.0 mg/l 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 0.09–0.1 mg/l 6-benzylaminopurine (BAP). The lowest values of callus formation were on explants from plants of Darboux island on B₅ medium with 0.5 mg/l 2,4-D and 0.1 mg/l BAP (4.3%), and from Yalour island on SH medium (Schenk, Hildebrandt, 1972) supplemented with 0.5 mg/l 2,4-D and 0.1 mg/l BAP (6.5%). Ability of *D. antarctica* to spontaneous regeneration of shoots from callus was found to occur when grown in lighting conditions on B₅, MS (Murashige, Skoog, 1962) and SH nutrient media supplemented with 2,4-D and BAP growth regulators. The effectiveness of shoot regeneration in callus of plants from Galindez island was higher (by 30–40%) as compared to other samples. Callus of root origin from plants of Skua island and callus of stem origin from plants of Darboux exhibited the smallest regeneration ability (10% and 30%, respectively).

РЕАЛИЗАЦИЯ МОРФОГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ *POTENTILLA DEPRESSA* WILLD. EX SCHLECHT. В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

А.Ю. Заяц, И.В. Митрофанова

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр, г. Ялта, 298648, Республика Крым, г. Ялта, пгт Никита, e-mail: *in_vitro@ukr.net*

Крым является одним из мировых центров биоразнообразия. Флора сосудистых растений на полуострове насчитывает 2775 видов. Среди них особое место занимают растения, принадлежащие к роду *Potentilla* L.: в Крыму произрастает около 20 представителей рода. Среди них 2 вида (*P. taurica* Willd. ex Schlecht. и *P. depressa* Willd. ex Schlecht.) являются эндемичными. Многие лапчатки декоративны и/или содержат ряд важных групп соединений вторичного происхождения, используемых в разных отраслях народного хозяйства: фармацевтической, пищевой и др.

Целью нашей работы являлось изучение особенностей реализации морфогенетического потенциала органов и тканей *P. depressa* Willd в условиях *in vitro* в связи с сохранением биологического разнообразия дикорастущей флоры.

Материалом для исследований служили вегетативные органы, а также ткани *P. depressa*. В качестве эксплантов были использованы высечки листьев, черешки, апикальные меристемы, междоузлия, корни интактного растения. Их культивировали на агаризованных модифицированных питательных средах МС, WPM, QL, Пирика, Монье, дополненных 6-БАП, зеатином, ГК и НУК в различных концентрациях и соотношениях.

По результатам проведенных исследований подобраны условия получения асептического культуры *P. depressa*. Использование 96% этанола (1 мин) и 1,125% Cl₂ («Дез Таб», Украина) (7 – 13 мин) позволило получить 100% стерильных и 70% жизнеспособных эксплантов (вегетативных почек). Для индукции регенерации микропобегов из вегетативных почек *P. depressa* использовали модифицированную питательную среду МС, содержащую 0,05 – 0,15 мг/л кинетина или 0,4 – 0,8 мг/л БАП и 0,05 – 0,1 мг/л НУК. На вторую – третью неделю культивирования на данной среде из экспланта формировались 2 – 3 микропобега. Для множественного побегообразования развившиеся микропобеги *P. depressa* с листьями помещали на среду МС, дополненную различными концентрациями цитокининов и ауксинов. Определена оптимальная питательная среда для микроразмножения *P. depressa* на основе среды МС, дополненной 2 – 4 мг/л БАП и 0,5 – 1,5 мг/л ГК. На 28 – 35 сут количество розеток *P. depressa* на эксплант составляло в среднем 3-5 шт./эксплант, а количество листьев на розетку было в среднем 8,2±1,26 шт./ розетку. Использование в качестве эксплантов корней, высечек листьев, черешков *P. depressa*. позволяет индуцировать каллусообразование на питательных средах Пирика, дополненных кинетином и НУК в разных концентрациях и соотношениях.

THE REALIZATION OF MORPHOGENETIC CAPACITY OF ORGANS AND TISSUES OF *POTENTILLA DEPRESSA* WILLD. EX SCHLECHT. *IN VITRO*

Oleksii Zaiats, Irina Mitrofanova

Nikitsky Botanical Gardens – National Scientific Center

298648, Crimea, Yalta, Nikita, e-mail: *in_vitro@ukr.net*

Crimea is one of the world's centers of biodiversity. The vascular flora of the Crimea includes 2775 species. Among of them the genus *Potentilla* L. occupied a special place. In Crimea about 20 species of the genus are growth. Two species (*P. taurica* Willd. ex Schlecht. and *P. depressa* Willd. ex Schlecht.) are endemic. Some *Potentilla* species are used as decorative forms. Moreover, the plants contain compounds of secondary metabolism, which are used in various industries (pharmaceutical, food, etc.).

The purpose of our work was to investigate the morphogenetic capacity of organs and tissues of *P. depressa in vitro* in relation with the biodiversity conservation. Introduced explants (leaf disks, petioles, apex, internodes, roots) have been cultivated on MS, WPM, QL, Pierik, Monnier media, supplemented by 6-BAP, zeatin, GA₃, NAA in different combination and concentration.

The result of our give us possibility to shown the optimal protocols of sterilization during the introduction *P. depressa in vitro*. Optimal type of sterilization of vegetative buds in *P. depressa* was 96% ethanol (1 min) and 1,125% Cl₂ («Des Tab », Ukraine) (7 - 13 min). 85% sterile and 17.6% of viable explants were observed. It has been found that MS, containing 0.05 – 0.15 mg l⁻¹ kinetin and 0.4 – 0.8 mg l⁻¹ BAP and 0.05 – 0.1 mg⁻¹ NAA, is the most suitable for the induction of the regeneration of the microshoots from vegetative buds *P. depressa*. For multiple shoot formation the microshoots with leaves were placed on MS medium supplemented with 2 – 4 mg l⁻¹ BAP, and 0.5 – 1.5 mg l⁻¹ GA₃. Active adventitious microshoots regeneration was observed in the second week of cultivation. However, during the 28th – 35th days of the experiment the number of shoots conglomerates reached an average of 3-5 pcs. / explant, the number of microshoots with leaves in the “rosette” reached 8.2 ± 1.2 units.

Explants cultivation on Pierik medium with kinetin and NAA in different concentrations and ratios induced callus development from root pieces, petiole segments and leaf pieces in *P. depressa* during the 40th – 44th and 30th – 35th days of the experiment, respectively.

ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯЦИИ КЛУБНЕОБРАЗОВАНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ГЕНОТИПОВ *SOLANUM TUBEROSUM* L. УКРАИНСКОЙ СЕЛЕКЦИИ

О.Л. Кляченко, В.В. Бородай

Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины
03041, Украина, г. Киев, ул. Героев Оборона, 15
e-mail: veraboro@gmail.com

Основным процессом репродуктивного развития растений картофеля является клубнеобразование. Масса сформировавшихся клубней в заключительной фазе их роста во многом определяется генотипом и, следовательно, требуют дифференцированных условий инициации и роста клубней *in vitro*. В качестве объекта исследования были использованы клубни картофеля: ранних сортов – Серпанок и Повинь, среднеранних – Обериг и Зелёный Гай, среднеспелых – Калиновская и Былина, среднепоздних – Червона Рута и Джерело Полесья.

Определение особенностей клубнеобразования у растений указанных сортов проводили по модифицированной методике Д.П. Остапенко (1986). При этом растения выдерживали в условиях 8-ми часового фотопериода при регулируемой температуре +19-21°C первые 10-12 суток, а затем помещали в термостат (при отсутствии освещения).

В процессе клубнеобразования определяющими являются углеводный и гормональный факторы. Они оказывают воздействие на фотопериодичность клубнеобразования и ростовые реакции, а также на комплекс биохимических процессов. Клубнеобразованию предшествует повышение фотосинтетической активности, накопление фонда ассимилятов в стеблях и интенсивный транспорт углеводов в направлении подземных органов. Замедление роста побегов сопровождалось активным образованием микроклубней. Как правило, микроклубни формировались в пазухах листьев стеблевых эксплантатов или в питательной среде непосредственно на побегах. При этом микроклубни имели овальную или удлинённую форму, различную окраску (от темно-зеленой до темно-фиолетовой в зависимости от генотипа) и размеры (от 4-8 мм). Оптимальной для культивирования была питательная среда МС с добавлением 0,5-0,8 мг/л кинетина, 0,1-0,2 мг/л ИУК, 100-110 мг/л мезоинозита, 8-9% сахарозы, что оказывало существенное стимулирующее влияние на процессы клубнеобразования. Сорты Зелёный Гай, Обериг, Червона Рута и Джерело Полесья характеризовались наиболее высокой способностью к образованию микроклубней. Статистически достоверных взаимосвязей между растениями разных групп созревания не наблюдали.

Таким образом, изучение и оптимизация условий индукции морфогенеза картофеля из культивируемых органов и тканей является необходимой составной частью работы по изучению в культуре *in vitro* новых ценных форм растений этой культуры.

THE PECULIARITIES OF REGULATION OF DIFFERENT GENOTYPES *SOLANUM TUBEROSUM* L. MICROTUBERIZATION OF UKRAINIAN SELECTION

O.L. Klyachenko, V.V. Borodai

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine

03041, Ukraine, Kyiv, str. Heroes of Defense, 15,

e-mail: veraboro@gmail.com

The microtuberization is the main process of reproductive development of potato plants. The weight of tubers formed in the final phase of their growth is largely determined by genotype and therefore require differentiated conditions and tuber initiation *in vitro*. The potato tubers of cultivars: early – Serpanok and Povin, middle-early – Oberig and Zelenyi Gai, mid-season – Kalinovskaja and Buluna, middle-late – Ruta and Jerelo Polessye were the object of researches.

The defining of peculiarities of tuber cultivars of these plants was carried out according to the modified method of D.P. Ostapenko (1986). The plants were kept under 8-hour photoperiod at an adjustable temperature +19-21°C the first 10-12 days, and then placed in an environmental cabinet (without lighting).

The carbohydrate and hormonal factors are the one of the basic factors in the process of microtuberization. These factors affect the photoperiodic response and tuber growth reactions, as well as complex biochemical processes. The photosynthetic activity, the accumulation fund of assimilates in stems and intense transport of carbohydrates in the direction of groundwater parts increase the microtuberization precedes. Slowing growth shoots accompanied by active form microtubers. The microtubers usually formed in the leaf axils or stem explants in the medium directly on the shoots. Thus microtubers were oval or oblong shape, a different color (from deep - green to dark - violet depending on the genotype) and sizes (from 8.4 mm). The MS culture medium supplemented with kinetin – 0.5-0.8 mg/l, IAA – 0.1-0.2 mg/l, mezoinozit – 100-110 mg/l of sucrose – 8-9 % was the optimal for cultivation, which had a significant stimulatory effect on the processes of tuberization. Varieties Zelenuy Guy Oberig, Chervona Ruta and Jerelo Polessye characterized the highest ability to form microtubers. Statistically significant relationships between the different groups of plants ripening weren't observed.

Thus, the study and optimization of conditions for inducing morphogenesis potatoes from cultured cells is a necessary part of work on the study of culture *in vitro* of new forms of plants of this culture.

ЦЕЛИ И ОСОБЕННОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *EX SITU* РАСТЕНИЙ РЕДКИХ ВИДОВ РЕГИОНАЛЬНОЙ ФЛОРЫ В БОТАНИЧЕСКИХ САДАХ

В.В. Корженевский, А.Р. Никифоров

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр

298648, Республика Крым, г. Ялта, пгт Никита:

e-mail: *nikiforov. a.r. @mail.ru*

Испытание растений редких видов региональной флоры в условиях *ex situ* является одной из основных, но специфических функций ботанического сада. Изучение растений малочисленных популяций приуроченных к азональным ландшафтам, в природных условиях весьма затруднено. Поэтому часто эффективные результаты исследований редких видов могут быть получены в культуре. Кроме этого, иногда культивирование растений редкого вида становится единственной возможностью и для его сохранения, так как в культуре могут быть получены и накоплены семена редких растений, представляющие собой своеобразный генетический ресурс раритетного флорофонда.

В культуре изучаются приспособительные особенности растений, экологическая амплитуда, особенности фенологического ритма, онтогенез, морфогенез, экологический генезис видов. Группы растений редких видов являются необходимой материальной базой для разнообразных морфологических, биохимических, физиологических и других исследований, выявления их генетических особенностей. Формирование таких групп является условием получения доступной научной информации для разработки вероятной репатриации диаспор в природную среду обитания того или иного вида.

Задачи введения в культуру растений редких видов требуют разработки прогнозирования интродукционного эксперимента: отбора исходного посадочного материала, поиска оптимальных технологий выращивания растений каждого вида, расчета объема материальных ресурсов, необходимых для содержания групп растений *ex situ*. Предварительно выявленный комплекс внешних факторов природного местообитания дает возможность моделировать условия выращивания растений *ex situ*, прогнозировать агротехнику для формирования новых условий для культивирования растений.

Следует учитывать, что растения в ботанических садах выращиваются в искусственно подобранных условиях, не в полной мере или вообще не соответствующих их экологии. Несоответствие или отсутствие природных экологических факторов, так или иначе, нарушает развитие растений, требует для их выживания значительных затрат. Тем не менее, в Никитском ботаническом саду впервые получены *ex situ* растения и накоплены семена реликтовых эндемиков флоры Горного Крыма: *Sobolewskia sibirica* (Willd.) P. W. Ball, *Lamium glaberrimum* (C. Koch) Taliev, *Silene jailensis* N. I. Rubtzov, *Lagoseris callicephalo* Juz., *Scrophularia exelis* Popl., а также *Zingeria biebersteiniana* (Claus) P. Smirn.

AIMS AND PECULIARITIES OF CULTIVATION *EX SITU* PLANTS OF RARE SPECIES IN REGIONAL FLORA IN BOTANICAL GARDENS

V.V. Korzhenevsky, A.R. Nikiforov

Nikitsky Botanical Gardens – National Scientific Center

298648, Crimea, Yalta, Nikita, e-mail: *nikiforov. a.r. @mail. ru*

Testing of regional flora rare plant species in *ex situ* is one of the main and specific functions of botanical gardens. Studying the plants in small populations grown on azonal landscapes in nature is quite difficult. Besides that, sometimes cultivation of plants from rare species can be the only opportunity for their preservation as in culture the seeds could be collected and saved up, as they are specific genetic resource of the rare flora fund.

Adaptative peculiarities of plants, ecological amplitude, peculiarities of phenological rhythm, ontogenesis, morphogenesis, ecological genesis of species have been studied in culture. The groups of rare species plants are the obligatory material for different morphological, biochemical, physiological and other researches, for revealing their genetic peculiarities. Formation of such groups is necessary for obtaining intelligible scientific information to work out the diaspores repatriation to their natural living conditions.

Tasks of rare plant species introduction in culture demand to work out the prognosis of introductional experiments: selection of original plant material, search of optimal technologies of plant growing for each species, calculation of material resources, necessary for growing plant groups *ex situ* volume. Preliminary determined complex of natural area external factors gives the opportunity to model plants' growing conditions *ex situ*, to make prognosis of agrotechniques for the formation of new conditions for plants cultivation.

It should be noticed that plants in botanical gardens are grown in artificially made conditions not always and fully corresponding their ecology. Unconformity and absence of natural ecological factors break the plant development and demand large expenditure for their survival. In Nikitsky Botanical Gardens *ex situ* plants have been obtained for the first time and the seeds of relict endemic plants from flora of Mountain Crimea *Sobolewschia sibirica* (Willd.) P. W. Ball, *Lamium glaberrimum* (C. Koch) Taliev, *Silene jailensis* N. I. Rubtzov, *Lagoseris callicephalala* Juz., *Scrophularia exelis* Popl., *Zingeria biebersteiniana* (Claus) P. Smirn have been accumulated.

ФИТОХИМИЧЕСКИЕ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ *GLADIOLUS IMBRICATUS*

А.С. Кривавыч¹, Р.Т. Конечная¹, О.П. Боднарчук³, Р.О. Пэтрина¹,
Н.В. Толкачева², Р.М. Гулько¹, В.П. Новиков¹

¹Национальный университет «Львовская политехника»

Украина, г. Львов,

²Никитский ботанический сад – Национальный научный центр
298648, Республика Крым, г.Ялта, пгт Никита

³Ивано-Франковский Национальный медицинский университет
Украина, г. Ивано-Франковск, e-mail: anna_tararaka@ukr.net

Gladiolus imbricatus многолетнее травянистое растение, численность которого постоянно уменьшается, поэтому требуются меры по его охране и сохранению. В народной медицине растение известно широким спектром лечебных свойств и содержит в своем составе гликозиды, витамины, эфирные масла, ароматические и хиноидные соединения.

Значительную часть лекарственных средств в настоящее время производят из природного растительного сырья. Поскольку запасы такого сырья в природе истощаются, наиболее перспективным являются биотехнологические методы получения фитомассы.

Целью нашей работы были фитохимические исследования экстрактов и разработка метода культуры клеток и тканей редкого дикого вида *G. imbricatus*. Для получения экстрактов сырье экстрагировали в аппарате Сокслета с соответствующим экстрагентом (этанол, хлороформ, вода). Полученные экстракты фильтровали и концентрировали в вакууме на водяной бане при 40°С. Количество выхода экстрактивных веществ варьировался от 7-19%.

Физико-химическими методами анализа подтвердили присутствие в полученных экстрактах полисахаридов, флаваноидов, витамина С, ароматических и хиноидных соединений.

Для исследований *in vitro* в качестве эксплантов были использованы свежие клубнелуковицы *G. imbricatus*. Эксперимент проводили на твердой базовой питательной среде Мурасиге и Скуга, содержащей минеральные соли и витамины (100 мг/л мезоинозита, 2 мг/л глицина, 0,5 мг/л никотиновой кислоты, 0,5 мг/л пиридоксина, 0,1 мг/л тиамин) с добавлением 30 г сахарозы, 10 г агара, 0,3 мг/л кинетина, 2,5 мг/л α -нафтилуксусной кислоты. После четырех пассажей получено максимальный прирост биомассы - 30 г/л.

Дальнейшие исследования будут направлены на сравнительный анализ содержания биологически активных веществ в каллусной биомассе и в экстрактах интактного растения *G. imbricatus*.

PHYTOCHEMICAL AND BIOTECHNOLOGICAL ASPECTS OF RESEARCH OF *GLADIOLUS IMBRICATUS*

A.S. Krvavych¹, R.T. Konechna¹, O.P. Bodnarchuk³, R.O. Petrina¹,
N.V. Tolkacheva², R.M. Gulko¹, V.P. Novikov¹

National University "Lviv Polytechnic"

Ukraine, Lviv

²Nikitsky Botanical Gardens – National Scientific Center

298648, Crimea, Yalta, Nikita

³Ivano-Frankivsk National Medical University

Ukraine, Ivano-Frankivsk, e-mail: anna_tararaka@ukr.net

Gladiolus imbricatus is a perennial herb. It grows in dry grasslands and clearings in the bush, and its number is constantly decreasing. Also it is a rare species and requires measures for its protection, preservation and distribution. In folk medicine, the plant is known for a wide range of medicinal properties. It contains glycosides, vitamins, essential aromatic oils and quinones compounds, but the chemical composition requires more detailed study.

A significant part of medicines currently produced from natural plant materials. The most promising methods to obtaining the phytomass are biotechnological, because the reserves of such materials in nature are exhausted.

The aim of the work was the investigation of phytochemical extracts and development of cell and tissue culture method for rare wild species *G. imbricatus*. To obtain extracts raw materials extracted in Soxhlet apparatus with appropriate extractant (ethanol, chloroform, H₂O). The resulting extracts were filtered and concentrated by vacuum distillation in a water bath at 40°C. Output of extracts ranged from 7-19%.

Physico-chemical methods of analysis confirmed the presence of extracts derived polysaccharides flavanoids, vitamin C, and aromatic and quinones compounds.

For *in vitro* researches fresh corms of *G. imbricatus* were used as explants. The experiments were maintained on solidified basal medium Murashige & Skoog which contained mineral salts and vitamins (100 mg/l myo-inositol, 2 mg/l I-glutamic acid, 0.5 mg/l nicotinic acid, 0.5 mg/l pyridoxine HCl, 0.1 mg/l thiamine HCl) and 30 g/l sucrose, 8 g/l agar 2.5 mg/l α -naphthaleneacetic acid (NAA) and 0.3 mg/l kinetin. After four passages maximum biomass growth - 30 g/l was obtained.

Further researches will be directed to the comparative analyses of biological active substances content in callus biomass and in the extracts of *G. imbricatus*.

ВЛИЯНИЕ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ НА УКОРЕНЕНИЕ КРЫЖОВНИКА И СМОРОДИНЫ ЧЁРНОЙ *IN VITRO*

С.А. Матушкин

ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт садоводства им. И.В. Мичурина

393774, г. Мичуринск, ул. Мичурина, 30, e-mail: *invitro82@yandex.ru*

Основная задача на этапе ризогенеза заключается в получении наибольшего количества укоренённых микропобегов с хорошо развитой корневой системой. Некоторые авторы (Упадышев, 2011) указывают о стимулирующем влиянии фенолкарбоновых кислот, в частности, салициловой кислоты, на ризогенез плодовых культур.

Целью наших исследований было изучить влияние салициловой кислоты на ризогенез сортов крыжовника Казачок, Серенада и смородины чёрной Шалуныя, Зелёная дымка. Добавление салициловой кислоты в концентрации 1,0 мг/л к ИМК (1,0 мг/л) ускоряло корнеобразование почти у всех генотипов, за исключением сорта смородины чёрной Зелёная дымка. Начало корнеобразования у сортов крыжовника Серенада и смородины чёрной Шалуныя наблюдали через 2 недели как в контроле, так с салициловой кислотой. Однако процент укоренившихся микропобегов на среде с салициловой кислотой был выше на 13,3-48,5 %. В то время как у сорта крыжовника Казачок корни формировались лишь в варианте с салициловой кислотой – 20,0 %, а у сорта смородины чёрной Зелёная дымка начало корнеобразования отмечали только через 4 недели, и наибольший процент укоренения был на среде с ИМК – 50,0 %. Через 5 недель культивирования процент укореняемости микропобегов на контрольной среде (без салициловой кислоты) у сортов крыжовника Казачок и смородины чёрной Зелёная дымка был на 40,0 и 16,7 % выше, а у сортов крыжовника Серенада и смородины чёрной Шалуныя укоренилось одинаковое количество микропобегов (80,0 %).

По высоте микрорастений, количеству корней и их длине у большинства сортов крыжовника и смородины чёрной разница была не существенна.

Таким образом, салициловая кислота ускоряла процесс корнеобразование, но не влияла на количество укорененных микропобегов и качество корневой системы.

EFFECT OF SALICYLIC ACID ON GOOSEBERRY AND BLECK ROOTING *IN VITRO*

S.A. Matushkin

The I.V Michurin All- Russia Research Institute for Horticulture

393774, Russia, Michurinsk, Michurin Street 30, e-mail: *invitro82@yandex.ru*

The main aim of the stage of rhizogenesis is obtaining the maximum number of rooted microshoots with well developed root system. Some authors (Upadyshev, 2011) show promotion effect of phenolcarbonic acids, salicylic acid in particular, on fruit crops rhizogenesis.

The goal of our investigations was to study salicylic acid effect on rhizogenesis of gooseberry cvs Kazachok, Serenada and black currant cvs Shalunya, Zelyonaya dymka. The addition of salicylic acid at 1.0 mg l^{-1} to IBA (1.0 mg l^{-1}) provided more rapid root development almost in all genotypes except black currant cv. Zelyonaya dymka. The onset of root formation in gooseberry cv Serenada and black currant cv Shalunya was observed in 2 weeks in control and in the treatment with salicylic acid. However the amount of rooted microshoots on medium containing salicylic acid increased by 13.3–58.5%.

In gooseberry cv. Kazachok roots developed only after salicylic acid addition (20.0%). In black currant cv Zelyonaya dymka the onset of root formation was observed only in four weeks with maximum rooting on medium containing IBA – 50.0%. Five week culture resulted in increment of microshoot rooting on control medium (without salicylic acid addition) by 40.0 and 16.7% in gooseberry cv. Kazachok and black currant cv. Zelyonaya dymka respectively. Gooseberry cv. Serenada and black currant Shalunya were characterized by similar number of rooted microshoots (80.0%).

Most of gooseberry and black currant cultivars had insignificant difference in microplant size, root number and their length.

Therefore salicylic acid promoted more rapid root formation without any effect on number of rooted microshoots and root system quality.

ВЛИЯНИЕ ФИЗИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ИНДУКЦИЮ АДВЕНТИВНОГО ОРГАНОГЕНЕЗА В КУЛЬТУРЕ ЛИСТОВЫХ И КАЛЛУСНЫХ ТКАНЕЙ ЯБЛОНИ

О.В. Матушкина

ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт садоводства им. И.В. Мичурина
393774, г. Мичуринск, ул. Мичурина, 30, e-mail: invitro82@yandex.ru

Основным аспектом при изучении особенностей дифференциации *in vitro* является морфогенетическая реакция изолированной ткани, которая зависит не только от генотипа, типа экспланта, минерального и гормонального состава питательной среды, но и физических факторов культивирования, таких, как освещенность и температура.

Изучение влияния светового режима и температуры на регенерацию микропобегов из высечек листа клоновых подвоев яблони 57-491 и 62-396 проводили на среде Мурасиге и Скуга с добавлением БАП (2,0 мг/л) в сочетании с ИМК (0,1 мг/л). Первичное, в течение 2 недель, культивирование листовых эксплантов в темноте при температуре +4°C позволило повысить частоту побегообразования на 13,4% у 57-491 и на 10,0% у 62-396, по сравнению с контролем. Содержание высечек листа в темноте при температуре +24°C не способствовало образованию адвентивных побегов, а приводило лишь к формированию каллуса. Максимальное количество побегов на эксплант (2,0) у подвоя 57-491 было отмечено в варианте с первичным (в течение 2 недель) культивированием при температуре +4°C в темноте, а у подвоя 62-396, наоборот, больше побегов на эксплант образовалось (3,5) при температуре +24°C и 16-часовом фотопериоде – контроль, что, скорее всего, связано с генотипической реакцией подвоев.

Культивирование каллусных тканей подвоя ММ106, полученных от сегментов корней, сегментов стеблей (междоузлия), высечек листа и пазушных меристем проводили в аналогичных условиях, как в предыдущем опыте, но на среде с БАП (4,0 мг/л). Индуцировать образование адвентивных побегов удалось только из каллуса, полученного из пазушных меристем. Определены оптимальные условия культивирования: температура +4°C, темнота в течение первых двух недель, что позволило повысить частоту побегообразования на 40,0%, а количество побегов на эксплант в 4,4 раза.

Различное тканевое происхождение первичных каллусных клеток является одной из причин гетерогенности культуры каллусной ткани, так как не все функциональные особенности исходных дифференцированных клеток передаются в ряду клеточных поколений как стойкие, эпигенетически наследуемые признаки. Поэтому следует помнить, что адвентивный органогенез через стадию каллусообразования сопряжен с риском получения большего количества разнокачественных форм растений, чем при использовании прямой регенерации из апикальных меристем, листовых эксплантов и черешков листа.

EFFECT OF PHYSICAL FACTORS ON INDUCTION OF ADVENTIVE ORGANOGENESIS IN CULTURE OF APPLE LEAF AND CALLUS TISSUES

O.V. Matushkina

The I.V. Michurin All- Russia Research Institute for Horticulture

393774, Russia, Michurinsk, Michurin Street 30, e-mail: *invitro82@yandex.ru*

Morphogenetic response of isolated tissues is a main aspect of studies of differentiation characteristics *in vitro*. Such response depends not only on the genotype, explant type, mineral and hormonal composition of nutrient medium, but also on physical factors of culture such as illumination and temperature.

The effect illumination regime and temperature on microshoots regeneration from leaf cuttings of clonal rootstocks 57-491 and 62-396 was investigated on Murasige and Skoog medium with BAP (2.0 mg/l) and IBA (0.1 mg/l). Initial 2 weeks leaf explants culture at +4°C allowed us to increase shoot development compared with control by 13.4% and 10.0% in 57-491 and 62-396 rootstocks correspondingly. Leaf explants kept in darkness at +24°C showed no adventive shooting but only callus formation. Maximum shoot number per explant (2.0) was observed in rootstock 57-491 during initial 2 week culture in dark at +4°C compared with the rootstock 62-396 with increased shoot number per explant (3.5) at +24°C and 16-hour photoperiod (control) caused, probably, by response of the rootstocks genotype.

Cultivation of callus of MM106 rootstock obtained from root segments, stem (internodes) segments, leaf explants and axillary meristems was conducted in similar conditions except BAP at 4.0 mg l⁻¹ concentration. The development of adventive shoots was induced only from callus formed from axillary meristems. Keeping at +4°C, in dark during the first two weeks was considered optimum one for culture resulting in 40.0% increase of shoot number per explant.

Various tissue origins of initial callus cells is of the reasons of heterogeneity of callus tissue culture as not all functional characteristics of initial differentiated cells are transferred to cell progenies as stable epigenetic inherited traits. Therefore it should be taken into consideration that adventive organogenesis through the stage of callus formation is a risk to get more plant forms not similar to initial genotype compared with the use of direct regeneration from apical meristems, leaf explants and leaf petioles.

ОСОБЕННОСТИ МОРФОГЕНЕЗА И РЕГЕНЕРАЦИИ *AGAVE AMERICANA* L. В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

О.В. Митрофанова, И.В. Митрофанова, Н.П. Лесникова-Седошенко, О.И. Гончарова

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр,
298648, Республика Крым, г. Ялта, пгт. Никита; e-mail: in_vitro@ukr.net

В Никитском ботаническом саду разрабатывается биотехнологическая система размножения агавы американской (*Agave americana* L.) в условиях *in vitro*. Агава американская – многолетнее растение с прикорневыми сочными толстыми зелеными или зелено-пестрыми большими листьями, размножается в основном корневыми отпрысками. Родина растения – Южная Америка. Продолжительность жизни растения от 15 до 20 лет. Агава американская относится к высоко декоративным растениям с высоким содержанием биологически активных веществ.

Изучение путей морфогенеза и особенностей регенерации *Agave americana in vitro* позволяет выявить общие закономерности индукции, реализации процессов соматического эмбриогенеза и органогенеза, а также разработать биотехнологические системы размножения, оздоровления и сохранения растений. Эксперименты по изучению морфогенетических потенций первичных эксплантов (вегетативные почки, меристематические ткани, незрелые семена) 2-х форм *Agave americana* проводили в специально оборудованной биотехнологической лаборатории НБС-ННЦ. Для индукции процессов морфогенеза агавы американской в питательные среды вводили регуляторы роста (БАП, аденин-сульфат, 2ip, НУК, ИУК) в разных соотношениях и концентрациях. Изучение морфогенетических потенций органов и тканей агавы проводили на модифицированных питательных средах Murashige, Skoog (1962) и Anderson (1978). Сосуды с первичными эксплантами (незрелыми семенами) первоначально помещали на 40-60 суток в условия без освещения при низких положительных температурах ($5\pm 1^\circ\text{C}$). Морфогенетический потенциал незрелых семян реализовывался через непрямую регенерацию. При оздоровлении эксплантов из 3-х испытанных вироцидов более эффективным был амиксин.

Изучен морфогенетический потенциал незрелых семян агавы американской, реализуемый через непрямой соматический эмбриогенез и геммогенез, что позволило получить высокую частоту регенерации агавы американской в условиях *in vitro*. Более 300 полноценных растений высажено в стерильный почвенный субстрат.

PECULIARITIES OF MORPHOGENESIS AND REGENERATION OF *AGAVE AMERICANA* L. *IN VITRO*

**O.V. Mitrofanova, I.V. Mitrofanova, N.P. Lesnikova-Sedoshenko,
O.I. Goncharova**

Nikitsky Botanical Gardens – National Scientific Center
298648, Crimea, Yalta, Nikita; e-mail: *in_vitro@ukr.net*

The biotechnological system of propagation of *Agave americana* L. *in vitro* has been worked out in Nikitsky Botanical Gardens. *A. americana* is perennial plant with radical juicy thick green and green-mottled large leaves. It propagates mainly by roots. The motherland of plant is South America. The length of life is 15-20 years. Agave belongs to highly ornamental plants with large content of biologically active agents.

Studying of morphogenesis ways and regeneration peculiarities of *A. americana in vitro* allows to determine the general laws of induction, realization of processes of somatic embryogenesis and organogenesis and also to work out the biotechnological systems of propagation, improvement and conservation of plants. Experiments on studying of morphogenetic capacities of original explants (vegetative buds, meristematic tissues, underdeveloped seeds) of two forms of *A. americana* were done in specially equipped biotechnology laboratory in NBG-NSC. For induction of morphogenesis processes of *A. americana* the mediums were supplemented with growth regulators (BAP, adenine-sulfate, 2ip, NAA, IAA) in different combination and concentration. Investigation of morphogenetic capacities of agave organs and tissues was done on modified culture mediums Murashige, Skoog (1962) and Anderson (1978). Vessels with primary explants (underdeveloped seeds) first were placed in the conditions without light and low positive temperatures ($5\pm 1^{\circ}\text{C}$) during 40-60 days. Morphogenetic capacities of underdeveloped seeds were realized through indirect regeneration. Amixin was the most effective for explants treatment among three tested virocidases.

Morphogenetic capacities of underdeveloped seeds of *Agave americana* realized through indirect somatic embryogenesis and hemogenesis has been studied. This allows obtaining the high level of regeneration of agave in conditions *in vitro*. More than 300 full-bodied plants were planted in sterilized soil substract.

АНТРОПОГЕННАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ МИКОБИОТЫ ПОЧВ

С.Т. Назарбекова¹, М. Мырзахметов²

¹Казахский национальный университет имени аль-Фараби, г. Алматы,
e-mail: snazarbekova@mail.ru

²Казахский национальный технический университет имени К.Сатпаева,
г. Алматы

Грибы являются важным компонентом биоценоза почвы. Они контролируют широкий спектр функций биосферы. Процессы, сопровождающие антропогенные преобразования микобиоты, могут привести к разрушению механизмов регулирования и баланса биосинтеза и биодegradации органических веществ в почве. В связи с этим актуальной задачей является оценка значимости биоиндикативных микологических показателей. Антропогенное преобразование почвенной микобиоты приводит к изменениям в растительном покрове. Естественная растительность вместе с почвенными микроорганизмами также выступает как мощный природный биологический фильтр и биогенный преобразователь.

Были исследованы образцы почв различных карьеров горнодобывающего предприятия (г. Рудный, Казахстан) в течение 2012 – 2013 гг. Содержание тяжелых металлов в почве были определены по методике Прайса AAS-IN (Carl Zeise, Jena) на атомно-абсорбционном спектрофотометре.

Мы использовали микологические методы исследования. Выполнен качественный анализ видового состава почвенных грибов. На разных уровнях загрязнения тяжелыми металлами (ТМ), по нашим предварительным данным, часто наблюдается разнонаправленное изменение одних и тех же показателей. Сравнительный анализ проб почвы указывает на существенные различия в содержании и распределении микромицетов по горизонтам. В микробной биомассе с экспериментальных точек доля грибов на порядки ниже в сравнении с контролем, содержание грибов с глубиной понижается. По-видимому, это объясняется структурно-функциональными особенностями микромицетов. В почве распределение грибов сопряжено с формированием почвенного профиля в результате постоянно протекающих процессов минерализации органического вещества. При разных концентрациях ТМ большое биоиндикационное значение имеют структурные изменения грибных сообществ: соотношение темно- и светлоокрашенных видов, быстро- и медленно растущих грибов. По нашим предварительным данным 37% от общего количества почвенных грибов, составляют темноокрашенные анаморфные грибы (р.р. *Alternaria* и *Cladosporium*). Кроме того, в порядке убывания численных показателей расположились быстрорастущие виды *Mucorales*. Большинство светлых мицелиальных грибов образуют третью группу. Наконец, медленно растущие виды составили малочисленную группу. Контрольные образцы (экологически чистая зона г. Рудный) имеют относительно равномерное распределение грибов по горизонтам (56-83%, 50-76%, 50-60%). В опытных точках наблюдается снижение этих показателей (37-40, 37-41% и 35-37%, соответственно). Таким образом, значительная роль в биоремедиации почв принадлежит микробным сообществам. Микромицеты, будучи основным компонентом почвенной биоты, выполняют несколько функций в круговороте веществ, в том числе самоочищения от ксенобиотиков.

ANTHROPOGENIC TRANSFORMATION OF SOIL MYCOBIOTA

S.T. Nazarbekova¹, M. Myrzahmetov²

¹al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

e-mail: *snazarbekova@mail.ru*

²Satbayev Kazakh National Technical University, Kazakhstan, Almaty

Fungi are an important component of soil biocenosis. They control a wide range of functions of biosphere. Processes accompanying anthropogenic transformation of mycobiota may lead to the destruction of regulatory mechanisms and balance of biosynthesis and biodegradation of organic matter in the soil. In this connection it is an actual problem of assessing the significance bioindicative mycological indicators. Anthropogenic transformation of mycobiota leads to changes in the vegetation cover. Natural vegetation with soil microorganisms also acts as a powerful natural biological filter and biogenic converter.

Soil samples of different quarries mining enterprise (Rudniy, Kazakhstan) were investigated during 2012 - 2013 years. The content of heavy metals in the soil was determined by the method of Price AAS-IN (Carl Zeise, Jena) with an atomic absorption spectrophotometer.

We used mycological research methods. It was a qualitative analysis of the species composition of edaphic fungi. At different levels of heavy metals (HM) pollution, according to our preliminary data, opposite changes of the same indicators were often observed. Comparative analysis of soil samples indicates significant differences in the content and distribution of micromycetes on the horizons. In the microbial biomass from the experimental points the part of fungi on orders below in comparison with the control, the content of fungi-depth decreases. Apparently, this is due to the structural and functional features of micromycetes. In soil, distribution of fungi associated with the formation of the soil profile as a result of constantly occurring processes of organic substances mineralization. At different concentrations of HM great bioindicative importance has structural changes of fungal communities: the ratio of dark and light-colored species, fast and slow growing mushrooms. According to our preliminary data 37% of the total number of soil fungi, made dark-colored types of anamorphic fungi (*Alternaria* and *Cladosporium*). Further, in descending order of numerical indicators settled fast-growing species *Mucorales*. Most light-colored mycelial fungi formed the third group. Finally, slow-growing specie formed the smallest group. Control samples (ecologically clean zone Rudniy) have relatively uniform distribution of fungi on horizons (56-83%, 50-76%, 50-60%). In the experimental points decline in these indicators (37-40, 37-41% and 35-37%, respectively) has been noticed.

Thus, significant role in bioremediation of soil belongs to microbial community. Micromycetes, which being the main component of soil biota, perform multiple functions in the cycle of substances, including the self-cleaning of xenobiotics.

МОРФОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ КУКУРУЗЫ, ВЫРАЩЕННЫХ В УСЛОВИЯХ ТЕПЛИЦЫ, ПОСЛЕ РЕГЕНЕРАЦИИ *IN VITRO*

И.А. Нитовская¹, О.Е. Абраимова², Т.Н. Сатарова², Б.В. Моргун¹

¹Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины
03680, Украина, г. Киев, ул. Академика Заболотного, 148

e-mail: molgen@icbge.org.ua

²Государственное учреждение Институт сельского хозяйства степной зоны
НААН Украины,
49600, Украина, г. Днепропетровск, ул. Дзержинского, 14

Кукуруза (*Zea mays* L.) является важной пищевой, кормовой и технической культурой, культивируемой по всему миру в промышленных масштабах. Современные потребности агропромышленного комплекса требуют интенсификации селекционного процесса и расширения генетического разнообразия, в том числе с помощью биотехнологических методов, большинство из которых базируются на использовании процессов каллусогенеза и регенерации растений в культуре *in vitro*. Регенеранты кукурузы сложно поддерживать длительное время в условиях *in vitro*, поэтому для сохранения полученного материала их необходимо высаживать в почву. Для зимнего времени года это может быть исключительно закрытый грунт, то есть теплица. В данной работе представлены результаты по выращиванию в теплице регенерантов кукурузы гибридов F1 ДК633/266♀×PLS61♂ и ДК959♀×PLS61♂, полученных из каллуса II типа после культивирования незрелых зародышей кукурузы.

Регенеранты кукурузы высаживали в грунт и культивировали в условиях теплицы с 12-ти часовым световым режимом при температуре 22-25°C и влажности 55%. Приживаемость регенерантов в грунте составила от 50 до 85%. Морфологически регенеранты отличались от растений кукурузы, выращенных из семян в поле. Они были меньшего размера (от 25 до 95 см). Вместо метелки на верхушке побега у регенерантов в условиях теплицы формировался початок с двуполыми цветками: мужскими на верхушке початка и женскими у основания. Тогда как, растения, выращенные из семян в условиях теплицы, сохраняли обычную морфологию соцветий. Верхушечный початок регенерантов не был покрыт оберточными листками. На каждом растении помимо верхушечного образовывалось 1-2 пазушных початка обычной морфологии. Верхушечный початок был больше по размеру, чем пазушные. Размер верхушечных початков у тепличных регенерантов был меньше, чем у растений, выращенных в полевых условиях из семян (от 7 до 15 см). Растения оказались фертильными. Женские цветки, которые росли на верхушечном початке, завязали семена, тогда как на пазушных початках семена, как правило, не завязывались за исключением одиночных семян на отдельных початках. Количество семян, которое образовывалось на верхушечном початке, было от 4 до 40. Всхожесть полученных семян составила 99%. Вегетационный период регенерантов от высадки в грунт до созревания семян составил три месяца.

Таким образом, регенеранты кукурузы данных генотипов, полученные в результате биотехнологических манипуляций *in vitro*, могут расти в закрытом грунте и завязывать семена, хотя и имеют измененную морфологию мужского соцветия.

MAIZE PLANTS MORPHOLOGY GROWN IN THE GREENHOUSE AFTER REGENERATION *IN VITRO*

I.A. Nitovska¹, O.Ye. Abraimova², T.H. Satarova², B.V. Morgun¹

¹Institute of Cell Biology and Genetics Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine

03680, Ukraine, Kyiv, Akademika Zabolotnoho str., 148

e-mail: molgen@icbge.org.ua

²State Enterprise Institute of Agriculture of Steppe Zone of NAAS of Ukraine

49600, Ukraine, Dnipropetrovsk, Dzerzhynsky Str., 14

Maize (*Zea mays* L.) is one of the most economically important crops which was considerably improved by modern biotechnology. Biotechnological methods are mainly based on *in vitro* plant regeneration. In order to retain plant material, maize regenerants need to be grown in soil. During cold weather seasons, it must be propagated exclusively under greenhouse condition. In the present studies the results on maize regenerants cultivation in greenhouse are presented. The maize plants were regenerated from 'type II' callus which was established from immature embryos of hybrids F₁ ДК633/266♀×PLS61♂ and ДК959♀×PLS61♂.

The maize regenerants were planted in soil and grown under greenhouse condition with 12-hour photoperiod, 22-25 degrees centigrade and 55% humidity. Survival of the regenerants after planting to soil was from 50 to 85%. Morphologically the regenerants differed from the control maize plants grown from seeds. The regenerants were smaller (25–95 cm high). Under greenhouse condition, the ears with male (at the top) and female (at the bottom) flowers developed instead of the panicle on the apex of the regenerant shoots. The plants grown from seeds in the greenhouse retained usual morphology of the inflorescences. The apex ear of the regenerants was not covered by wrapping sheets. Each regenerant had 1-2 axillary ears of usual morphology. The apex ear was larger than axillary ears and varied from 7 to 15 cm in length. Nice to notice the regenerants were fertile. Female flowers of the apex ear set approximately 2-40 seeds. Female flowers of the axillary ears did not set seeds. The germination of the obtained seeds was 100%. Vegetative period for maize regenerants from planting into soil to setting seed was about three months.

Therefore, maize regenerant plants obtained from immature embryos of hybrids F₁ ДК633/266♀×PLS61♂ and ДК959♀×PLS61♂ have been successfully grown in the greenhouse and set healthy seeds despite the reversed morphology of the male inflorescences.

ПРИМЕНЕНИЕ УЛЬТРАЗВУКОВОГО ОБЛУЧЕНИЯ ДЛЯ ЦИТОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ РАСТЕНИЙ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ *IN VITRO*

Р.В. Папихин, С.А. Муратова, В.А. Солопов

ФГБОУ ВПО Мичуринский государственный аграрный университет

Россия, г. Мичуринск, e-mail: *parom10@mail.ru*

Клетки эпидермиса листьев и устьица являются важным морфологическим показателем, по которому судят о плоидности растений, особенностях роста, прохождении различных физиологических процессов и т.д. Для растений, культивируемых *in vitro*, требуется быстрый и качественный способ цитологического исследования, позволяющий диагностировать генетические и морфологические изменения, возникающие у эксплантов.

Для приготовления цитологических препаратов листьев растений, культивируемых *in vitro*, применяли направленное ультразвуковое излучение.

Давление ультразвука на клетки растительных тканей приводит к микронадрывам клеточной стенки. В момент воздействия формируется избыточное давление в клетке, это приводит к вымыванию в окружающую среду цитоплазмы с органоидами.

При продолжительном действии на листовую пластинку ультразвука воздействию, помимо эпидермиса, подвергаются более глубокие слои клеток (губчатый и столбчатый мезофилл) и в конечном итоге, удаётся получить листовую пластинку, имеющую только скелет, состоящий из клеточных стенок, что в значительной степени облегчает исследование световой микроскопией эпидермального слоя.

Применение данного способа приготовления цитологических препаратов позволяет провести первичный отбор генотипов с одинаковым и изменённым уровнем плоидности по количеству хлоропластов в замыкающих клетках устьиц, достоверно предположить наличие химерности в эпидермисе растений, установить реакцию растений на изменение условий культивирования *in vitro*.

Работа выполнена при поддержке Министерства сельского хозяйства РФ.

APPLICATION SONICATION FOR CYTOLOGY MORPHOLOGICAL FEATURES PLANTS CULTIVATED IN VITRO

R.V. Papikhin, S.A. Muratova, V.A. Solopov

Michurinsky State Agrarian University

Russia, Michurinsk, e-mail: *parom10@mail.ru*

Leaf epidermal cells and stomata are important morphological parameters on which judge ploidy plants, especially growth, origin, various physiological processes etc. For plants cultivated *in vitro*, fast and qualitative cytology method giving possibility of diagnoses genetic and morphological changes arising from explants is required.

Directional ultrasonic radiation was used for cytological preparations of leaves from *in vitro* cultivated plants.

Ultrasound pressure on the cells of plant tissues leads to cell wall microanguish. Upon the exposure an overpressure generated in the cell, this leads to leaching cytoplasm and organelles into the environment.

Under the ultrasound long-term action on the leaf blade, in addition to the epidermis, deeper layers of cells (columnar and spongy mesophyll) are exposed and eventually it is managed to get lamina having only a skeleton consisting of cell walls, which greatly facilitates the study of light microscopy epidermal layer.

Application of this method for preparation of cytological preparations allows for the primary selection of genotypes with the same and altered level of ploidy by the number of chloroplasts in the guard cells of stomata, reliably assume the presence of chimeras in the epidermis of plants, to establish plant responses on change of cultivation conditions *in vitro*.

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

ВЛИЯНИЕ СОДЕРЖАНИЯ АЗОТА В ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ НА РИЗОГЕННУЮ АКТИВНОСТЬ КЛОНОВЫХ ПОДВОЕВ ЯБЛОНИ *IN VITRO*

И.Н. Пронина

ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт садоводства
им. И.В. Мичурина
393774, Россия, г. Мичуринск, ул. Мичурина, 30
e-mail: *invitro82@yandex.ru*

Отличительной особенностью состава питательной среды Мурасиге и Скуга (МС) является высокая концентрация неорганического азота. Соотношение аммонийного (NH_4NO_3) и нитратного (KNO_3) азота в данной среде, по мнению Н.В. Катаевой и Р.Г. Бутенко (1983), является оптимальным. Стимулирующий эффект на процесс корнеобразования, как указывают Н.В. Дубовицкий и др. (1988), S.E. Hundman et al. (1982), S.Sriskandarajah et al. (1990), оказывает уменьшение концентрации азота. В наших исследованиях уменьшение концентрации аммонийного и нитратного азота в 8 раз, на фоне 1,0 мг/л ИМК, увеличивало укореняемость микропобегов подвоя яблони 54-118 на 21,7 % по сравнению с контролем (1/2 МС). Различия по качеству корней не существенны. Полное отсутствие азота или только аммонийной формы оказывало существенное влияние лишь на развитие корней: снижалось количество корней и их длина, в то время как существенных различий по укоренению не наблюдали.

Культивирование микропобегов подвоев яблони 54-118 и 3-17-38 непосредственно перед укоренением на среде Мурасиге и Скуга с пониженным содержанием аммонийного азота в 2 раза стимулировало процессы корнеобразования. Так, у 54-118 при содержании $\frac{1}{2} \text{NH}_4\text{NO}_3$ увеличивалось количество укорененных микропобегов на 12,9%, при этом в 2,6 раза уменьшалось количество корней. Снижение же концентрации аммонийного азота в питательной среде до 1/4 или его отсутствие сдерживало ризогенез. Анализ результатов, полученных по подвою 3-17-38 показал, что различия по укореняемости и качеству корней в вариантах не существенны. Однако следует отметить, что уменьшение содержания NH_4NO_3 в 2 и 4 раза ускоряло процесс ризогенеза на 2 недели по сравнению с его полным содержанием по прописи Мурасиге и Скуга (контроль). Уже через 3 недели культивирования в данных вариантах отмечалась высокая укореняемость (93,7 и 87,5%), в то время как в контроле – только через 5 недель (92,3%). Отсутствие аммонийного азота в питательной среде сдерживало корнеобразование и ухудшало качество корней как у подвоя 54-118, так и 3-17-38.

Следовательно, для процессов корнеобразования клоновых подвоев яблони *in vitro* необходимо определенное соотношение аммонийного и нитратного азота в питательных средах.

THE EFFECT OF NITROGEN CONCENTRATION IN NUTRIENT MEDIUM ON RHIZOGENIC ACTIVITY OF APPLE CLONAL ROOTSTOCKS *IN VITRO*

I.N. Pronina

The I.V. Michurin All- Russia Research Institute for Horticulture

393774, Russia, Michurinsk, Michurin Street 30, e-mail: *invitro82@yandex.ru*

High concentration of inorganic nitrogen is a distinctive characteristic of Murasige & Skoog nutrient medium (MS). According to N.V. Kataeva and R.G. Butenko (1983) the ratio of ammonium (NH_4NO_3) and nitrate (KNO_3) nitrogen in the given medium is an optimum one. N.V. Dubovitskii, et al. (1988), S.E. Hundman et al. (1982), S. Sriskandarajah et al. (1990) showed that reduced concentration of nitrogen stimulated root development. In our experiments the 8 times decrease of ammonium and nitrate nitrogen concentration at 1.0 mg/l IBA has resulted in increase of microshoot rooting in apple rootstock 54-118 by 21.7% compared with control (1/2MS). There are insignificant differences in quality of a root system. Full lack of nitrogen or the only ammonium form considerably effects just root system development: by reduction of number and length there are hardly any considerable distinctions in rooting.

Microshoots culture of apple rootstocks 54-118 and 3-17-38 directly before rooting on Murasige & Skoog medium with half as much concentration of ammonium nitrogen stimulates root development. Thus at $\frac{1}{2} \text{NH}_4\text{NO}_3$ the number of rooted microshoots has increased by 12.9% but the number of roots decreased in 2.6 times. Reduction of ammonium nitrogen in nutrient medium up to 1/4 or its lack hampers rhizogenesis. Analysis of the results obtained with use rootstock 3-17-38 has shown insignificant differences in rooting and root system quality between treatments. It should be pointed out that 2 and 4-fold decrease of NH_4NO_3 concentration accelerates rhizogenesis by 2 weeks compared with full concentration for Murasige-Skoog formula (control). The highest level of rooting (93.7 and 87.5%) has been observed in these treatments already in 3 weeks of culturing as in control-only in 5 weeks (92.3%). Lack of ammonium nitrogen in nutrient medium delayed root development and decreased quality of root system both in rootstock 54-118 and 3-17-38.

Therefore the specific ratio of ammonium and nitrate nitrogen in nutrient media is necessary for root development of apple clonal rootstocks *in vitro*.

МЕТОДЫ КУЛЬТУРЫ ТКАНЕЙ В СЕЛЕКЦИИ ЛИЛИЙ

Г.М. Пугачева

ГНУ Всероссийский НИИ садоводства им. И.В. Мичурина

Россельхозакадемии

Россия, г. Мичуринск, e-mail: *pugacheva711@gmail.com*

Создание нового сорта лилии – длительный процесс. От опыления до передачи на Государственное испытание проходит от 7 до 10 лет для сортов с высоким коэффициентом вегетативного размножения и 10-15 – с низким. А получить межвидовые гибриды без использования биотехнологических методов практически невозможно.

Цель работы – подобрать условия стерилизации исходного растительного материала, определить состав питательной среды, регуляторы роста на начальных стадиях развития зародышей и семян лилий для обеспечения интенсивной пролиферации побегов и формирования луковиц.

В результате проведенной работы установили, что для стерилизации зеленых плодов (коробочек) достаточно использовать 96% этиловый спирт, в который погружали коробочку и обжигали над пламенем спиртовки 3-4 раза.

Зрелые стратифицированные и нестратифицированные семена стерилизовали 0,04%-ным раствором нитрата ртути (120 с.) и коммерческим препаратом Белизна (50% раствор – 30 мин.). Инфекции значительно больше было при введении стратифицированных семян (до 53%), чем не стратифицированных (2-3%). Частота регенерации была одинаковой, от 23 до 87%, в зависимости от скрещиваний. Поэтому для введения лучше использовать не стратифицированные семена, а для стерилизации – коммерческий препарат Белизна.

Для опытов за основу брали питательную среду, состоящую из минеральных солей по Мурасиге и Скуга. Было отмечено, что чем более зрелые зародыши вводятся, тем меньше требуется регуляторов роста. Экспериментальным путем было установлено, что зрелые семена предпочтительней вводить на среду с 0,1 мг/л НУК. Использование БАП в концентрациях выше 1,0 мг/л в среде приводило к изменению морфологии побегов луковичек. При проращивании семян лилий на среде с содержанием БАП 0,5 мг/л и НУК 0,1 мг/л было отмечено образование соматических эмбриоидов в основании семядоли.

В межвидовых скрещиваниях процент регенерации в среднем был 28,7, аутбредных – 86, близкородственных – 34.

Таким образом, результаты исследований показали, что культура тканей является, несомненно, высокоэффективным способом получения нового исходного материала и быстрого ее размножения. Это позволяет ускорить селекционный процесс на 3-5 лет.

METHODS OF TISSUE CULTURE IN LILY BREEDING

G.M. Pugacheva

I.V. Michurin All-Russia Research Institute of Horticulture subordinated to Russian Academy of Agricultural Sciences
Russia, Michurinsk, e-mail: *pugacheva711@gmail.com*

Obtaining a new lily cultivar is a long term process. The period from pollination up to inclusion into the state trials lasts for 7-10 years and 10-15 years in cultivars with high and low coefficient of vegetative propagation respectively. Isolating interspecific hybrids is practically impossible without use of biotechnological methods.

The aim of the studies is determination of optimum conditions for initial plant material sterilization and nutrient medium composition, growth regulators at initial stages of lily embryo and seed development for intensive shoot proliferation and bulb development.

96% ethyl alcohol is recommended for sterilization of green fruit (bolls). Bolls were dipped into it and 3-4 times burn above the flame of alcohol burner.

Mature stratified and non-stratified seeds were sterilized with 0.04% mercury nitrate solution (120 s) and commercial product Belizna (50% solution – 30 min). Introduction of stratified seeds resulted in more high level of infection (up to 53%) compared with non-stratified (2-3%). Regeneration was similar (from 23 up to 87%) depending on crosses. Therefore non-stratified seeds should be used for introduction and Belizna product for sterilization.

In experiments Murashige & Skoog nutrient medium containing mineral salts was used as a basic one. The more mature embryos are introduced the less quantity of growth regulators is required. In the experiments it has been established that mature seed introduction into medium containing NAA at concentration 0.1 mg/l is more desirable. Bulblet morphology varied under the effect of BAP at concentration exceeding 1.0 mg/l. Somatic embryoids developed in cotyledon base during lily seed germination on medium containing 0.5 mg/l BAP and 0.1 mg/l NAA. In interspecific outbred and congruent crosses the per cent of regeneration was 28.7, 86 and 34 respectively.

Therefore the results of studies show that tissue culture is doubtless a high efficient method of obtaining a new initial material and for its quick propagation. It allows 3-5 year acceleration of breeding process.

ПРИМЕНЕНИЕ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИ СИНТЕЗИРОВАННОГО РАСТВОРА АНОЛИТ ДЛЯ СТЕРИЛИЗАЦИИ СЕМЯН РЕДКИХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ ПРИ ВВЕДЕНИИ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO*

Г.Н. Сафронова¹, М.В. Габленко², О.И. Коротков¹

¹ГБУ ВО «Волгоградский региональный ботанический сад»

400007, Россия, г. Волгоград, пос. Metallургов, 68, а/я 23

e-mail: vrbs@list.ru

²Россия, Московская область, г. Дубна, ул. Тверская, 9, а/я 157, ООО «НПО Перспектива»

e-mail: m.gablenko@rambler.ru

При введении в культуру *in vitro*, особенно редких видов растений, для получения стерильных проростков часто используют зрелые и незрелые семена.

Растительные экспланты стерилизуют растворами веществ, содержащими активный хлор, двуххлористую ртуть, перекись водорода, синтетические комплексные стерилизаторы. Реже используют бром, серную кислоту. Продолжительность стерилизации колеблется от 5 до 30 минут и зависит от типа и сроков изоляции экспланта, генотипа растения и других факторов. При разработке оптимальной методики стерилизации семян редких видов растений использовали следующие вещества: «Лизоформин 3000» и электрохимически обработанный раствор нейтрального анолита. Контролем являлась лабораторная всхожесть.

Анолит – электрохимический раствор, синтезированный на установке «РЕДО» (изготовитель – НПО «Перспектива», г. Дубна, Московская обл.) с исходной концентрацией по активному хлору ($C_{a.x.}$) 192 мг/л, рН 6,8. Анолит обладает бактерицидными свойствами и является чистым антисептиком (Габленко, 2012). Стерилизацию первичных эксплантов проводили по общепринятым методикам (Бутенко, 1999). В работе использовали семена редких видов растений сем. *Caryophyllaceae*, занесенных в Красные книги Российской Федерации и Волгоградской области - *Silene hellmannii*, *Silene cretacea*, *Eremogone koriniana*.

Стерильные экспланты высаживали на безгормональную среду по прописи Murashige T., Skoog F. (1962). В результате было установлено, что при использовании анолита и «Лизоформина», в оптимальных концентрациях, для стерилизации семян редких видов растений применение анолита оказалось более эффективным. Отмечено, что при использовании анолита всхожесть семян и количество стерильных эксплантов значительно выше: *Eremogone koriniana* – 80%, *Silene hellmannii* – 53%, *Silene cretacea* – 40%, чем в контрольном варианте. При использовании «Лизоформина» всхожесть семян уменьшалась и составила 20%, 50%, 10% соответственно.

Использование альтернативных способов стерилизации является основой сохранения и размножения редких видов в культуре *in vitro*.

ELECTROCHEMICALLY SYNTHESIZED ANOLYTE SOLUTION FOR STERILIZATION OF SEEDS OF RARE SPECIES PLANTS INTRODUCING *IN VITRO* CULTURE

G.N. Safronova¹, M.V. Gablenko², O.I. Korotkov¹

¹"Volgograd Regional Botanical Garden"

Russia, Volgograd, vill. Metallurgists, 68, p.o.b. 23

e-mail: vrbs@list.ru

²Russia, Moscow region, Dubna, Str. Tverskaya, 9, p.o.b 157, «SPA Perspective"

e-mail: m.gablenko@rambler.ru

During the introduction of particularly rare species for the preparation of sterile germination in the culture *in vitro* it is often used mature and immature seeds. At the same time it is used different substances containing active chlorine, mercury dichloride, hydrogen peroxide, complex synthetic sterilizers for sterilization of explants. Bromine, sulfuric acid are used less. Sterilization time ranges from 5 to 30 minutes and depends on the type and period of explants' isolation, plant's genotype and other factors. It was used the following substances: "Lizoformin" and electrochemically finished neutral anolyte solution during elaboration of optimal methods of sterilization of seeds of rare species plants. The laboratory germination became the monitoring.

Anolyte - electrochemical solution synthesized on the "REDO" (producer – SPA "Perspective", Dubna, Moscow region). Initial concentration of active chlorine ($C_{a,x}$) was 192 mg/l, pH 6.8. Anolyte has antibacterial properties and is clean with antiseptic (Gablenko, 2012). Sterilization of primary explants was performed by standard methods (Butenko, 1999). We used seeds of rare plants seeds. *Caryophyllaceae*, listed in the Red Book of the Russian Federation and the Volgograd region - *Silene hellmannii*, *Silene cretacea*, *Eremogone koriniana*

Sterile explants were plated onto the medium by the prescription Murashige and Skoog (1962). As a result, it was found that using an anolyte and "Lizoformin", in optimum concentrations for sterilizing seeds of rare plants - the application of the anolyte was more effective. It is noted that using an anolyte germination and quantity of sterile explant is significantly higher: *Eremogone koriniana* - 80%, *Silene hellmannii* - 53%, *Silene cretacea* - 40% than in the control embodiment. Germination of seeds decreased and amounted to 20%, 50%, 10%, respectively by using "Lizoformin" using of alternative methods of sterilization is one of the key stages of conservation and breeding of rare species in culture *in vitro*.

ВВЕДЕНИЕ РАСТЕНИЙ РОДА *MISCANTHUS* В КУЛЬТУРУ *IN VITRO*

А.С. Секан, Г.Я. Баер, Е.Н. Шиша, С.П. Ожередов, А.И. Емец

Институт пищевой биотехнологии и геномики, НАН Украины

04123, Украина, г. Киев, ул. Осиповского 2а, e-mail: ehirta3@gmail.com

В последнее время активно ведется поиск альтернативных источников энергии, среди которых все более популярным становится энергетическое сырье растительного происхождения. В связи с этим среди растительных культур возрастает внимание к представителям рода *Miscanthus*. Растения этого рода способны к накоплению большого количества биомассы и продуцированию высококачественной целлюлозы (Zhang et al., 2012). Кроме того, следует отметить эффективное использование мискантуса в сельском хозяйстве в качестве объекта депонирования питательных веществ и минералов. Поскольку на сегодняшний день не разработан эффективный метод получения культуры *in vitro* растений рода *Miscanthus*, актуальным является разработка и оптимизация протоколов индукции каллусогенеза и регенерации растений в культуре *in vitro* разных представителей данного рода.

Целью наших исследований было введение в культуру *in vitro* трех видов мискантуса: *M. giganteus*, *M. sacchariflorus*, *M. chinasilf* для последующего получения высокопродуктивных полиплоидных линий. Для культивирования эксплантов использовали среду Мурасиге и Скуга (Murashige and Skoog, 1962), содержащую в качестве регуляторов роста 2,4-Д (5 мг/л) и бензиламинопурина - БАП (250 мг/л). Для стерилизации растительного материала (придаточные почки корня) использовали разные концентрации этанола, перекиси водорода, гипохлорита натрия, корзалекса и нитрата серебра. В результате работы подобрана оптимальная процедура стерилизации придаточных почек корня. Наиболее эффективными агентами стерилизации оказались 1,5%-ный раствор нитрата серебра и 25%-ный – гипохлорита натрия. Наивысшая частота регенерации побегов исследуемых образцов оказалась у эксплантов *M. giganteus* – 63%. В настоящее время проводятся исследования по полиплоидизации растений мискантуса трех видов с использованием соединений динитроанилинового ряда как индукторов полиплоидии.

OBTAINING *IN VITRO* CULTURE OF *MISCANTHUS* SPECIES

A.S. Sekan, G.Ya. Bayer, E.N. Shysha, S.P. Ozheredov, A.I. Yemets

Institute of Food Biotechnology and Genomics, National Academy of Sciences of Ukraine

04123, Ukraine, Kyiv, Osipovskogo Str. 2a, e-mail: ehirta3@gmail.com

At last decade an alternative energy sources have been widely discussed. Usage of green biomass is a perspective way to resolve this problem. One of the promising candidates for biofuel feedstock production among the plant abundance is the perennial grass *Miscanthus*. Plants of this genus are the useful non-food source for the large-scale biomass and high-quality cellulose production (Zheng et al., 2012). Moreover, in agriculture *Miscanthus* grass is used as an object for the deposition of different minerals and nutrients. Since, there is no effective protocol for *in vitro* culture estimation of *Miscanthus* plants, development and optimization protocols for *in vitro* callus and plant regeneration of different *Miscanthus* species remain relevant topic for researchers.

The aim of this study was an introduction of three *Miscanthus* species into *in vitro* culture for the development of highly-produced polyploidy lines. For this purpose explants (root adventitious buds) of *M. giganteus*, *M. sacchariflorus*, *M. chinensis* were cultivated on Murashige and Skoog's medium (Murashige and Skoog, 1962) supplemented with phytohormones 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D, 5 mg/L) and benzylaminopurine (BAP, 250 mg/L). For the tissue sterilization different concentrations of ethanol, sodium hypochlorite, hydrogen peroxide, chlorine gas, korsolex and silver nitrate were used. During sterilization the most appropriate scheme was elaborated. It was found that the most efficient sterilization agents were 1.5% silver nitrate and 25% sodium hypochlorite. In turn, the highest capacity (63%) of shoot regeneration was shown for *M. giganteus*. At present an experiments on cell polyploidization of three *Miscanthus* species with dinitroaniline compounds as polyploidy inductors are carrying out.

НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКАЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ ЛАБОРАТОРИИ БИОТЕХНОЛОГИИ В СТРУКТУРЕ УЧЕБНО- ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ТЕПЛИЧНОГО КОМПЛЕКСА МИЧГАУ

В.А. Солопов, С.А. Муратова, Р.В. Папихин

ФГБОУ ВПО Мичуринский государственный аграрный университет

393760, Россия, г. Мичуринск, ул. Интернациональная 101

e-mail: solopov@mgau.ru

В состав учебно-исследовательского тепличного комплекса МичГАУ входят: учебно-лабораторный корпус площадью более 1500м², зимняя теплица общей площадью 5000м² и автоматизированная газовая котельная. Эксплуатация начата в феврале 2013 г. Теплица рассчитана на круглогодичную эксплуатацию с полностью автоматизированной и компьютеризированной регулировкой микроклимата: температуры, влажности, освещенности, а также режима питания и полива растений. Ввод в эксплуатацию современной многорядной теплицы модели 9,6 SR дает уникальную возможность совместить достижения биотехнологии по клональному микроразмножению растений с самыми современными способами адаптации и выращивания садовых культур на искусственных субстратах (минеральная вата) с применением гидропоники.

Комплексная исследовательская работа проводится на стыке разных научных направлений, что позволяет получить новые данные в биологии и практические результаты в области агробиотехнологии растений. Проводятся исследования по разработке и усовершенствованию селекционного процесса с использованием современных методов биотехнологии, цитологии, молекулярной биологии. На базе лаборатории биотехнологии МичГАУ создана обширная коллекции *in vitro* плодовых, ягодных, овощных и декоративных культур. Оптимизированы методики клонального микроразмножения садовых культур, в том числе нетрадиционных ягодных растений: ежевики, ежемалиновых гибридов, жимолости, актинидии, лимонника китайского и др. Разработаны эффективные протоколы регенерации адвентивных побегов из изолированных соматических растений. Ведется работа по разработке эффективных методов полиплоидизации растений *in vitro* и отбора генотипов с измененным уровнем ploidy. С использованием методов культуры зародышей получены уникальные отдаленные гибриды семечковых культур. В научных учреждениях г. Мичуринска разработаны методики облучения лазером растительных тканей, позволяющие существенно повысить коэффициент размножения, значительно усилить прирост растений и устойчивость их к различным неблагоприятным стресс-факторам, а также эффективность ризогенеза черенков, в том числе в культуре *in vitro*. Эти методы будут апробированы в новом тепличном комплексе.

RESEACH AT THE LABORATORY OF BIOTECHNOLODY IN THE STRUCTURE OF THE GREENHOUSE COMPLEX AT MICHURINSK STATE AGRARIAN UNIVERSITY

V.A. Solopov, S.A. Muratova, R.V. Papikhin

Michurinsk State Agrarian University

393760, Russia, Michurinsk, Internationalnaya Str., 101,

e-mail: solopov@mgau.ru

The structure of educational and research greenhouse complex includes teaching and laboratory building area of more than 1500 m², winter greenhouse with a total area of 5000m² and automated gas boiler. Complex exploitation started in February 2013. The greenhouse is designed for year-round exploitation with a fully automated and computerized control of microclimate temperature, humidity, light intensity, as well as the system for feeding and watering plants. Using modern multilane greenhouse 9.6 SR model provides a unique opportunity to combine the achievements of biotechnology for clonal propagation of plants with the most modern methods of acclimatization and plant-growing of horticultural crops on low-capacity hydroponics (mineral wool).

Complex research work carried out at the junction of different scientific fields is aimed to provide new data in biology and practical results in the field of plant agribiotechnology. Research is conducted to develop and to improve selection process with the use of modern of biotechnology, cytology, molecular biology methods.

On the basis of biotechnological laboratory of Michurinsk State Agrarian University there has been formed a collection which includes fruit crops, non-traditional small fruit, vegetable and ornamental plants *in vitro*. Methods of clonal micropropagation of horticultural crops, including non-traditional berry plants such as blackberry and raspberry-blackberry hybrid, honeysuckle, actinidia, *Schizandra chinensis* have been optimized.

Effective protocols regeneration of adventitious shoots from isolated somatic tissues aimed at increasing the genetic diversity of agricultural crops have been developed much work is dedicated to the research of *in vitro* chemically induced polyploidization in plants and selection of genotypes with altered ploidy level. Distant hybrids of unique seed fruits have been obtained due to the use of embrioculture technique. In research institutions of Michurinsk the technique of laser treatment of plant tissues are developed increase the multiplication, significantly to enhance the growth of plants and their resistance to various adverse stressors, as well as to provide the effectiveness of root formation of cuttings, including *in vitro* cultures. These methods will be tested in the new greenhouse complex.

МЕТОД ЭМБРИОКУЛЬТУРЫ ДЛЯ ИНТЕНСИФИКАЦИИ СЕЛЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССА ИРИСА

Л.И. Тихомирова

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Алтайский государственный университет»

656049, Россия, г. Барнаул, пр. Ленина, 61,

e-mail: L-tichomirova@yandex.ru

Довольно часто при переносе зародыша на искусственную питательную среду из одного зародыша развивается только одно растение. Однако на определённых питательных средах у зародыша можно индуцировать образование пазушных меристем прямым путём, это увеличивает коэффициент размножения в несколько раз и ускоряет сам процесс размножения гибридного растения. Главную роль в этом процессе играют компонентный состав питательной среды на этапе введения в культуру. Влияние этих компонентов у ириса прослеживается до 4 месяцев культивирования зародышей.

Цель исследования – отработать метод эмбриокультуры *Iris ensata*, *I. sibirica* для интенсификации селекционного процесса ириса.

Для зародышей *Iris ensata*, *I. sibirica* использованы среды следующего гормонального состава: 1) 1 мкМ БАП + 1 мкМ НУК, 2) 2,5 мкМ БАП, 3) 2,5 мкМ БАП + 0,5 мкМ ИМК, 4) 5 мкМ БАП + 0,5 мкМ ИМК, 5) 6 мкМ БАП + 5 мкМ НУК+ L-глутамин и аденинсульфт. Контролем служила безгормональная среда MS. На всех испытанных питательных средах регенеранты из зародышей двух видов ириса имели хорошо развитые листья, а иногда и корни. На среде с 6 мкМ БАП + 5 мкМ НУК, дополненной L-глутамином и аденинсульфатом в количестве 100 мг/л (L-гл. и ад-с.), у зародышей в нулевом пассаже наряду с основным формировались адвентивные побеги.

В двухлетнем возрасте регенеранты имели высокодекоративный вид, что позволило в более ранние сроки проводить комплексную оценку декоративности и устойчивости гибридов и одновременно осуществлять клональное микроразмножение отборных форм. Благодаря чему селекционный процесс ускоряется на 3-4 года.

METHOD OF EMBRYOCROP FOR INTENSIFICATION OF IRIS BREEDING PROCESS

L.I. Tikhomirova

Altai State University

656049, Russia, Barnaul, Lenina Ave., 61, e-mail: *L-tichomirova@yandex.ru*

Very often at embryo transfer in artificial nutritional medium only one plant develops from one embryo. But in definite nutritional media it is possible to induce formation of axile meristems by direct way, so propagation coefficient increases in some times and accelerates propagation process of the hybrid plant. Components of nutritional medium play the main role in this process at the stage of introduction into culture. Influence of these components of iris is observed up to 4 months of embryo cultivation.

The aim of investigation is to work out method of embryocrop of *Iris ensata*, *I. sibirica* for intensification of *Iris* breeding process.

For embryos *I. ensata*, *I. sibirica* we used media of the following hormonal composition: 1) 1 μM BAP + 1 μM NAA, 2) 2.5 μM BAP, 3) 2.5 μM + 0.5 μM IBA, 4) 5 μM BAP + 0.5 μM IBA, 5) 6 μM BAP + 5 μM NAA + L-glutamin and adeninesulphate. Medium without hormones was the control. In all tested nutritional media regenerative agents of embryos of two iris species had well developed leaves, and sometimes roots. In a medium with 6 μM BAP + 5 μM NAA, added with L-glutamin and adeninesulphate in a quantity of 100 mg/l (L-gl. and ad.s.), adventitious shoots were formed in embryos in a zero passage along with the main passage.

In two years age regenerative plants had highly ornamental view, so it was possible to carry out complex estimate of hybrid ornamentation and resistance in earlier periods and simultaneously to propagate selective forms by microclonal method. Due to this fact, breeding process accelerates by 3-4 years.

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ И ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ВИРУСА ОСПЫ СЛИВЫ В ЕВРОПЕЙСКОЙ ЧАСТИ БЫВШЕГО СССР

С.Н.Чирков¹, И.В.Митрофанова², О.В.Митрофанова²

¹Биологический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова,
119991, Россия, г. Москва, e-mail: *s-chirkov1@yandex.ru*

² Никитский ботанический сад – Национальный научный центр,
298648, Республика Крым, г. Ялта, пгт. Никита; e-mail: *in_vitro@ukr.net*

Исследование растительного генофонда и его состояния невозможно без мониторинга фитопатогенов. Вирус оспы (шарки) сливы (ВОС, *Plum pox virus*, род *Potyvirus*, сем. *Potyviridae*) считается самым вредоносным вирусным патогеном косточковых плодовых культур. Вирус передается вегетативно и распространяется несколькими видами тли. Основными методами диагностики ВОС являются иммуноферментный анализ и полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией. Независимыми группами исследователей вирус был обнаружен в Латвии, Литве, Беларуси, на Украине, в т.ч. в Республике Крым, Молдове и в различных регионах России (Московской, Тверской, Тульской областях, черноземной зоне, среднем и нижнем Поволжье, Ставропольском и Краснодарском краях). Природными хозяевами вируса являются виды рода *Prunus* и ряд неродственных видов многолетних травянистых растений-резерваторов. В Европейской части бывшего СССР ВОС выявлен на сливе (*P. domestica*), персике (*P. persica*), нектарине (*P. persica* var. *nectarine*), алыче (*P. cerasifera*), терне (*P. spinosa*), вишне (*P. cerasus*), войлочной вишне (*P. tomentosa*) и сливе канадской (*P. nigra*). Вирус обнаружен в различных типах насаждений косточковых культур: коллекциях, питомниках, плодоносящих и заброшенных садах, декоративных насаждениях, дикорастущих деревьях в городской и сельской местности, на дачных участках, а также в культуре *in vitro*. На основании анализа геномных последовательностей различают 9 штаммов вируса: Dideron (D), Marcus (M), Recombinant (Rec), Cherry (C), Cherry Russian (CR), Winona (W), El Amar (EA), Turkish (T), и Ancestral (An). Шесть из них (D, M, Rec, W, C, CR) обнаружены в Европейской части. Особенностью популяции ВОС на постсоветском пространстве является широкое распространение штаммов W (Латвия, Россия, Украина), C (Молдова, Россия, Беларусь) и CR (Россия), исключительно редких или вообще не обнаруженных в других регионах мира. Из-за высокой степени зараженности косточковых культур ВОС для получения безвирусных растений необходимо применение современных биотехнологических методов.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант 14-04-01786а).

DISTRIBUTION AND GENETIC DIVERSITY OF PLUM POX VIRUS IN EUROPEAN PART OF THE FORMER USSR

S.N. Chirkov¹, I.V. Mitrofanova², O.V. Mitrofanova²

¹Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University
119991, Russia, Moscow, e-mail: *s-chirkov1@yandex.ru*

²Nikita Botanical Gardens – National Scientific Center
298648, Crimea, Yalta, Nikita; e-mail: *in_vitro@ukr.net*

Pathogen-free status of some plant material is essential to its successful biotechnological applications. *Plum pox virus* (PPV, genus *Potyvirus*, family Potyviridae) is the causal agent of the Sharka disease and considered the most detrimental viral pathogen of stone fruit crops. PPV is transmitted by several aphid species and by grafting. The uncontrolled exchanges of infected propagative material are the main pathway for PPV spread over long distances. Serological and molecular assays based on ELISA and reverse transcription-polymerase chain reaction are the methods of choice for the accurate PPV detection and identification. By several independent studies, PPV has been reported from Latvia, Lithuania, Belarus, Ukraine (including Crimea), Moldova and Russia (Moscow, Tver, Tula, Stavropol, Krasnodar regions, all over the chernozem zona, and along the Volga river basin). Natural hosts of the virus are the *Prunus* species and, occasionally, some unrelated herbaceous plants. In European part of the former USSR PPV was detected in plum (*P. domestica*), peach (*P. persica*), nectarine (*P. persica* var. *nectarine*), myrobalan (*P. cerasifera*), blackthorn (*P. spinosa*), downy cherry (*P. tomentosa*), sour cherry (*P. cerasus*) and Canadian plum (*P. nigra*). PPV has been found in various types of stone fruit plantings: collections, nurseries, fructiferous and abandoned orchards, decorative plantings, private gardens, wild stone fruit trees growing in urban and rural areas, and also in vitro cultures. Based on genome sequence analysis, nine phylogenetically distinct PPV strains have been recognized to date: Dideron (D), Marcus (M), Recombinant (Rec), Cherry (C), Cherry Russian (CR), Winona (W), El Amar (EA), Turkish (T) and Ancestral (An). The strains differ in antigenic properties, epidemiological behaviour, host range and pathogenicity for different stone fruits. Six of them (D, M, Rec, W, C, CR) have been revealed in the European part. The wide dissemination of PPV isolates belonging to the strains W (Latvia, Russia, Ukraine), C (Moldova, Belarus, Russia), and CR (Russia) seems to be the most important feature of the PPV population in the former USSR. On the contrary, these strains were only sporadically identified or even have never been detected in other countries until now. Due to high incidence of PPV in stone fruit plantings, the modern biotechnological approaches should be employed to virus-free plants production.

This work was supported in part by the Russian Foundation for Basic Research, project No.14-04-01786a.

СОЛЕТОЛЕРАНТНОСТЬ ПРОРОСТКОВ РИСА В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

К.А. Шаргородская¹, С.А. Игнатова¹, Д.В. Шпак²

¹Селекционно-генетический институт — Национальный центр семеноводства и сортоизучения

Украина, г. Одесса, e-mail: *biophyta@mail.ru*

²Институт риса НААН

Украина, г. Скадовск

Одним из основных направлений селекции риса в Украине считается создание раннеспелых высокопродуктивных сортов, устойчивых к засолению почв. Исследованиями последних лет установлено, что по солеустойчивости рис уступает многим культурным злакам, в том числе пшенице. Засоление, особенно хлоридное, тормозит все ростовые процессы и отрицательно влияет на развитие вегетативных и генеративных органов риса.

Поэтому целью данной работы было изучение способности зрелых семян различных генотипов риса прорасти в условиях искусственного засоления — растворы солей NaCl и Na₂SO₄ (1,7% и 2,0% соответственно). В задачи исследования входило тестирование генотипов риса на способность формировать проростки под действием растворов сульфата и хлорида натрия с концентрациями, выявление наиболее солетолерантных форм риса и получение от них семян.

В работе тестировали 14 генотипов риса (*Oryza sativa* L.) коллекции Института риса НААН. Критерием отбора служила оценка морфометрических параметров (длины главного корня и надземной части) 10-дневных проростков риса. Данные измерений обрабатывали статистически с применением программы Microsoft Excel. Наиболее выносливые к солям проростки были высажены в сосуды для доращивания в искусственных условиях и получения семян.

Наибольшую солеустойчивость проявили проростки сорта Виконт и гибрида Славянец×Виконт. Проростки этих генотипов выдерживали максимальную концентрацию 2,0% NaCl. Проростки остальных сортов и гибридов — Курчанка, Агат, Престиж, Премиум, Престиж×Янтарь, Малыш×Виконт, Славянец×Виконт, Престиж×Юпитер — показали достоверно меньшую степень устойчивости к данному селективному фактору. Выявлено, что с увеличением концентрации солей NaCl и Na₂SO₄ происходит постепенное уменьшение средней длины главного корня и надземной части проростков.

Таким образом, в результате проведенного исследования выявлены отличия уровня солетолерантности изученных генотипов. Определено, что сорта Виконт, Агат, Престиж, Премиум, которые сохраняли способность прорасти на растворе NaCl 2,0% концентрации, могут быть перспективным материалом для селекции. Среди гибридов по этому признаку представляют интерес Престиж×Янтарь, Малыш×Виконт, Славянец×Виконт.

SALT TOLERANCE OF THE RICE SEEDLINGS *IN VITRO*

K.A. Shargorodskaya¹, S.A. Ignatova¹, D.V. Shpak²

¹Plant breeding and Genetics Institute — National Centre of Seed and Cultivar Investigation

Ukraine, Odessa, e-mail: *biophyta@mail.ru*

²Rice Research Institute at UASS

Ukraine, Skadovsk

One of the main directions of rice selection in Ukraine is the creation of early high-productive varieties, which resistant to saline soils. There were showed that salt resistance of rice is lower than in many crops, including wheat, by researches of recent years. Salinization, especially chloride, slows all the growth processes of rice and negatively affects the development of vegetative and generative organs.

The purpose of this work is to study the ability of mature seeds of the different genotypes of rice to germinate in solutions of salts NaCl and Na₂SO₄ (1.7 and 2.0%). The tasks were: testing rice genotypes on the ability to form seedlings under action of solutions of sulfate and sodium chloride with the concentrations of 1.7 and 2.0%; identify the most salt tolerance forms of rice and harvesting.

There were tested 14 rice genotypes (*Oryza sativa* L.) of collection of Rice Research Institute at UASS for this work. There were calculated the average length of the main root and overground part of seedlings. The measurement data were processed statistically using Microsoft Excel. The most salt tolerant seedlings were planted in the pots and transferred in the climatic chamber to produce a crop.

The most salt tolerance seedlings were ones of the cultivar Vikont and hybrid Slavyanez × Vikont. The seedlings of these genotypes maintained the maximum concentration of 2.0% NaCl. The seedlings of other cultivars and hybrids — Kurchanka, Agat, Prestige, Premium, Prestige × Jantar, Malysh × Vikont, Prestige × Upiter — showed a weak resistance to the selective factor. There was the gradual reduction of the morphometric parameters of the seedlings with the concentration increase of NaCl and Na₂SO₄.

Thus, there were revealed the differences in the salt tolerance level of the studied genotypes. There were determined that the cultivars Vikont, Agat, Prestige, Premium may be a perspective material for the breeding. Among the hybrids on this basic were of interest Prestige × Jantar, Malysh × Vikont, Slavyanez × Vikont.

ВИРУСНЫЕ БОЛЕЗНИ ХРИЗАНТЕМЫ (*CHRYSANTHEMUM x HORTORUM* BAILEY) И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИЕМЫ ОЗДОРОВЛЕНИЯ РАСТЕНИЙ

Ю.В. Шепотько, О.В. Митрофанова

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр

298648, Республика Крым, г. Ялта, пгт. Никита; e-mail: *in_vitro@ukr.net*

Хризантема садовая (*Chrysanthemum × hortorum* Bailey) обладает высокой декоративностью, имеет неограниченные возможности использования в озеленении, в качестве горшечной и срезочной культуры в любое время года. На протяжении многих лет Никитский ботанический сад занимается интродукцией, селекцией и отбором сортов хризантемы садовой для озеленения, а также ежегодной осенней выставкой коллекционных и перспективных сортов отечественной и зарубежной селекции. Многолетнее привлечение посадочного материала хризантемы в коллекционные посадки НБС-ННЦ способствовало распространению вирусов и вирусных болезней растений и снижению их декоративных и эстетических качеств. В связи с этим целью нашего исследования было выявление сортов с симптомами поражения вирусной инфекцией, идентификация возбудителей болезней и поиск эффективных путей оздоровления растений.

В настоящее время коллекция Никитского ботанического сада насчитывает более 200 сортов и коллекционных форм мелкоцветковой и крупноцветковой хризантемы. В результате проведенных обследований коллекционных посадок обнаружено более 20 симптомов вирусных инфекций. Так, симптомы хлоротической крапчатости выявлены у 10 сортов мелкоцветковой (Costa, Mona Lisa, Remos и др.) и 40 сортов крупноцветковой (Discovery, Sheena Red, Чародейка и др.) хризантемы. Вместе с тем на 20 сортах мелкоцветковой и 10 сортах крупноцветковой хризантемы были выявлены симптомы мозаики.

В связи с этим начаты исследования по идентификации возбудителей вирусных болезней, поиску и испытанию ингибиторов вирусов для оздоровления сортов хризантемы *in vitro*.

VIRUS DISEASES OF *CHRYSANTHEMUM* × *HORTORUM* BAILEY AND BIOTECHNOLOGY METHODS OF PLANTS CLEANING UP

Yu.V. Shepotko, O.V. Mitrofanova

Nikitsky Botanical Gardens – National Scientific Center
298648, Crimea, Yalta, Nikita; e-mail: *in_vitro@ukr.net*

Chrysanthemum (*Chrysanthemum* × *hortorum* Bailey) is the culture with high ornamental characteristics having unlimited opportunities for landscape gardening, pots and cuttings in any time of the year. For many years Nikitsky Botanical Gardens is engaged in introduction, breeding and selection of chrysanthemum varieties for landscape gardening and also for yearly autumn chrysanthemum show of collection and perspective varieties of home and foreign breeding. Introduction of plant material of chrysanthemum in collection of NBG-NSC promoted spreading of virus and virus diseases and deterioration of ornamental and aesthetic qualities. In this connection the aim of our research was to determine varieties with symptoms of virus infection, to identify the disease agent and to find the effective ways for plants cleaning up.

Now the collection of Nikitsky Botanical Gardens consist of more then 200 varieties and collection forms of small-flower and large-flower chrysanthemum. More then 20 symptoms of virus infection have been found in the result of done researches. The symptoms of chlorotic mottle have been determined for 10 varieties of small-flower chrysanthemum (Costa, Mona Lisa, Remos and others) and for 40 varieties of large-flower chrysanthemum (Discovery, Sheena Red, Charodeyka and others). The symptoms of mosaic have been determined for 20 varieties of small-flower chrysanthemum and 10 varieties of large-flower chrysanthemum.

In the connection the investigations on identification of virus disease agents, search and test of virus inhibitors for cleaning up of chrysanthemum cultivars *in vitro* are begun.

ОСОБЕННОСТИ НАКОПЛЕНИЯ ФЛАВОНОИДОВ В ТКАНЯХ *STEVIA REBAUDIANA* BERT. В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Л.М. Шпак, О.И. Дзюба, Дж.Б.Рахметов

Национальный ботанический сад им. Н.Н. Гришко НАН Украины

Украина, г. Киев, e-mail: shpak_lesya_kiev@mail.ru

Стевия (*Stevia rebaudiana Bertoni*) – многолетнее травянистое растение, листья которого содержат ряд дитерпеновых стевиол-гликозидов, веществ с высокой подслащающей способностью и обладают уникальными свойствами: они не токсичны, низкокалорийны, не имеют мутагенной активности, к ним не наблюдается привыкания, как к традиционным подсластителям – ксилиту и сорбиту. Эти свойства делают стевию чрезвычайно перспективной для использования в качестве заменителя.

Кроме того, стевия содержит белки, минералы: фосфор, железо, натрий, магний, хром, кобальт, селен, танины, витамины: аскорбиновую кислоту, провитамин А, тиамин, рибофлавин. Последнее время много внимания уделяется антиоксидантным свойствам стевии.

Известно, что флавоноиды обнаружены в проростках на 2-3 сутки. Исходя с этого, целью наших исследований было изучение количественного и качественного содержания флавоноидов в тканях стевии и динамики их накопления. Особенное внимание нами уделялось изучению растений в культуре *in vitro* поскольку размножение стевии *in vitro* весьма актуально в связи с трудностью образования полноценных семян, высокими затратами по их сбору, а также их низкой фертильностью и почти полной потерей всхожести при хранении. Применение этого метода значительно увеличивает коэффициент размножения по сравнению с обычным черенкованием, позволяет получать свободные от болезней растения при сохранении генетической однородности и стабильности.

Содержание флаваноидов определяли по методике разработанной Санкт-Петербургской государственной химикофармацевтической академией, а качественный состав – методом тонкослойной хроматографии.

Наибольшее количество флаваноидов было выявлено в листьях взрослых растений до периода цветения – 0,56-0,64 мг%. В листьях растений выращенных *in vitro* выявлено 0,6-0,63 мг%, а в калусе – около 0,14 мг% флаваноидов. Что касается качественного состава, то наибольшая часть флаваноидов представлена рутином, обнаружены также следы кверцетина.

THE FEATURES OF FLAVONOIDS ACCUMULATION IN *STEVIA REBAUDIANA* BERT. TISSUES DEPENDING ON CULTIVATION CONDITIONS

L. Shpak, O. Dzyuba, D. Rakhmetov

M.M. Gryshko National Botanical Garden of NAS of Ukraine

Ukraine, Kiev, e-mail: shpak_lesya_kiev@mail.ru

Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) – the perennial grassy plant, which leaves contain a number of diterpen steviol-glycosides, substances with high sweetening ability. It possesses such unique properties as: non-toxicity, low-calorie, no mutagenic activity, habituation to them has not been observed, as to traditional sweeteners (xylite and sorbite). These properties make *Stevia* extremely perspective for use as sugar substitute for people.

Besides, *Stevia* contains proteins, minerals (phosphorus, iron, sodium, magnesium, chrome, cobalt, selenium, tannins), vitamins (ascorbic acid, pro-vitamin A, thiamine, riboflavin). A lot of attention is paid recently to antioxidant properties of *Stevia*.

According to the literature data flavonoids have been found in 2-3 days old sprouts. So the aim of our researches was studying of quantitative and qualitative composition of flavonoids in *Stevia* tissues and organs together with its comparative characteristics depending on cultivation conditions.

We paid special attention to studying of plants in *in vitro* culture due to the actuality of *Stevia* propagation using this method. It relates to difficulties of *Stevia* cultivation in field (low percentage of high-grade seeds, rapid loss of their germination during storage, high expenses on seeds and vegetative mass harvesting). Application of this method considerably increases reproduction factor in comparison with usual rooting of shoot cuttings, allows to receive pathogen free plants along with preservation of genetic uniformity and stability.

We determined the flavonoids content by using methodology developed in St. Petersburg State Chemical Pharmaceutical Academy. Qualitative composition was determined by thin layer chromatography method.

The greatest number of flavonoids was revealed in leaves of adult plants till the flowering period – 0.56-0.64 mg%. In leaves of plants cultivated *in vitro* – 0.6-0.63 mg%, and in callus – about 0.14 mg% of flavonoids are revealed. In regard to qualitative composition, the greatest part of flavonoids is presented by rutin, quercetin traces are also found.

ВЛИЯНИЕ СОДЕРЖАНИЯ АЗОТА В ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ МУРАСИГЕ-СКУГА НА ПРОЛИФЕРИРУЮЩУЮ СПОСОБНОСТЬ СОРТОВ МАЛИНЫ *IN VITRO*

Л.В. Ярмоленко

ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт садоводства им. И.В. Мичурина
393774, Россия, г. Мичуринск, ул. Мичурина, 30,
e-mail: *invitro82@yandex.ru*

Процессы, протекающие при культивировании тканей растений, в значительной мере регулируются минеральными компонентами питательной среды, их соотношением и концентрацией (Катаева, Бутенко, 1983). В связи с этим подбор оптимального состава питательных сред для размножения должен обеспечивать максимальные показатели роста и развития эксплантов и качество образовавшихся побегов.

Целью исследований было изучение регенерационной способности сортов малины Яркая, Клеопатра, Шахзада, Оранжевое чудо, Лимонная на средах с уменьшенным содержанием азота. В качестве вариантов опыта использовали минеральную основу питательной среды Мурасиге и Скуга с полным (контроль) и половинным содержанием NH_4NO_3 и KNO_3 , а также с $\frac{1}{4}$ концентрацией NH_4NO_3 . Высокий коэффициент размножения у большинства сортов, за исключением Оранжевое чудо, отмечен в варианте с $\frac{1}{4}$ NH_4NO_3 и варьировал от 6,6 до 12,4 шт./экспл. Однако побеги на данной среде имели признаки витрификации и были не пригодны для дальнейшего субкультивирования. Оптимальной для этих сортов оказалась среда с уменьшенным вдвое содержанием аммонийной и нитратной форм азота, на которой отмечена высокая регенерационная способность – от 6,8 до 18,1 шт./экспл., а также отсутствовали хлороз и витрификация. Данная среда была оптимальной для укоренения микропобегов и увеличивала их длину в 1,1-3,4 раза. У сорта Оранжевое чудо существенных различий по коэффициенту размножения на изучаемых средах не выявлено (7,4-8,9 шт./экспл). Однако среда с половинным содержанием NH_4NO_3 и KNO_3 способствовала увеличению числа микропобегов пригодных для укоренения, по сравнению с контролем, в 1,8 раза.

Таким образом, снижение аммонийной формы азота в 2 раза повышало коэффициент размножения у сортов малины в 1,2-2,3 раза и увеличивало число побегов пригодных для укоренения.

EFFEKT OF NITROGEN CONTENT IN MURASIGE-SKOOG NUTRIENT MEDIUM ON PROLIFERATION OF RASPBERRY CULTIVARS *IN VITRO*

L.V. Yarmolenko

The I.V Michurin All- Russia Research Institute for Horticulture,
393774, Russia, Michurinsk, Michurin Street 30, e-mail: *invitro82@yandex.ru*

Mineral compounds of nutrient medium, their ratio and concentration significantly effect processes during plant tissue culture (Kataeva, Butenko, 1983). Therefore the calculation of optimum nutrient media for propagation should provide maximum growth and development of explants and quality of developed shoots.

The aim of the investigation was to study a regenerative capacity of raspberry cvc Yarkaya, Kleopatra, Shakhrazada, Oranzhevoe Chudo, Limonnaya on media with reduced nitrogen content. There were treatments with Murasige & Skoog mineral nutrient media containing full (control) and halved concentration of NH_4NO_3 and KNO_3 and $\frac{1}{4}\text{NH}_4\text{NO}_3$ concentration. High coefficient of propagation in most of cultivars except Oranzhevoe Chudo was observed in $\frac{1}{4}\text{NH}_4\text{NO}_3$ treatment and varied from 6.6 to 12.4 pieces/explants. However shoots on this media showed vitrification symptoms and were unsuitable for subculturing. The medium with halved content of ammonium and nitrogen was an optimum one for these cultivars resulting in high regenerative capacity- from 6.8 up to 18.1 pieces/explants and lack of chlorosis and vitrification. The number of microshoots with length optimum for rooting increased in 1.1-3.4 times. In cv Oranzhevoe Chudo there were no significant differences in propagation coefficient on tested media (7.4-8.9 pieces/explants). However the medium with a halved content of NH_4NO_3 and KNO_3 provided the 1.8 -fold increment of number of microshoots suitable for rooting compared with control.

Therefore 2-times fold reduction of ammonium nitrogen provided increase of propagation coefficient in raspberry cultivars in 1.2-2.3 times and nuber of shoots suitable for rooting.

ПАСПОРТНАЯ БАЗА ДАННЫХ ГЕНОФОНДОВЫХ КОЛЕКЦИЙ НИКИТСКОГО БОТАНИЧЕСКОГО САДА

Е.Г. Ярославцева

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр
298648, Республика Крым, Ялта, e-mail: evgenia.yaroslavtseva@gmail.com

Паспортная база данных (ПБД) генофондовых коллекций Никитского ботанического сада (НБС) формировалась с 1996 г. Это основная база данных Информационной Системы (ИС), все другие: базы данных сохранения, признаковая, интродукционная, фенологическая, биохимическая, агроэкологическая, образцов переданных/полученных на условиях договоров, база изображений: фото, рисунков, графиков, диаграмм и пр., база накопительных экономических карт – дополняющие.

В основных полях ПБД содержится информация, по которой образец идентифицируют: таксономическая принадлежность, название, категория генофонда, происхождение, дата включения в коллекцию, для сортов - дата создания, имена селекционеров и код организации в которой образец выведен и(или) сохраняется, а также коды организаций где он дублируется. Согласно рекомендациям Национального Центра генетических ресурсов растений Украины, для формирования ПБД НБС при заполнении основных полей мы пользуемся дескрипторами, которые наиболее распространены при разработке ИС в Италии, Чехии, Германии и др. странах. Дескрипторы в 2001 г. были разработаны Международным институтом генетических ресурсов растений – Международное биоразнообразие (Рим) – Bioversity International (IPGRI) и унифицированы для различных культур. Также, используем дескрипторы необходимые для представления ~5000 паспортов ПБД НБС в Европейском каталоге генетических ресурсов растений – European Internet Search Catalogue (EURISCO). EURISCO формируется под эгидой Международной организации Bioversity International и Всемирной организации по продовольствию и сельскому хозяйству (FAO).

Другие поля ПБД разрабатывает исполнитель НБС, они служат более полному отражению информации, учитывают необходимость внесения дополнений и контроля дублирования образцов в пределах отделений.

На основе достигнутых договорённостей, «авторскую» информацию НБС: о родословных сортов и гибридов, выведенных за последние 15 лет, в другие организации мы не передаём, также не передаём информацию, которую можно отнести к «архивной» - её авторы уже не могут защитить свои права; ценные признаки всех образцов генофонда закодированы.

Паспортизация образцов в коллекциях генофонда сопровождается сбором и обработкой отчётной информации об итогах ежегодных инвентаризаций, анализом динамики изменений происходящих в составе коллекций и состоянии ценных образцов, итогах интродукционной работы.

PASPORT DATABASE OF NIKITSKY BOTANICAL GARDENS GENEFOND COLLECTIONS

E.G. Yaroslavtseva

Nikitsky Botanical Gardens – National Scientific Center

298648, Crimea, Yalta, e-mail: *evgenia.yaroslavtseva@gmail.com*

Pasport database (PD) of Nikitsky Botanical Gardens (NBG) genefond collection has been formed since 1996. It is the main database of the Information System (IS) and all other databases such as preserving, sign, introductive, phenological, biochemical, agroecological, passed/got samples, pictures database: photos, pictures, graphics, diagrams and others, base of enriching economical maps are additional.

In the main fields of PD there is information which makes possible its identification: taxonomic implementation, name, category of genefond, origin, date of its insertion into the collection, for cultivars – date of creation, names of the authors and codes of institutions where it was bred and (or) is kept and also codes of organizations where it is doubled. According to the recommendations of National Plant Gene Resources Centre of Ukraine for filling main fields in PD of NBG we use the descriptors that are the most widely used during the working out of IS in Italy, Czech, German and other countries. Descriptors have been worked out in 2001 by the International Plant Gene Resources Institute – Biodiversity International (Rome) (IPGRI) and unified for different cultures. Used descriptors are also needed for presentation nearly 5000 passports PD NBG in the European Internet Search Catalogue (EURISCO) which is formed under the influence of Biodiversity International and Food and Agriculture Organisation (FAO).

Other fields of PD are developed in NBG for more fully presentation of the information and they consider necessity of additions and control over the samples doubling inside the branches.

On the base of agreements “authors” information from NBG: about geneology of cultivars and hybrids bred during the last 15 years, shouldn't be passed to other organizations and also the information that could be considered “archived” as its authors can't protect their rights. Valuable features of all genefond samples are coded.

Pasportisation of the samples in genefond collection is followed with collection and processing of final information about every year inventarisations, analyses of changes dynamics in the collections and state of valuable samples and results of introductive work.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИЙ *IN VITRO* ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕХАНИЗМОВ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К ПАТОГЕНАМ

Л.Г. Яруллина^{1,2}, Р.И. Касимова¹, А.Р. Ахатова¹, Р.И. Ибрагимов², И.В. Максимов¹

¹Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН
450054, Россия, Уфа, проспект Октября, 71

²Башкирский государственный университет
450074, Россия, Уфа, ул. З. Валиди, 32, e-mail: yarullina@bk.ru

В естественных условиях растения испытывают на себе действие разнообразных неблагоприятных факторов биотической и абиотической природы, и их выживание зависит от способности защитить себя от всех этих воздействий. С точки зрения интересов человека, важным аспектом устойчивости растений является сохранение их продуктивности на фоне пагубного воздействия патогенов. Интенсивное применение химических средств защиты растений приводит к изменению физиологических свойств патогенов и появлению резистентных форм. В современных условиях актуальным становится использование экологически безопасных препаратов, индуцирующих устойчивость растений к патогенным организмам.

Удобной моделью для изучения механизмов формирования защитных реакций растений к фитопатогенам могут служить совместные культуры растительных клеток и тканей с возбудителями болезней. Такая культура у нас была получена с использованием каллусов пшеницы и спор возбудителя твердой головни *Tilletia caries* Tul. Были обнаружены различия в степени инфицируемости грибом каллусов восприимчивого и устойчивого образцов пшеницы, а также различных зон каллусной культуры. Введение в среду культивирования каллусов биопрепаратов (хитоолигосахаридов, салициловой и жасмоновой кислот) сопровождалось изменением их морфологии, продукции H₂O₂, активности оксидоредуктаз, экспрессии генов патогениндуцируемых белков и повышением устойчивости к *T. caries*. Обсуждаются возможные критерии оценки индуцированной устойчивости растений к патогенам.

Работа выполнялась при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках государственного задания (№ госрегистрации 01201456414).

USE OF TECHNOLOGY *IN VITRO* FOR STUDYING OF MECHANISMS OF PLANT RESISTANCE TO PATHOGENS

L.G. Yarullina^{1,2}, R.I. Kasimova¹, A.R. Akhatova¹, R.I. Ibragimov², I.V. Maksimov¹

¹Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Center, Russian Academy of Sciences

450054, Russia, Ufa, pr. Oktyabrya, 71

²Bashkirsky State University

450074, Russia, Ufa, St. Z.Validi, 32, e-mail: yarullina@bk.ru

Under natural conditions, plants suffer the adverse effects of various biotic and abiotic nature factors and their survival depends on the ability to protect themselves from all of these influences. From the point of view of human interests, an important aspect of plant resistance is to maintain productivity on the background of the harmful effects of pathogens. Intensive use of chemical plant protection products leads to a change in physiological properties of pathogens and the emergence of resistant forms. In modern conditions use of environmentally sound drugs that induce plant resistance to pathogens becomes actual.

Convenient model for studying the mechanisms of formation of protective reactions of plants to pathogens may serve co-cultures of plant cell and tissues from pathogens. We prepared such culture using wheat calli and spores of bunt pathogen *Tilletia caries* Tul. Differences were found in infection rate of calli of susceptible or resistant wheat cultivar, as well as in infected areas of calli. Introduction to the culture medium of callus biopreparations (chitooligosaccharides, salicylic and jasmonic acids) accompanied by changes in their morphology, production of H₂O₂, the activity of oxidoreductases, gene expression of pathogen-induced proteins and increase the resistance to *T. caries*. We discuss possibility of use in the breeding lines studied for a choice of resistant forms of plants.

This research was financial supported by the Russian Foundation for Basic Research and Russian Education and Science Ministry (state registration № 01201456414).

CONSERVING 1800–1950 CULTIVAR DIVERSITY IN *PAEONIA LACTIFLORA* AND ITS HYBRIDS AT THE UNIVERSITY OF MICHIGAN PEONY GARDEN

David C. Michener

University of Michigan Matthaei Botanical Gardens
1800 North Dixboro Road, Ann Arbor, MI, USA 48105,
e-mail: michener@umich.edu

Several thousand cultivars of *Paeonialactiflora* or hybrids with this species were developed and named by European and North American breeders before 1950 (unpublished from R. Jakubowski, ICRA registrar for *Paeonia*.) Only a small percent are known to exist as verified living plants, although many major peony collections existed in the early 20th Century. The Peony Garden at University of Michigan, begun in 1922, is being refocused as a living historic genotype collection and display garden.

The peony garden has room for nearly 400 plants, and current project phase ends June, 2022. Project goals underway are: 1) Verify the historic cultivars with an international committee of peony experts (over 90% complete); 2) establish a DNA-passportization protocol so identity is secure and permanent – and allow better research understanding (with N. Vlassava at Central Botanical Garden, National Academy of Sciences, Minsk, Belarus); 3) establish museum-concept methodology to assess “rarity” and “value” based on scientific and cultural values, not just historic or current market price (begun 2013); 4) identify (in literature) and find (living) key missing cultivars based on this methodology; 5) expand historic cultivar search with Chinese, Korean, and Japanese sources and peers for pre-1800 cultivars in particular as well as ones up to 1950; 6) determine by DNA or other genetic means the extent “historic” cultivars are re-named Asian-culture selections – this may have occurred multiple times; 7) develop network of sister institutions to conserve cultivar and species diversity across genus *Paeonia* world-wide.

Project critique is invited. Sister institutions are welcome to join in efforts to conserve historic cultivar diversity from all cultures, and in multiple locations, before key horticultural diversity is lost. More information at: <http://mbgna.umich.edu/peony>

СЕКЦИЯ 2.
SECTION 2.

КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ РАСТЕНИЙ:
ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ

CLONAL MICROPROPAGATION OF PLANTS:
THEORETICAL AND APPLIED ASPECTS

КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ ЛИМОННИКА КИТАЙСКОГО *IN VITRO*

А.Ш. Ахметова

Ботанический сад – институт Уфимского научного центра
Россия, Уфа, e-mail: *al_sham@mail.ru*

Эффективный метод для сохранения видов ценных растений посредством культуры ткани базируется на отработанной технологии размножения *in vitro*, принимая во внимание генетические особенности клонированного организма. Нами были изучены возможности для размножения особо редких декоративных растений. Проведена оптимизация основных стадий клонального микроразмножения лимонника китайского. Были получены адаптированные микропобеги.

Целью данного исследования была разработка методов массового быстрого клонального и семенного размножения *in vitro* лимонника китайского.

Разработанная схема стерилизации позволяет нам достигнуть получения 78,4% стерильных эксплантов. Для микроразмножения исследуемого вида были взяты черенки длиной 10-15 мм. На культивируемых листовых и стеблевых фрагментах на среде MS, дополненной 1,0 мг/л БАП и 0,3 мг/л НУК наблюдали рост каллуса без видимых признаков дифференцировки. Результатом органогенеза было формирование побегов на почках лимонника китайского.

Согласно нашим данным высокий морфогенетический потенциал был достигнут при использовании пазушных почек размером 5-10 мм, которые были изолированы из средней и верхушечной зон облиственной части побегов. Оптимальный срок введения эксплантов в культуру *in vitro* является начало плодоношения.

БАП в концентрации 2,0 мг/л, приводящий к наиболее высокой скорости регенерации побегов, по сравнению с БАП 1,0 мг/л, давал высокий коэффициент размножения.

Наши исследования были проведены для проверки пригодности латеральных почек молодых побегов в качестве эксплантов для быстрого массового клонального размножения.

Высокая регенерационная способность латеральных почек с коэффициентом мультипликации 6-10 штук на эксплант была получена в течение месяца.

CLONAL MICROPROPAGATION OF *SCHISANDRA CHINENSIS* (TURCZ) BAILL. *IN VITRO*

A.Sh. Akhmetova

Botanical Garden – Institute of Ufa Scientific Center
Russia, Ufa, e-mail: al_sham@mail.ru

The effective conservation method for valuable plant species through tissue culture is based on the proven technology of micropropagation *in vitro* taking into account the genetic features of cloned organism.

The possibilities of tissue culture for propagation of important rare small ornamental plants were studied. The optimization of the main stages of clonal micropropagation of *S. chinensis* was held. The adapted microshoots were obtained.

The objective of this study was to elaborate the methods for mass rapid seed and clonal propagation *in vitro* *S. chinensis*. The elaborated sterilization scheme let us reach 78.4% sterility explants.

For the investigated species micropropagation there were taken cuttings of 10-15 mm long. In leaves and stem fragments culture on the media supplemented with 1 mg/l BA and 0.3 mg/l NAA callus growth has been noticed. The formation of shoots on buds of *S. chinensis* was a result of organogenesis.

According to our data, high morphogenetic capacity was possessed by the axillary buds with the size 5-10 mm, which have been isolated from medial and apical zones of a leaf-bearing part of shoots. The optimal term of explants introduction in culture *in vitro* was the beginning fruiting.

BAP at 2 mg/l resulted in the highest rate of shoot regeneration, in comparison with BAP at 1 mg/l increased the coefficient of propagation.

Our research was carried out to examine the suitability of the lateral buds of young shoots as explants for mass rapid clonal propagation. High regeneration capacity of later buds with multiplication coefficient equal 6-10 per explant for a month of cultivation.

РАЗРАБОТКА БИОТЕХНОЛОГИИ МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ ПИХТЫ СИБИРСКОЙ (*ABIES SIBIRICA* LEDEB.) В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Е.В. Бажина

Федеральное государственное Учреждение науки Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН
660036, Россия, г. Красноярск-36. Академгородок, строение 50/28,
e-mail: genetics@ksc.krasn.ru

Современные биотехнологии массового размножения хвойных видов позволяют создать высокоэффективную систему получения устойчивых растений-регенерантов для плантационного лесовыращивания улучшенных генотипов растений, повысить качество посадочного материала и ускорить селекционный процесс (Шестибратов, 2008; Батыгина и др., 2010; Park et al., 2006; Tissue culture, 2011). Одним из наиболее перспективных методов культивирования хвойных растений является соматический эмбриогенез, который в сочетании с криоконсервацией широко применяется при плантационном лесовыращивании в США, Китае, Франции и Канаде (Klimaszewska, Cyr, 2002).

Цель настоящих исследований заключалась в разработке биотехнологии клонального микроразмножения пихты сибирской в культуре *in vitro* через соматический эмбриогенез.

Для индукции образования каллуса использовалась среда $\frac{1}{2}$ LV с добавлением 2,4-Д (2,0 мг/л) и 6-БАП, оптимальным для формирования каллусной массы пихты оказался семядольный зародыш, достигающий $\frac{2}{3}$ и более длины зародышевого канала (Бажина, 2012). Индукции образования каллуса при введении в культуру мегагаметофитов и изолированных зиготических зародышей пихты на ранних стадия развития (глобулярный эмбрио) не происходило. Исследования показали, что формирование морфогенного каллуса наблюдалось у 40% эксплантов на 14-18 сутки культивирования. Цитологический контроль показал, что на 12-14 сутки культивирования у экспланта происходили вытягивание и асинхронное деление клеток. Каллусная масса, полученная из сегментов проростков пихты сибирской, была очень рыхлой и представляла собой суспензию из отдельных клеточных скоплений. Дальнейшее культивирование проводилось на средах $\frac{1}{2}$ LV и SH с добавлением 2,4-Д и 6-БАП (1-2 мг/л), 2:0,5. Оптимальной для пролиферации оказалась среда SH, на которой полученные каллусы пролиферировали в течение 6-36 месяцев. Морфогенный каллус включал клетки разных типов: изодиаметрические (60,0±3,5 мкм в диаметре) и прозенхимные – овальные или сильно вытянутые (длина - 106,0 ± 5,8 мкм). В каллусе формировались структуры, имеющие сходство с зародышеподобными структурами (эмбриоидами). Эксперименты по культивированию эмбриогенных каллусов и получению соматических зародышей пихты сибирской продолжаются.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант № 11-04-00281.

DEVELOPMENT OF *ABIES SIBIRICA* LEDEB. MICROPROPAGATION BIOTECHNOLOGY IN CULTURE TISSUE

E.V. Bazhina

V.N.Sukachev Institute of Forest Siberian Branch of Russian Academy of Sciences

660036, Russia, Krasnoyarsk-36, Academgorodok, building 50/28,

e-mail: *genetics@ksc.krasn.ru*

Modern biotechnologies for clonal propagation of high-value conifer trees through somatic embryogenesis has the potential to rapidly capture the benefits of breeding and genetic engineering programs and to improve the uniformity and quality of the nursery stock, and accelerate selection (Shestibratov, 2008; Batygina et al., 2010; Park et al., 2006; Tissue culture, 2011). Somatic embryogenesis (SE) is the most prospective method for conifers species and in combination with cryoconservation is enabling the development of multy-varietal forestry, the use of tested tree varieties in forestry of USA, China, France and Canada (Klimaszewska, Cyr, 2002).

The objective of the work was to define methods to achieve SE in *Abies sibirica*.

For initiation of embryogenic cultures the basal medium ½LV with 2,4D (2 mg/l) and 6-BAP (1-2 mg/l) was used. For culture initiation, seeds with zygotic embryo occupied 2/3 and more of embryo cavity were optimal (Bazhina, 2012). Initiation of callus at megagametophytes and zygotic embryo at earlier stages of development is not observed. Megagametophytes were removed from ovules collected during third ten-days of July. The researches were shown that morphogenic calli are formed in 40% of explants. Embryogenic tissue began to grow from the micropylar end of the megagametophytes between 2 and 3 weeks after planting. Cytological study was shown cell elongation and asynchronies divisions after 12-14 day of cultured. Embryonal mass (EM) was very crumbly and consist from cell conglomerates. For EM proliferation the cultures obtained were subcultured onto ½LV and SH medium with 2.4-D and 6-BAP (2:0.5) and 10% sucrose. Optimal medium was SH where calli were proliferated during from 6 till 36 month. Morphogenic calli consist different types of cell: izodiametric (60.0±3.5 mkm in diameter) and prozenchhim: oval or strong elongative (106.0 ± 5.8 mkm, in length). Embryoid-like structures were formed in calli. The researches for calli cultured and SE initiation are continued.

The researches were supported with Russian Foundation of Basic Researches, project № 11-04-00281.

ОЦЕНКА УСПЕШНОСТИ МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ И АДАПТАЦИИ РАСТЕНИЙ-РЕГЕНЕРАНТОВ *GRATIOLA OFFICINALIS* L. В БОТАНИЧЕСКОМ САДУ УДМУРТСКОГО УНИВЕРСИТЕТА

О.Г. Баранова, Е.А. Колдомова

Удмуртский государственный университет

426034, Россия, г. Ижевск, ул. Университетская, 1, корпус 1, каб. 417,

e-mail: ob@uni.udm.ru

Методы биотехнологии все чаще стали использовать для сохранения редких и исчезающих видов растений и многие виды сегодня сохраняются в условиях *in vitro*. В настоящее время составлены и разработаны конкретные рекомендации, методики, технологии поэтапного культивирования редких растений в условиях *in vitro*, а так же *ex vitro*. Нами впервые для территории Удмуртской Республики в 2012-2013 гг. проведена оценка успешности клонального микроразмножения и последующей адаптации вида *Gratiola officinalis* L. Этот вид занесен в Красную книгу Удмуртской Республики (2012) с категорией 2. Редок он и в сопредельных регионах (Красные книги Республик Татарстана (2006), Башкортостана (2011) и Пермского края (2008)). Целью нашего исследования было выявление наиболее оптимальных условий для успешного размножения и сохранения *Gratiola officinalis* в условиях *in vitro* и *ex vitro*.

Исследование было проведено в два этапа. Сначала осуществлено собственно клональное микроразмножение аврана. Работу в асептических условиях, приготовление и стерилизацию питательных сред проводили по общепринятым методикам (Бутенко, 1999; Основы биотехнологии, 2002 и др.). В качестве экспланта использовали семена аврана, собранные на юге Удмуртии, а в последующем и проростки из них.

Проращивание семян осуществлялось при различных условиях: 25°C, свет; 25°C, темнота; стратификация (4 недели, 5°C), 25°C, свет; обработка препаратом «Циркон», 25°C, свет. Наилучшие результаты по всхожести семян были получены с использованием стратификации. На этапе подбора стерилизующих агентов использовали 70% C₂H₅OH; 35% C₂H₅OH; 3% H₂O₂; 15% H₂O₂, 0,2% раствор AgNO₃. Наиболее эффективным является применение в качестве стерилизующего агента 3% H₂O₂ и 75% C₂H₅OH.

Пролиферацию побегов индуцировали с использованием БАП при разных концентрациях 0,5 мг/л; 1,0 мг/л; 1,5 мг/л. Высокий коэффициент размножения, крепкие и неподверженные хлорозу побеги были получены в варианте с концентрацией БАП 0,5 мг/л. При укоренении побегов отмечали хорошо сформированную корневую систему с большим числом корней в случае использования обедненной среды MS.

На втором этапе адаптация растений осуществлена с использованием гидропонной установки и почво-смесей. При 20-ти суточной адаптации на гидропонике получены регенеранты с хорошо развитой вегетативной частью и мощной корневой системой. Для них характерна высокая жизнеспособность при высадке в условия открытого грунта, отмечено наступление всех фенологических фаз и высокая семенная продуктивность. Второй опыт с почво-смесью был менее успешен.

THE ESTIMATION OF SUCCESS OF MICROPROPAGATION REPRODUCTION AND ADAPTATION OF PLANTS-REGENERATES OF *GRATIOLA OFFICINALIS* L. IN THE BOTANICAL GARDEN OF THE UDMURT STATE UNIVERSITY

O.G. Baranova, E.A. Koldomova

Udmurt State University

426034, Izhevsk, Universitetskaya str., 1, e-mail: ob@uni.udm.ru

Biotechnology's methods are more often used for conservation of rare and vanishing plants. And many species remain today in the conditions of *in vitro*. Now the concrete recommendations, techniques and technologies for stage-by-stage cultivation of rare plants in the conditions of *in vitro* also *ex vitro* are made and developed. For the first time on Udmurt Republic's territory in 2012-2013 the estimation of success of micropropagation reproduction and following adaptation of *Gratiola officinalis* L. was made. This species is included in Red book of Udmurt Republic (2012) with second category. Also this species is rare for contiguous regions (the Red books of Tatarstan (2006), Bashkortostan (2011) and Perm region (2008)). The goal of our research is reveal of optimal conditions for successful reproduction and conservation of *Gratiola officinalis* at conditions of *in vitro* and *ex vitro*.

Research was conducted in two stages. The first stage was actually micropropagation reproduction of hedge-hyssop. Operations at aseptic conditions, preparation and sterilization of nutrient medium were performed according to common techniques (Butenko, 1999; Fundamentals of biotechnology, 2002 and etc). The hedge-hyssop's seeds and seedlings were used as explant. These seeds were collected on south of Udmurtia.

Seeds' germination was realized under different conditions: 25°C, light; 25°C, dark; stratification (4 weeks, 5°C), 25°C, light; treatment by "Zircon", 25°C, light. The best results of seed's germination were received with using a stratification. Also different sterilizing agents were chosen at present stage: 70% C₂H₅OH; 35% C₂H₅OH; 3% H₂O₂; 15% H₂O₂, 0,2% solution of AgNO₃. Most effective sterilizing substances are 3% H₂O₂ and 75% C₂H₅OH.

Proliferation of sprouts was realized with using benzylaminopurine at different concentrations 0.5 mg/l; 1.0 mg/l; 1.5 mg/l. High coefficient of reproduction was discovered when we used benzylaminopurine with concentration 0.5 mg/l. The sprouts that received at this option of experiment was strong and not prone to chlorosis. The root system with a large number of roots was received when the depleted Murashige and Skoog medium was used at sprouts' rooting.

The second stage was the adaptation of individuals with use hydroponic installation and soil mixtures. Regenerants that have well-formed vegetative part and strong root system were adapted during 20 days on hydroponic installation. They are characterized by high viability on landing in the open ground, going through all phenological phases and high seed production. The second experiment with using soil mixture was less successful.

ОСОБЕННОСТИ МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ РЯДА РЕДКИХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ УДМУРТИИ

О.Г. Баранова, Е.Н. Кузнецова, Е.Ю. Лукиных
ФГБОУ ВПО «Удмуртский государственный университет»
426034, Россия, г. Ижевск, ул. Университетская, 1 (корп. 1),
e-mail: ob@uni.udm.ru

Цель данной работы – поиск оптимальных условий проращивания семян ряда редких и исчезающих видов растений флоры Удмуртии и наблюдение за особенностями их развития в условиях *in vitro*. Объектом исследования были выбраны: *Hedysarum alpinum* L., *Hypericum elegans* Steph. ex. Wild., *Lychnis chalcedonica* L., занесенные в Красную книгу Удмуртской Республики (2012).

В ходе исследования данных объектов эксперимент проводился в два этапа: 1) выявление условий для прорастания семян в лабораторных нестерильных условиях и оценка всхожести; 2) введение в культуру *in vitro* особей из семян и наблюдение за их развитием. Эксперименты осуществлялись по общепринятым методикам проращивания семян и клонального микроразмножения (Бутенко, 1999; Международные правила анализа семян, 1984 и др.).

В ходе проведенных экспериментов было установлено, что семена изучаемых видов требуют различной предпосевной подготовки. Так, наилучшая всхожесть семян *Hedysarum alpinum* в лабораторных нестерильных условиях после скарификации составила $96,67\% \pm 0,33$, *Lychnis chalcedonica* и *Hypericum elegans* после стратификации - $85,00\% \pm 0,22$ и $33,67\% \pm 0,29$ соответственно. Для видов *Lychnis chalcedonica* и *Hypericum elegans* оптимальным стерилизующим агентом оказался 3%-ный раствор перекиси водорода, всхожесть составила $30,00\% \pm 0,45$ и $30,00\% \pm 0,24$ соответственно. Для семян *Hedysarum alpinum* оптимальной явилась ступенчатая стерилизация 70%-ным этиловым спиртом и 5%-ной «Белизной», всхожесть оставила $93,33\% \pm 0,33$. Период прорастания в условиях *in vitro* у *Hypericum elegans* и *Lychnis chalcedonica* составил 3-4 суток. Семена *Hedysarum alpinum* начали дружно прорастать через 2-3 суток. Первые настоящие листья у данного вида появились на 4-5 сутки, а у *Hypericum elegans* и *Lychnis chalcedonica* на 3-5 и 8-10 сутки после прорастания соответственно.

При микроразмножении этих растений завершающим этапом исследования явился подбор разных сред с использованием различных регуляторов роста. Было выявлено, что лучшие показатели по росту и развитию проростков *Hypericum elegans* наблюдали на средах Мурасиге и Скуга (MS) и Woody Plant Medium (WPM), содержащих 6-БАП, для *Lychnis chalcedonica* – на среде MS, дополненной 6-БАП, а для *Hedysarum alpinum* - безгормональной MS. Так же в ходе этих опытов, было установлено, что корнеообразовательные процессы у видов *Hedysarum alpinum* и *Lychnis chalcedonica* идут лучше на среде WPM, содержащей ИУК.

THE FEATURES OF MICROPROPAGATION REPRODUCTION OF PLANTS OF SOME RARE SPECIES OF UDMURTIA

O.G. Baranova, E.N. Kuznetsova, E.Yu. Lukinyh

Udmurt State University

426034, Russia, Izhevsk, Universitetskaya str., 1, e-mail: ob@uni.udm.ru

Biotechnology methods are even more often used as a solution of the problem of preservation of biological variety.

The main goal of present research is search of optimum conditions for seed's germination of some rare and vanishing plants species of udmurt flora and observation over features of their development in the conditions of in vitro. Some rare species were chosen as an object of research: *Hedysarum alpinum* L., *Hypericum elegans* Steph. ex. Wild., *Lychnis chalcedonica* L. These species included in Red book of the Udmurt Republic (2012).

The research was divided on two stages. First stage was revelation of conditions for seed germination in laboratory unsterile conditions and estimation of germinating power. Second stage was seed's introduction in culture of in vitro and observation over development of individuals. Experiments of both stages were realized by standard techniques of seed germination and micropropagation reproduction (International rules of the analysis of seeds, 1984; Butenko, 1999 and others).

During the made experiments it was established that seeds of studied species require various preseedling preparation. So, at laboratory unsterile conditions the best germination power of *Hedysarum alpinum* was 96.67%±0.33 after scarification, *Lychnis chalcedonica* and *Hypericum elegans* after stratification – 85.00%±0.22 and 33.67%±0.29 respectively. For *Lychnis chalcedonica* and *Hypericum elegans* optimum sterilizing agent is hydrogen peroxide (concentration 3%), germination was 30.00%±0.45 and 30.00%±0.24 respectively. For seeds of *Hedysarum alpinum* optimum sterilization was stepped sterilization with treatment of ethyl alcohol (70%) and “Belizna” (5%), germination power was 93.33%±0,33. Germination period in conditions of in vitro for *Hypericum elegans* and *Lychnis chalcedonica* was 3-4 days. United germination of *Hedysarum alpinum* was started in 2-3 days. First real leaves of this species started appearing for 4-5 days, and *Hypericum elegans*, *Lychnis chalcedonica* - for 3-5 and 8-10 days after starting germination respectively.

The final stage of research was selection of different nutrient medium with various hormones for micropropagation of these species. It was noted that the best results of growth and development of individuals of *Hypericum elegans* were observed on Murashige and Skoog medium (MS) and Woody Plant Medium (WPM) containing 6-benzylaminopurine, for *Lychnis chalcedonica* – only on MS nutrient medium including 6-benzylaminopurine, and for *Hedysarum alpinum* - on MS nutrient medium without any hormones.

ТЕХНОЛОГИИ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ ИЗ ЭЛЕМЕНТОВ ГЕНЕРАТИВНОГО ПОБЕГА НЕКОТОРЫХ ВИДОВ ASTERACEAE, CAMPANULACEAE И ORCHIDACEAE

О.Н. Воронова, Н.А. Жинкина, В.В. Назаров

ФГБУН Ботанический институт им. В.Л. Комарова, лаборатория

эмбриологии и репродуктивной биологии

Россия, г. Санкт-Петербург, e-mail: o_voronova@list.ru, nazh13@mail.ru,

vvn22222@mail.ru

Разрабатывается технология клонального микроразмножения на примере некоторых представителей семейств Asteraceae (*Helianthus tuberosus* L.), Campanulaceae (*Campanula bononiensis* L., *C. mirabilis* Albov) и Orchidaceae (*Orchis militaris* L., *Gymnadenia conopsea* (L.) R. Br., *Cynorkis seychellarum* Aver.). Для видов *Campanula* изолированные бутоны культивировали на стандартной среде Мурасиге и Скуга (МС) с добавлением БАП (2 мг/л) и НУК (1 мг/л). После распускания бутонов *in vitro*, ближе к концу их цветения, наблюдали образование каллуса в основании чашелистиков и верхней части завязи. Когда на каллусе началось формирование побегов и корешков, его перенесли на среду МС с добавлением 0,5 мг/л тидиазурина. Это вызвало резкое увеличение очагов гемморизогенеза (коэффициент размножения возрос с 10^3 до 10^5). Органогенный каллус, содержащий несколько сотен побегов, переносился на безгормональную среду МС до образования полноценных растений. Молодые растения высаживались в промытый и прокаленный песок и прикрывались прозрачными крышками до появления новых листьев. После образования розетки из 8-10 листьев растения пересаживались в смесь из песка и листовой земли. В открытый грунт высаживались экземпляры с розеткой не менее 3-4 см в диаметре. Для клонального микроразмножения орхидных использовались плаценты опыленных цветков, которые высаживались на стандартную среду Фаста с добавлением регуляторов роста (БАП – 2 мг/л и НУК – 1 мг/л). После дорастивания протокормов на безгормональной среде растения пересаживали вначале в песок, а затем - в грунт. У *H. tuberosus* на среде МС культивировались отдельные интактные цветки. Каллус образовался из тканей цветоножки, чашелистиков, основания столбика, тычиночных нитей и пыльников. Активное каллусообразование наблюдалось и на лепестках околоцветника (особенно у язычковых цветков). Спустя месяц культивирования у каллуса этого типа наблюдался активный гистогенез (формирование элементов проводящей системы). У *H. tuberosus* и *C. bononiensis* также был получен каллус другого типа - из незрелых сильно вакуолизированных микроспор. Каллус состоял из рыхлых конгломератов округлых крупных клеток с тонкой прозрачной плазмолеммой и крупными ядром и вакуолью. На периферических участках каллуса часто образовывались короткие цепочки из удлиненных клеток. Гистогенез у этого типа каллуса не наблюдался. Для изученных видов созданы коллекции различных типов каллуса *in vitro*.

THE TECHNOLOGY OF MICROCLONAL PROGAGATION FROM ELEMENTS OF GENERATIVE SHOOT IN SOME REPRESENTATIVES OF ASTERACEAE, CAMPANULACEAE AND ORCHIDACEAE

O.N. Voronova, N.A. Zhinkina, V.V. Nazarov

Department of embryology and reproductive biology, Komarov Botanical Institute of the Russian Academy of Sciences
Russia, St. Petersburg, e-mail: o_voronova@list.ru , nazh13@mail.ru,
vvv22222@mail.ru

The technology of microclonal propagation on the example of some representatives of Asteraceae (*Helianthus tuberosus* L.), Campanulaceae (*Campanula bononiensis* L., *C. mirabilis* Albov) and Orchidaceae (*Orchis militaris* L., *Gymnadenia conopsea* (L.) R. Br., *Cynorkis seychellarum* Aver.) was developed. For *Campanula* species the isolated buds were cultivated on the standard Murashige & Skoog medium (MS) with addition BAP (2 mg/l) and NAA (1 mg/l). After opening of buds *in vitro*, nearly to the end of their blossoming, we observed the development of callus on the sepals' basis and on the top of ovary. After the formation of shoots and roots has begun, callus was carried to the MS medium with the addition of 0.5 mg/l thidiazuron. It led to multiplication of the centers of gemmorrhizogenesis (propagation coefficient increases from 10^3 to 10^5). Organogenic callus with several hundred shoots was transferred to the MS medium without the growth regulator and it was cultivated on this medium until well-developed small plants were formed. Young plants were put in the sand (well washed and ignited) and covered with transparent covers until new leaves were formed. After formation of the rosette of 8-10 leaves the plants were transplanted in mix of sand and leafy ground. Plants with the rosette about 3-4 cm in the diameter were planted in the ground. For microclonal propagation of orchids the placentas of pollinated flowers were cultivated on standard Fast medium with the addition of the growth regulator (BAP – 2 mg/l and NAA – 1 mg/l). The protocorms were breeding on the medium without growth regulator. Young plants were transferred firstly in the sand, and later in the soil. In *H. tuberosus* the separate intact flowers were cultivated on the MS medium. Callus was formed from the tissues of pedicle, sepals and the base of style, stamen filaments and anthers. The active development of the callus was observed on the petals of perianth (especially on the ray flowers). After the month of cultivation in callus of this type the active histogenesis (formation of elements of transport tissue) was observed. In *H. tuberosus* and *C. bononiensis* other type of callus - from immature strongly vacuolated microspores was also received. This callus was consisted of friable conglomerates of roundish large cells with thin transparent plasmalemma, big nucleus and large vacuole. On the peripheral sites of the callus the short chains of the extended cells were often formed. The histogenesis in this type of callus wasn't observed. The collections of various callus types are created *in vitro* for the studied species.

РАЗМНОЖЕНИЕ РЕДКОГО ВИДА РЕСПУБЛИКИ БАШКОРТОСТАН *THERMOPSIS SCHISCHKINII* CZEFR. В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

А.А. Зарипова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Ботанический сад – институт Уфимского научного центра Российской академии наук, Россия, г. Уфа, e-mail: zaripova.al@mail.ru

Thermopsis schischkinii Czefr. относится к исчезающему виду Республики Башкортостан. Основными причинами сокращения численности их популяций являются: нерегламентированное заготовление лекарственного растительного сырья, использование растений для сбора в букеты и бесконтрольный выпас скота. Разрешение возникшей проблемы возможно с использованием метода клонального микроразмножения *in vitro*, позволяющего в относительно короткий период времени получить значительное количество посадочного материала.

Учитывая выше сказанное, целью настоящей работы является подбор оптимальных условий для клонального микроразмножения *Th. schischkinii*.

Определены условия стерилизации и проращивания семян *Th. schischkinii*. Для клонального микроразмножения исследуемого вида использовали фрагменты проростка.

Отмечено, что при культивировании фрагментов проростка формирование каллуса происходило на эпикотильях, гипокотильях, семядолях и корешках, находящихся в контакте со средой. Гипокотили проростков имели высокую способность к образованию каллуса.

Для индукции морфогенетических процессов в каллусных культурах была использована питательная среда Мурасиге и Скуга с добавлением цитокининов 6-БАП, кинетина и ауксинов ИУК, НУК и 2,4-Д в различных комбинациях.

В результате проведенных экспериментов было отмечено, что морфогенетическая активность эксплантов изучаемого растения на всех рассмотренных средах была достаточно высокой. Оптимальными для регенерации адвентивных побегов оказались среды, включающие 2,0 мг/л 6-БАП, 1,0 мг/л кинетина и 0,8 мг/л ИУК. Среднее число образовавшихся регенерантов колебалось от 12,6 до 16,9 побегов на эксплант.

Полученные результаты являются основой для разработки методов клонального микроразмножения *Th. schischkinii*.

***IN VITRO* PROPAGATION OF RARE PLANT IN THE REPUBLIC OF BASHKORTOSTAN *THERMOPSIS SCHISCHKINII* CZEFR.**

A.A. Zaripova

The Botanical Garden-Institute Ufa Research Center, Russian Academy of Sciences,

450080, Russia, Bashkortostan, Ufa, e-mail:zaripova.al@mail.ru

Thermopsis schischkinii Czefr. belongs to the disappearing species in Bashkortostan. The main reasons of their populations decrease are non-limited stocking up of the medicinal plant raw, the use of plants for buckets and uncontrolled cattle pasture. The solution of the problem can be achieved by use of micropropagation *in vitro* method that in a short period of time allows obtaining the significant amount of planting material.

Taking all above mentioned into consideration predetermines the aim of the present research that is the choice of optimal conditions for *Th. schischkinii* clonal micropropagation.

The conditions for *Th. schischkinii* seed sterilization and germination were determined. For the investigated specie micropropagation there were taken seedling segments.

In the case of cultivation of seedling segments, calluses were produced from epicotyls, hypocotyls, cotyledons and rootlet which were in contact with the medium. Hypocotyls of seedlings exhibited a high capacity for forming callus.

For morphogenesis induction in callus cultures the Murashige & Skoog medium with addition of IAA, NAA or 2,4-D and 6-BAP or kinetin in different combinations was used.

As the results of conducted experiments it was marked, that morphogenetic activity of studied plant explants was sufficiently higher on all considered media. Optimal media for regeneration of adventitious shoots contained 2.0 mg/l 6-BAP, 1.0 mg/l kinetin and 0.8 mg/l IAA. Average number of the formed regenerants varied from 12.6 to 16.9 shoots per explant.

The results represent a basis for devising clonal micropropagation techniques *Th. schischkinii*.

КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ОХРАНЯЕМЫХ КАЛЬЦЕФИЛЬНЫХ РАСТЕНИЙ САРАТОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Т.А. Крицкая, Е.А. Блюднева, А.С. Кашин

Учебно-научный центр «Ботанический сад» Саратовского государственного университета имени Н.Г. Чернышевского
410010, Россия, г. Саратов, ул. Ак. Навашина, 1, Ботанический сад

Сохранение биологического разнообразия, как известно, является одной из важнейших задач ботанических садов. Современные методы биотехнологии, в частности, клональное микроразмножение растений, потенциально позволяют восстанавливать численность редких и исчезающих видов растений, имеющих трудности с семенным и вегетативным воспроизводством.

В качестве объектов исследования использовали *Anthemis trotzkiana* Claus., *Centaurea kasakorum* Ijtin, *C. ruthenica* Lam., *Globularia punctata* Lapeyr., *Hyssopus cretaceus* Dubjan., *Scrophularia sareptana* Kleop. ex Ivanina, *Silene cretacea* Fisch. ex Spreng., *S. hellmannii* Claus., являющиеся кальцефилами и обладающие узкой экологической амплитудой.

Целью данной работы являлась оптимизация питательной среды для микроразмножения растений вышеперечисленных видов.

Установлено, что питательная среда Мурасиге и Скуга (МС) (1962) не подходит для культивирования исследуемых растений и приводит к оводнению эксплантов, хлорозу, а в ряде случаев – к полной гибели культуры. Замена минерального состава МС на Woody Plant Medium увеличивала морфогенетический потенциал культуры и устраняла часть проблем.

При подборе регуляторов роста показано, что автономное использование БАП, кинетина, зеатина или 2ip для активации развития пазушных меристем малоэффективно. Высокие концентрации БАП (более 0,5 мг/л) вызывали оводнение тканей всех исследованных объектов. Дополнение среды, содержащей БАП (0,1-0,5 мг/л), кинетин (0,5-1,0 мг/л) или 0,1-0,5 мг/л БАП + 0,5-1,0 мг/л кинетин, гибберелловой кислотой (0,5-1,5 мг/л), 3-индолилуксусной кислотой (0,5-1,5 мг/л) или сочетанием ГК (0,5-1,5 мг/л) + ИУК (0,5-1,5 мг/л) оказывало различное влияние на культуру. Например, сочетания БАП+ИУК и кинетин+ИУК вызывали каллусогенез, БАП+ГК и БАП+ГК+ИУК способствовали чрезмерной элонгации, и, как следствие, хрупкости материала.

Подобранное соотношение регуляторов роста, обозначенное условно «SCS», позволяет получать достаточное количество микропобегов без ущерба качеству регенерантов.

CLONAL MICROPROPAGATION OF SOME OF THE PROTECTED CALCIPHILIOUS PLANTS IN SARATOV REGION

T.A. Kritckaia, E.A. Blyudneva, A.S. Kashin

Botanical Garden of Saratov State University n.a. N.G. Chernyshevsky

Russia, Saratov, e-mail: *kriczkaya.tatyana@mail.ru*, *kashinas2@yandex.ru*

Biological diversity conservation is known to be one of the most important Botanical Gardens objectives. Modern biotechnology methods, plants clonal micropropagation in particular, can potentially allow restoring rare and endangered number of species which have difficulties with seed and vegetative reproduction.

Anthemis trotzkiana Claus., *Centaurea kasakorum* Iljin, *C. ruthenica* Lam., *Globularia punctata* Lapeyr., *Hyssopus cretaceus* Dubjan., *Scrophularia sareptana* Kleop. ex Ivanina, *Silene cretacea* Fisch. ex Spreng., *S. hellmannii* Claus., which are calciphilous plants with narrow ecological amplitude, were studied.

The work objective is to optimize media solution for the above-mentioned plants micropropagation.

It is discovered that Murashige and Skoog (MS) media (1962) is not suitable for the plants under study cultivation and results in explants irrigation, chlorosis, and in some cases – culture destruction. When the MS mineral composition was replaced by the Woody Plant Medium, the culture's morphogenetic capacity increased and some problem were corrected.

While choosing growth regulators we have understood that benzylaminopurine, kinetin, zeatin, or 2ip was inefficient for activation of adventative meristems development. High benzylaminopurine concentration (over 0.5 mg/l⁻¹) resulted in tissue irrigation in all the studied samples. Medium containing 0.1-0.5 mg/l⁻¹ benzylaminopurine (BAP), 0.5-1.0 mg/l⁻¹ kinetin or 0.1-0.5 mg/l⁻¹ BAP + 0.5-1.0 mg/l⁻¹ kinetin was supplemented by gibberellic acid (0.5-1.5 mg/l⁻¹), 3-indoleacetic acid (0.5-1.5 mg/l⁻¹) or a combination of gibberellic acid (0.5-1.5 mg/l⁻¹) + indoleacetic acid (0.5-1.5 mg/l⁻¹) had a various effect on the culture. For instance, a combination of BAP + indoleacetic acid and kinetin + indoleacetic acid induced callusesgenesis; BAP + gibberellic acid and BAP + gibberellic acid + indoleacetic acid improved excessive elongation and, consequently, the samples fragility.

The growth regulators balance discovered, which we conditionally labeled as "SCS", allows obtaining enough shoots without affecting plantlets quality.

ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* СОРТОВ ДРЕВОВИДНЫХ ПИОНОВ

Е.В. Курицкая, Е.В. Болтенков, Э.В. Вржосек, Л.Н. Миронова

Ботанический сад-институт ДВО РАН

Россия, г. Владивосток, e-mail: boltenkov@rambler.ru

Древовидные пионы известны как декоративные и лекарственные растения, которые широко культивируют в Китае и Японии около двух тысяч лет. Корнесобственные древовидные пионы размножают вегетативным способом путём деления растений на части, а также прививкой на корневище древовидных или травянистых пионов. Эти способы размножения позволяют получать ограниченное количество особей. Для оптимизации размножения древовидных пионов нами исследованы особенности введения в культуру *in vitro* вегетативных почек и получения растений.

В работе использовали сорта гибридного вида *Paeonia suffruticosa* Andrews (Hoki, Kao, Renkaku, Shimadaijin, Shimanishiki, Shimane Tamasudare, Shimano-Fuji, Taiyo, Yagumo), сорта *P. delavayi* Delavay ex Franch. (High Noon, Jinkaku) и группы гибридов Itoh (Julia Rose, Bastzella, Garden Treasure). Вегетативные почки брали в сентябре–октябре и стерилизовали по разработанной нами методике. Почки помещали на агаризованную питательную среду Мурасиге и Скуга с половинным содержанием макросолей, 6-бензиламинопурином (БАП), аскорбиновой (100 мг/л) и ферулловой кислотами (0,5 мг/л).

Снижению выделения тканями полифенолов в питательную среду способствовало культивирование почек на среде с аскорбиновой и ферулловой кислотой, а также перемещение почек внутри культуральных сосудов. На первом этапе в течение нескольких месяцев в присутствии 2 мг/л БАП из почек развивались укороченные побеги. Одновременно в основании побегов формировалась плотная дифференцированная ткань, из которой впоследствии развивались адвентивные почки. Через четыре пассажа концентрацию БАП уменьшали до 1 мг/л. При субкультивировании отделяли сформированные адвентивные побеги. Для укоренения побеги предварительно помещали на среду с 2 мг/л индолилмасляной кислоты, а через месяц переносили на безгормональную среду. Через три месяца в основании побегов наблюдали развитие корней.

Таким образом, нами установлены особенности введения в культуру *in vitro* вегетативных почек сортов древовидных пионов и исследовано влияние условий культивирования на морфогенез и регенерацию растений.

MICROPROPAGATION OF TREE PEONY

E.V. Kuritskaya, E.V. Boltenkov, E.V. Wrzhosek, L.N. Mironova

Botanical Garden-Institute FEB RAS,

Russia, Vladovostok, e-mail: *boltenkov@rambler.ru*

The tree peonys are well known as decorative and curative plants that were widely cultivated in China and Japan for about two thousands years. Scion-rooted peonys are propagated using vegetative method by dividing plants on parts as well as by root grafting. These methods of propagating allow us to get limited number of plants. Contrary we studied details of *in vitro* introduction of vegetative buds and propagating plants of the tree peony.

We used sorts of *Paeonia* × *suffruticosa* Andrews (Hoki, Kao, Renkaku, Shimadaijin, Shimanishiki, Shimane Tamasudare, Shimano-Fuji, Taiyo, Yagumo), and forms originated from *P. delavayi* Delavay ex Franch. (High Noon, Jinkaku) and groups of its hybrids herbaceous peonys Itoh (Julia Rose, Bastzella, Garden Treasure). Vegetative buds were taken in September and October and were sterilized by original method. Intact buds were placed on Murashige and Skoog medium that was contained on a half proportion of macrosalts and 6-benzylaminopurine (BAP).

To decrease polyphenol discharge into medium we added ascorbic acid and ferulic acid and also relocated buds inside the culture vessels. In the first phase during several months shoots were germinating from buds due to 2 mg/l of BAP. In the same time compact differentiate tissue was formed in the base of shoots and afterwards adventive buds expanded from this tissue. The concentration of BAP was reduced to 1 mg/l after four passages. Formed adventive buds were separated in the course of subculturing. Shoots were transferred to the medium with 2 mg/l of indole butiric acid for rootage and after a month they were transferred on a hormone-free medium. We observed roots development in the base of the shoots after several months. At this rate there were settled features of introduction the vegetative buds of tree peony *in vitro* and researched the impact of cultivation terms on morphogenesis and plant regeneration.

КУЛЬТУРА ИЗОЛИРОВАННЫХ ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ АЛЫЧИ (*PRUNUS CERASIFERA* ENRH.) И СЛИВЫ (*PRUNUS DOMESTICA* L.)

Н.П. Лесникова-Седошенко, И.В. Митрофанова

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр
298648, Республика Крым, г. Ялта, пгт Никита, e-mail: in_vitro@ukr.net

Одним из перспективных направлений биотехнологических исследований, проводимых в лаборатории биохимии, биотехнологии и вирусологии растений Никитского ботанического сада, является создание и сохранение генетического разнообразия растений. Как известно, получение новых гибридных форм косточковых плодовых культур часто лимитируется недоразвитием зародышей. Получить растения из таких зародышей позволяет применение биотехнологических методов. Цель настоящей работы состояла в выявлении особенностей регенерации растений из зародышей разных генотипов для получения новых селекционных форм алычи и сливы. В опытах использовали зародыши алычи и сливы от скрещивания сортов алычи Вилора х Кизилташская Ранняя и сортов сливы Венгерка Юбилейная х Клеймен (скрещивание проведено селекционером, к.с.-х.н. В.М. Гориной) и сортов алычи Кизилташская Ранняя, Крымская Смуглянка, Оленька, Сестричка, Субхи Ранняя от свободного опыления. Выявлены условия культивирования зародышей и изучена зависимость развития проростков и микропобегов от биотических и абиотических факторов. Определены пути реализации морфогенетического потенциала органов и тканей алычи и сливы в условиях *in vitro*. Лучшее прораствание и развитие зародышей длиной 0,8-2,0 см наблюдали на модифицированных питательных средах Monnier (1973) (алыча) и Murashige, Skoog (1962) (слива), дополненных 0,29-2,89 мкМ ГК₃, 0,93-2,32 мкМ кинетина, 0,027-0,54 мкМ НУК и 34,22-68,44 мкМ L-глутамин. Начало развития проростков отмечено у всех культур спустя 3-4 месяца культивирования в условиях отсутствия освещения при пониженных положительных температурах (4±1°C). У недоразвитых зародышей алычи длиной до 0,3 см («Кизилташская Ранняя», «Субхи Ранняя») и в комбинациях скрещивания отмечалось образование единичных неполноценных проростков. Поэтому наряду с эмбриокультурой для повышения коэффициента размножения применяли способ микрочеренкования. Индукция адвентивного побегообразования происходила спустя 3-5 недель культивирования на модифицированной питательной среде Gamborg, Eveleigh (1968).

Таким образом, представленные результаты показывают возможность получения новых гибридных форм алычи и сливы из недоразвитых зародышей.

ISOLATED ORGANS AND TISSUE CULTURE OF CHERRY PLUM (*PRUNUS CERASIFERA* EHRH.) AND PLUM (*PRUNUS DOMESTICA* L.)

N.P. Lesnikova-Sedoshenko, I.V. Mitrofanova

Nikitsky Botanical Gardens – National Scientific Center
298648, Crimea, Yalta, Nikita; e-mail: *in_vitro@ukr.net*

The obtaining and conservation of genetic diversity of plants is one of perspective direction in biotechnological researches done in Laboratory of Plant Biotechnology and Virology in Nikitsky Botanical Gardens. As it is known the obtaining of new hybrids forms of stone-fruits is often limited with incomplete development of embryos. Using the biotechnology methods allows obtaining plants from such embryos. The aim of this work was to determine the peculiarities of plant regeneration from embryos of different genotypes for obtaining new selection forms of cherry-plum and plum. In the experiments the embryos of cherry-plum and plum from crossing of cherry-plum varieties Vilora x Kiziltashskaya Rannyaya and plum varieties Vengerka Yubileynaya x Kleimen, obtained by plant-breeder V.M. Gorina and cherry-plum varieties Kiziltashskaya Rannyaya, Krymskaya Smuglyanka, Olenka, Sestrichka, Subkchy Rannyaya from free pollination were used. The conditions of embryos cultivation have been determined; the dependence of hypocotyls and microshoots development from biotic and abiotic factors has been studied. The ways of realization for morphogenetic potential of cherry-plum and plum, organs and tissues *in vitro* have been determined. The best germination and development of embryos with length 0.8-2.0 cm was observed on modified Monnier (1973) (cherry-plum) and Murashige, Skoog (1962) (plum) media supplemented with 0.23-2.83 μM GA₃, 0.93-2.32 μM kinetin, 0.027-0.54 μM NAA and 34.22-68.44 μM L-glutamine. The beginning of plantlets development was marked after 3-4 months of cultivation in darkness and low positive temperatures ($4\pm 1^\circ\text{C}$) for all cultures. In undeveloped embryos of cherry-plum with length up to 0.3 cm (Kiziltashskaya Rannyaya, Subkchy Rannyaya) and crossing combinations the formation of single defective plantlets was marked. That's why for increasing of the propagation coefficient the method of microcutting was used together with embryoculture. Induction of adventitious shoot formation was marked after 3-5 weeks on modified Gamborg, Eveleigh (1968) medium.

Thus, the given results have shown the possibility to obtain the new hybrids forms of cherry-plum and plum from undeveloped embryos.

ОСОБЕННОСТИ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ СОРТА *EVERGREEN* В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*.

М. Лозинский, Н. Чоркинэ

Ботанический сад (Институт) АНМ

2002, Молдова, Кишинев, ул. Пэдурий 18, email: diacnm@mail.ru

Ежевика спонтанно растёт на территории Азии, Европы, Северной Америки и Южной Америки. Ежевику употребляют в качестве пищи и в лечебных целях. Ежевика, часто называемая "ягодой" представляет собой разнородную группу видов и гибридов рода *Rubus* являющихся представителями семейства розоцветных, подсемейства *Rosoideae*. *Rubus lacinatus* и его представитель *Evergreen* - Европейский сорт интродуцент из Северной Америки, его побеги могут достигать до 3 метров в длину. Листья перистые, цветки белые с оттенками розового, плоды чёрные с сизым налётом, округлой формы и с особенным ароматом. Этот кустарник можно выращивать как декоративное растение и в качестве живой изгороди, так как он является вечнозеленым кустарником, который очень быстро разрастается. Для сорта *Evergreen* наиболее эффективной средой для клонального микроразмножения является базовая среда по МС с добавлением БАП (0,5 мг/л). На этой среде в течение 50-55 суток, можно получить от 19 до 20 адвентивных побегов, длиной 7 см.

Перед введением в культуру *in vitro* был подготовлен и простерилизован материал отобраный с растения-донора. Это весьма важная процедура на стадии инокулирования культуры *in vitro*. После инокуляции апикальных и латеральных меристем наблюдались процессы морфогенеза и органогенеза. Питательной средой для инокуляции была полная среда по MS. Интервал между пассажами составлял 4 недели. За это время растительный материал значительно увеличивался в размерах (в 10 раз). На питательной среде МС дополненной ИУК (0,1 мг/л) через 25-30 суток был отмечен более интенсивный прирост побега. За этот период его длина составила 5 см. В отличие от других сортов, у сорта *Evergreen* очень хорошо развиваются корни. Эффективность в инициации морфогенеза показал БАП в различных концентрациях – 0,1; 0,3; 0,5; 0,7 мг/л. Укоренение индуцировали добавлением в питательную среду ИМК, и через 10-12 суток культивирования у эксплантов в пробирках отмечали формирование корней. Для сорта *Evergreen* более эффективной средой оказалась базовая питательная среда МС дополненная БАП (0,5 мг/л).

В результате исследований было установлено, что культура ткани весьма успешна для выращивания ежевики сорта *Evergreen*, что позволяет получать совершенно здоровый и высокоэффективный для последующего размножения посадочный материал.

Со временем этот метод превратился в современную технику быстрого размножения различных видов, в том числе и описанного выше сорта.

THE CHARACTERISTICS OF THE *EVERGREEN* CULTIVAR MULTIPLICATION THROUGH MICRO-CLONING

Mariana Lozinschii, Nina Circhina

Botanical Garden of the Academy of Science of Moldova

2002, Moldova, Kishinev, Padurij Street, 18, email: diaconm@mail.ru

Blackberries are originally from Asia, Europe, North America and South America. Blackberries have been used in Europe for over 2000 years in pharmaceutical and food industries. Blackberries, often called "berries", are a diverse group of species and hybrids of *Rubus* genus. They are members of the *Rosaceae* family, subfamily *Rosoideae*. *Rubus lacinatus* with its *Evergreen* representative is a European cultivar from North America; its branches can reach up to 3 m in length. With leaves pinnately veined, with white flowers with shades of pink, having shiny round black fruit, it has a particular flavor. This shrub can be grown for ornamental purposes having a decorative appearance due to its vigorous evergreen leaves.

The most effective multiplication medium for the cultivar *Evergreen* is the MS supplemented with IBA (0.5 mg/l). On this medium during a period of 50-55 days 19 to 20 adventitious shoots with the length of 7 cm have been obtained. Before placing to *in vitro* culture, an important - step sterilization of the plant material taken from the donor plants was done. That is an important procedure on the initial stage of inoculation to *in vitro* culture. Optimal period for all types of explants treating with diacid was 7 minutes. The inoculation of different types of meristems led to morphogenesis and organogenesis processes. For inoculation MS culture medium has been used.

The period between passages was approximately one month, when the plant material size increased considerably (10 times).

The following culture medium has positive influence on the development of *Evergreen* cultivar. It was noted that on the medium with IBA (0.1 mg/l) a broader development has been observed after 25 to 30 days. At this time the shoot length was 5 cm. In comparison with other cultivars of shrubs, the cv. *Evergreen* has better developed roots. BAP was used in different concentrations 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 played an important role in the initiation of morphogenesis. Rooting was stimulated by IBA adding to the nutrient medium. Formation of roots was visible after 10-12 days of cultivation. The most effective multiplication medium for cv. *Evergreen* was MS supplemented by BAP (0.5 mg/l).

As the result of the investigations it has been established that the tissue culture for the *Evergreen* cultivar was successfully used, being improved with time, thus allow obtaining perfectly healthy plants with high efficiency for further propagation seedlings. Nowadays, this method has turned into a modern technique for rapid multiplication of different species, including the cultivars, described above.

УКОРЕНЕНИЕ *EX VITRO* И АДАПТАЦИЯ ПРИ МАССОВОМ КЛОНАЛЬНОМ МИКРОРАЗМНОЖЕНИИ ДЕКОРАТИВНЫХ И ПЛОДОВО-ЯГОДНЫХ КУЛЬТУР

В.Г. Лебедев^{1,2}, А.Б. Азарова^{1,2}, А.А. Батманова³, К.А. Шестибратов^{1,2}

¹Филиал ФГБУН Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Россия, г.Пушино, e-mail: vglebedev@mail.ru

²ООО «НПП «Микроклон»

Россия, г.Пушино

³Оренбургский государственный аграрный университет

Россия, г.Оренбург

Клональное микроразмножение растений является очень эффективным способом получения посадочного материала, так как позволяет быстро и в большом количестве размножить растения независимо от времени года. Однако массовому внедрению этого метода препятствует относительно высокая стоимость получаемых растений. Критичными этапами клонального микроразмножения являются укоренение, на который может приходиться до половины всех затрат, и адаптация, в ходе которой высок риск гибели растений. Разработка технологий укоренения *ex vitro*, то есть одновременного образования корней и адаптации в нестерильных условиях, позволит снизить себестоимость, сократить время производства посадочного материала и повысить его качество.

Мы проводили исследования по укоренению *ex vitro* ряда культур - алычи, сирени, боярышника, флокса, клематиса, земляники и малины. В различных экспериментах оценивалось влияние таких факторов, как тип ауксина (ИУК, ИМК или НУК) и его концентрация (от 5 до 50 мг/л), продолжительность обработки ауксинами (1 или 4 ч), тип субстрата (смесь торф:перлит или минеральная вата «Grodan»), адаптация в условиях искусственного тумана или без него, подкормка различными комбинациями питательных элементов, генотип растения. Для многих видов удалось добиться 100% укоренения и адаптации. В контрольных вариантах (без добавления ауксинов) было отмечено укоренение не только видов, способных укореняться *in vitro* на безгормональной среде (земляника, малина), но и видов, неспособных к этому (сирень, боярышник), однако применение ауксинов способствовало росту корней второго порядка и увеличению высоты растений. В среднем частота укоренения в условиях *ex vitro* по сравнению с *in vitro* возросла у клематиса с 60 до 85%, у флокса – с 75 до 90%, у малины – с 85 до 95%. Использование укоренения *ex vitro* также способствовало повышению производительности труда в теплице.

По итогам экспериментов для ряда декоративных и плодово-ягодных культур были разработаны технологии укоренения *ex vitro*, которые в настоящее время используются для производства десятков тысяч единиц посадочного материала с закрытой корневой системой.

EX VITRO ROOTING AND ACCLIMATIZATION TECHNOLOGIES FOR LARGE-SCALE CLONAL MICROPROPAGATION OF SOME HORTICULTURAL CROPS

V.G. Lebedev^{1,2}, A.B. Azarova^{1,2}, A.A. Batmanova³, K.A. Schestibratov^{1,2}

¹Branch of Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry
Russia, Pushchino, e-mail: vglebedev@mail.ru

²ООО «NPP «Microklon»

Russia, Pushchino

³Orenburg State Agrarian University

Russia, Orenburg

Clonal micropropagation is a very efficient method of plant propagation. The main advantage of this method is the rapid multiplication of plants regardless of the season. However, high cost of micropropagated plants limits its application. One of the most critical and expensive stages of *in vitro* culture are rooting and acclimatization. Development of *ex vitro* rooting technologies will simplify tissue culture protocols, reduce the production cost and improve quality of plants.

Ex vitro rooting of cherry-plum, lilac, hawthorn, phlox, clematis, strawberry and raspberry were investigated. We evaluated the effect of various factors such as the auxin type (IAA, IBA or NAA) and auxin concentration (5-50 mg/l), the duration of auxin treatment (1 or 4 hours), the substrate type (peat/perlite mixture or «Grodan» mineral wool), artificial fog, mineral fertilizers and plant genotype. For many species 100% rooting and acclimatization were obtained. We observed *ex vitro* rhizogenesis without auxin treatment, but auxins stimulated formation of secondary roots and growth of plants. The rooting frequency of clematis increased from 60 to 85%, phlox - from 75 to 90 %, raspberry - from 85 to 95 % under *in vitro* and *ex vitro* conditions, respectively. *Ex vitro* rooting increased labour productivity in the greenhouse.

As a result of our experiments *ex vitro* rooting technologies for a number of horticultural crops were developed. Currently these technologies are used for the production of tens of thousands of planting material.

РАЗМНОЖЕНИЕ *IN VITRO* *ROSA POLYANTHA*

С.М. Ленивко

Брестский государственный университет имени А.С. Пушкина,
224016, Республика Беларусь, г. Брест, бульвар Космонавтов, 21,
e-mail: lenivko@brsu.brest.by

Полиантовые розы (*R. polyantha*) были получены в 70-х гг. XIX века в результате скрещивания многоцветковой розы (*R. multiflora*) с непрерывноцветущей китайской (*R. chinensis*). Характеризуются обильным, постоянным цветением до поздней осени. Большинство сортов полиантовых роз отличаются морозостойкостью, что позволяет выращивать их в климатических условиях средней полосы. Несмотря на то, что в настоящее время полиантовые розы несколько утратили свое значение, уступив более эффективным и выносливым сортам розы флорибунда (*R. floribunda*), их продолжают применять в ландшафтных композициях, а также для горшечной культуры в комнатах и зимних садах (Былов и др., 1988). Размножают полиантовые розы укоренением зеленых черенков, а вопрос возможности их клонального микроразмножения в культуре *in vitro* остается мало изученным.

Цель настоящей работы – разработка наиболее эффективных условий для длительного культивирования в условиях *in vitro* полиантовой молочно-белой розы сорта Morsdag.

Исследования проводили на протяжении трех лет. Для микроразмножения использовали питательную среду MS (Murashige, Skoog, 1962), содержащую 6 г/л агар-агара и имеющую рН = 5,6. В качестве гормональных индукторов побегообразования применяли 6-бензиламинопури́н (БАП), гиббереллиновую кислоту (ГК₃) и индолил-3-уксусную кислоту (ИУК). Культивирование микрочеренков проводили в камере для роста растений Binder при температуре 22°C, освещенности 3000 лк и 16 часовом фотопериоде.

В процессе проведенных исследований установлено, что наиболее благоприятным для индукции побегообразования у полиантовой розы сорта Morsdag является следующее сочетание в питательной среде MS регуляторов роста: БАП – 2,0 мг/л, ГК₃ – 1,0 мг/л и ИУК – 0,1 мг/л. На микрочеренке длиной около 2,5 см с оставленными тремя верхними листочками через шесть недель культивирования на этой питательной среде формировалось в среднем до 12 микропобегов. Норма расхода питательной среды составляла 25 мл на сосуд объемом 90 мл, в котором размещали 5 эксплантов для регенерации микропобегов. Из сформировавшихся регенерантов для дальнейшего культивирования отбирали только микропобеги необходимой длины.

Таким образом, нами подобран оптимальный гормональный баланс питательной среды для размножения в условиях *in vitro* полиантовой молочно-белой розы сорта Morsdag.

REPRODUCTION IN VITRO *ROSA POLYANTHA*

S.M. Lenivko

Brest State University named after A.S. Pushkin,
224016, Republic of Belarus, Brest, Boulevard of Cosmonauts, 21,
e-mail: lenivko@brsu.brest.by

Polyanthous roses (*R. polyantha*) were obtained in the 70-ies of the XIX century in the result of crossing multiflora roses (*R. multiflora*) with Chinese rose (*R. chinensis*). It characterized by constant flowering until late autumn. Most varieties of polyanthous roses are resistant to frost, which allows growing them in the climatic conditions of the middle zone. Although currently polyanthous roses has lost some of its importance, giving way to a more effective and resilient varieties of floribunda roses (*R. floribunda*), they continue to apply in landscape compositions, as well as for pot plants in the rooms and the winter gardens (Bylov et al., 1988). Multiply of polyanthous roses by rooting of green cuttings, and the possibility of their clonal micropropagation *in vitro* stay little-studied.

The aim of this work is to develop the most efficient conditions for a long cultivation *in vitro* polyanthous milky-white rose cv. Morsdag.

The study was carried out for three years. MS culture medium (Murashige, Skoog, 1962), with 6 g/l agar-agar and pH of 5.6 was used for micropropagation. For hormonal induction of adventitious shoots used 6-benzylaminopurine (BA), gibberellic acid (GA₃) and indolyl-3-acetic acid (IAA). The microshoots were cultured in plant growth chamber. Binder at temperature 22°C, light condition 3000 Lux and 16 hours photoperiod.

As the result of the investigation process it was determined that the most favorable for the induction of shooting in polyanthous rose cv. Morsdag are the following hormones combinations in MS medium: BA – 2.0 mg/l, GA₃ – 1.0 mg/l and IAA – 0.1 mg/L. On the microshoots with length of about 2.5 cm after six weeks of culture on this medium in average up to 12 adventitious shoots were formed. The consumption rate of culture medium was 25 ml per container volume 90 ml, in which 5 explants for regeneration of adventitious shoots were placed. For further culture only adventitious shoots of required length were taken from the formed regenerants.

Thus, we have chosen the optimal hormonal balance culture medium for propagation *in vitro* polyanthous milky-white rose cv. Morsdag.

ОСОБЕННОСТИ МОРФОГЕНЕЗА *TANACETUM AKINFIEWII* IN VITRO

В.К. Мартемьянова, З.М. Алиева

Дагестанский государственный университет

Россия, Махачкала, e-mail: taminamariamka@mail.ru, zalieva@mail.ru

В связи с ежегодным увеличением числа видов, находящихся под угрозой исчезновения, использование методов биотехнологии с применением клонального микроразмножения становится актуальным. К таким растениям в Дагестане относится пижма Акинфиева (*Tanacetum akinfiewii* (Alexeenko) Tzvel). Это редкое, эндемичное растение, включенное в Красные книги России и Дагестана в статусе, находящегося под угрозой исчезновения с первой категорией редкости. Узколокальный эндемик Дагестана, популяция малочисленна, насчитывает около десяти экземпляров. Задача состояла в подборе условий стерилизации и управления морфогенезом узловых эксплантов зеленых побегов. Стерилизацию зеленых побегов проводили в несколько этапов. Предварительно побеги замачивали в мыльной воде с добавлением 2-3 капель твин-80 в течение 10-15 минут, затем промывали водопроводной водой. Стерилизовали в течение 10 минут раствором гипохлорита натрия (1:1 с водой), после промывали в дистиллированной воде в течение 15, 10 и 5 минут. Культивировали узловыe экспланты на среде МС, содержащей ИМК и БАП (0.5:2.5 мг/л). При этом 80% из них сохранили жизнеспособность. У всех жизнеспособных эксплантов (100%) наблюдали высокую активность ростовых процес сов, у 50% с закладкой 2-3-х боковых почек. Далее, полученные стерильные побеги субкультивировали на среду МС с ИМК и БАП (0.5:2.5 мг/л) с интервалом культивирования 35-40 суток. При субкультивировании эксплантов (I – VI пасажи) отмечали снижение их жизнеспособности (от 80 до 50 %). Не смотря на это, наблюдали рост, увеличение числа побегов (от 50 до 70-90 %) с закладкой боковых почек при сохранении зеленой окраски, характерной интактному растению. Следует отметить, что при субкультивировании, как и при первичном культивировании у эксплантов не индуцировался каллусогенез и образование корней.

Таким образом, удалось оптимизировать методику стерилизации и выявить морфогенетический потенциал узловых эксплантов пижмы Акинфиева при субкультивировании на среде МС с определенным гормональным составом.

THE FEATURES OF MORPHOGENESIS IN *TANACETUM AKINFIEWII* IN VITRO

V.K. Martemyanova, Z.M. Aliyeva

Dagestan State University

Russia, Makhachkala, e-mail: *maminamariamka@mail.ru, zalieva@mail.ru*

Use of biotechnology methods with application of clonal micropropagation becomes actual in connection with the annual increase of the number of species under threat of extinction. Akinfiyev's tansy (*Tanacetum akinfiyevii* (Alexeenko) Tzvel) belongs to such plants in Dagestan. It is rare endemic plant included in the Red Book of Russia and Dagestan in the status, being under the threat of extinction, with the first category of rarity. Narrow local endemic of Dagestan has about ten specimens and its population is small. The task was in selection of sterilization conditions and control of nodal explants morphogenesis of green shoots. Sterilization of green shoots was carried out in several stages. Previously the shoots are soaked in soapy water with addition 2-3 drops of Tween - 80 during 15 minutes, then washed with tap water. They were sterilized for 10 minutes with a solution of sodium hydrochloride (1:1 with water), then washed in distilled water for 15, 10 and 5 minutes. Nodal explants were cultivated on MS medium with IBA and BAP content (0.5:2.5 mg/l⁻¹). Thus 80% of them preserved the viability. High activity of growth with 50% of the tab's 2-3 lateral buds were observed at all viable explants (100%). Next, the obtained sterile shoots were subcultured into MS medium with BAP and IBA (0.5:2.5 mg/l⁻¹) with an interval of 35-40 days of cultivation. During the passages in explants (I - VI passages) decrease of their viability (80 to 50%) was observed. Nevertheless, growth and increasing in the number of green colour shoots (50 to 70-90 %) with a tab of lateral buds were observed.

It should be noticed that during the passaging and primary cultivation from explants induction of callusogenesis and roots' formation were not observed.

Thus, it was possible to optimize the sterilization technique and to identify the morphogenetic potential of nodal explants in Akinfiyev's tansy during passages on MS medium with a specific hormonal composition.

РАЗРАБОТКА СПОСОБОВ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ РАСТЕНИЙ

С.А. Муратова, Р.В. Папихин, А.В. Будаговский

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Мичуринский государственный аграрный университет,
393760, Россия, г. Мичуринск, ул. Интернациональная 101,
e-mail: smuratova@yandex.ru

В ходе наших исследований проведена оптимизация протоколов клонального микроразмножения широкого набора плодовых, ягодных, овощных и декоративных культур. Изучено влияние биохимических и биофизических факторов на эффективность размножения и укоренения растений *in vitro*. В результате исследований показано, что наиболее универсальным является минеральный состав питательных сред MS (Murashige, Skoog, 1962) и QL (Quorin, Leroivre, 1977), подходящий для размножения большинства садовых культур. В качестве полезных модификаций может быть увеличение содержания хелата железа в 1,5-2 раза при культивировании малины и ежемалиновых гибридов, замена хлорида кальция в среде Мурасиге и Скуга на нитрат, использование ряда органических добавок, в частности гидролизата казеина в количестве 250-500 мг/л при культивировании лимонника китайского, аскорбиновой или лимонной кислоты в составе питательной среды для клематиса. При культивировании ряда форм положительный эффект получен при изменении источника углеводного питания и его концентрации. С целью снижения затрат при культивировании ряда культур можно снизить концентрацию углевода в питательной среде для размножения до 15-20 г/л. При этом пониженные концентрации фруктозы и глюкозы существенно эффективней сахарозы.

Изучено влияние различных регуляторов роста в среде на эффективность размножения и укоренения растений. Предложены составы сред, обеспечивающие оптимальное развитие изучаемых культур на каждом этапе культивирования. Эффективность укоренения микрочеренков и адаптации микрорастений к условиям *in vivo* составила 75-100% в зависимости от вида и сорта растения.

Существенно повысить эффективность применяемых протоколов клонального микроразмножения растений можно за счет использования биофизических факторов воздействия, таких как низкоинтенсивное когерентное излучение (НКИ) и ультразвук (УЗ). Подбор оптимальных режимов и способов лазерного и ультразвукового излучения позволил в 1,5-2 раза повысить эффективность трудноукореняемых культур, ускорить процесс ризогенеза и улучшить качество корневой системы у всех включенных в опыты форм. На всех этапах культивирования положительный эффект дало применение низкоинтенсивного когерентного излучения.

THE DEVELOPMENT OF METHODS TO IMPROVE PLANT MICROPROPAGATION

S.A. Muratova, R.V. Papikhin, A.B. Budagovsky

Michurinsk State Agrarian University Michurinsk

393760, Russia, Internationalnaya Str., 101, e-mail: smuratova@yandex.ru

In the course of our research we have optimized the protocols of micropropagation of a wide range of fruits, berries, vegetables and ornamental plants. The influence of biochemical and biophysical factors on the efficiency of multiplication and rooting of *in vitro* plants has been studied. As a result it has been proved that the most applicable is the mineral composition of the nutrient media MS (Murashige, Skoog, 1962) and QL (Quorin, Lepoivre, 1977) suitable for breeding most horticultural crops. As useful modifications the following steps could be suggested to increase the content of iron chelate 1.5-2 times when growing raspberry and raspberry-blackberry hybrids, to replace calcium chloride in a medium of Murashige-Skoog on nitrate, to use certain organic additives, in particular casein hydrolyzate in concentration of 250-500 mg/l when cultured *Schizandra chinensis*, ascorbic or citric acid during cultivation clematis. In several forms positive effect was obtained due to the change in source of carbohydrate nutrition and its concentration. In order to reduce costs for cultivation some cultures carbohydrate concentration in the multiplication medium should be reduced to 15-20 g/l. Which is glucose or fructose effective then reduced concentration sucrose. The influence of different plant growth regulators on the effectiveness of proliferation of microshoots and rizogenesis was stated. The compositions of media ensuring an optimal development of the studied crops at each stage of cultivation have been offered. The effectiveness of rooting of microcutting and adaptation to *in vivo* conditions was 75-100% and mostly depending on plant species and cultivar.

To improve of existing protocols of clonal propagation techniques is possible with the help of physical factors, influencing plant tissues including laser generated low intensive coherent irradiation (LICR) and ultrasound (US).

The choice of optimum regimes and ways of irradiation LICR and ultrasound has enabled 1.5-2 times the efficiency of rooting of plant microcuttings having the lower ability to root formation *in vitro* and helped to increase the rhizogenesis process of all the forms studied. At all cultivation stages the positive effect was obtained when low-intensity coherent radiation was used.

СПОНТАННЫЙ РИЗОГЕНЕЗ НА ЭТАПЕ СОБСТВЕННО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ У НЕКОТОРЫХ СОРТОВ САДОВОЙ ГРУППЫ МИНИАТЮРНЫХ РОЗ

Т.И. Филиппчук, И.В. Митрофанова

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр
298648, Россия, Республика Крым, г. Ялта, пгт. Никита,
e-mail: *in_vitro@ukr.net*

Завершающим этапом клонального микроразмножения является укоренение полученных *in vitro* микропобегов. Главную роль в индукции формирования и развития корней играют вещества ауксинового типа действия: НУК, ИУК и ИМК (Калинин, 1992). Наряду с этим у микропобегов на этапе собственно микроразмножения наблюдается явление спонтанного ризогенеза. Подобный тип корнеобразования достаточно редкое явление. Некоторые авторы объясняют этот факт накоплением эндогенных ауксинов в растительных тканях при их длительном культивировании, вследствие чего у микропобегов развиваются корни даже в условиях, не способствующих ризогенезу (Бутенко, 1964, Кунах, 2005).

Целью наших исследований являлось выявление особенностей ризогенеза у эксплантов некоторых сортов садовой группы миниатюрных роз. Объектами исследования служили перспективные сорта садовой группы миниатюрных роз из коллекции НБС-ННЦ: сорт селекции НБС-ННЦ – Мальчик-с-Пальчик. Мин.; сорта иностранной селекции – Бэби Бантинг. Мин. *Ellen x Peon.*, Цвёргкёниг. Мин. *World's Fair x Peon*, Рулети, Бигуди, Мандарин, Мистер Блюбёрд.

В наших экспериментах микропобеги длиной 0,5-1,0 см помещали на поверхность агаризованной модифицированной питательной среды МС. Было отмечено явление спонтанного ризогенеза у микропобегов таких сортов как Мальчик-с-Пальчик, Бэби Бантинг, Цвёргкёниг, Мандарин и Бигуди на этапе собственно микроразмножения. Вместе с тем у эксплантов сорта Мистер Блюбёрд наблюдали спонтанное образование корней на этапе введения в культуру *in vitro* в ноябре, но через 20 суток отмечали угнетение развития эксплантов и их последующую гибель. Микропобеги, которые длительное время (более 4 месяцев) не субкультивировали на свежую питательную среду формировали корни из образовавшегося в их базальной части каллуса светло-зеленого цвета. При спонтанном ризогенезе микропобегов сорта Рулети на основном корне формировались корни второго порядка, однако они были немногочисленны и очень тонкие. Наряду с этим был отмечен спонтанный ризогенез в весенние месяцы, при длительном культивировании эксплантов (более 8-9 субкультивирований).

Таким образом, нам удалось выявить период культивирования и особенности образования спонтанных корней в условиях *in vitro*, что значительно повышало частоту корнеобразования полученных микропобегов роз исследуемых сортов.

SPONTANEOUS RHIZOGENESIS *IN VITRO* OF SOME CULTIVARS IN GARDEN GROUP OF MINIATURE ROSES

T.I. Pilipchuk, I.V. Mitrofanova

Nikitsky Botanical Gardens - National Scientific Center

298648, Russia, Crimea, Yalta, Nikita, e-mail: *in_vitro@ukr.net*

The final stage of clonal micropropagation is obtained *in vitro* rooting microshoots. It is known that the main role during induction of roots formation and development play different auxins, such as: NAA, IAA and IBA (Kalinin, 1992). Therefore a number of plants characterized the spontaneous roots formation *in vitro*. This type of roots formation is quite rare. Some authors explain this fact by the accumulation of endogenous auxin in plant tissues during its long-term cultivation, due to microshoots have been developed roots even in conditions not conducive to root formation (Butenko, 1964, 1999; Kunakh, 2005).

The aim of our study was to determine the characteristics of root formation in explants of some cultivars of miniature roses garden group. Objects of study were miniature roses from the collection of NBG-NSC: cultivar of NBG-NSC breeding – Malchik-s-Palchik. *Min.*; cvs. of foreign breeding – Baby Bunting. *Min. Ellen x Peon.*, Zwerkönig. *Min. World`s Fair x Peon*, Mandarin, Bigudi, Mr. Bluebird. *Min.*, Rouletii. *Min.*

In our experiments microshoots 0.5-1.0 cm length have been placed on solidified modified MS culture medium. During micropropagation the phenomenon of spontaneous rhizogenesis of microshoots in cvs. Malchik-s-Palchik, Baby Bunting, Zwerkönig, Mandarin and Bigudi has been carried out. However, the explants of cv. Mr. Bluebird spontaneous formation of roots have been observed on the stage of *in vitro* culture introduction in November, but after 20 days the inhibition of explants development and their subsequent died have been marked. Microshoots, which for a long time (more than 4 months) not subcultured to fresh medium, have been formed roots on the base of the light green colored callus. During spontaneous rhizogenesis microshoots of cv. Rouletii on the main roots formed secondary roots, but this roots were few number and very thin. Spontaneous rhizogenesis has been determined at the spring months, when explants cultured long time (more than 8-9 subcultures).

Thus, we were able to identify the period of culture and features of spontaneous roots formed *in vitro*, that were significantly increased the frequency of rooting of propagated microshoots in studied rose's cultivar.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭМБРИОКУЛЬТУРЫ В СЕЛЕКЦИИ КОСТОЧКОВЫХ ПОРОД

М.А. Пынтя

НИИ Садоводства и Пищевых Технологий

Республика Молдова, MD19 Кишинэу, ул. Костюжень 14,

e-mail: *mariapintea@yandex.ru*

Метод культуры недоразвитых зародышей *in vitro* применяется при получении рано и сверхраносозревающих генотипов у видов *Prunus L.* Наши исследования выявили, что в условиях Республики Молдовы развитие зародышей у рано созревающих генотипов косточковых культур (персик, вишня, черешня, абрикос, слива) приостанавливается на разных стадиях эмбриогенеза.

В экспериментах были использованы зародыши сортов персика (Фаворита Мореттини, Июльский), абрикоса (Букурия, Июньский), черешни (Донецкая ранняя, Бригантина), вишни (Ранняя-2, 6-106-4) на стадиях 1/4, 1/2, и 2/3 полного развития. Были испытаны питательные среды MS, Lee Fossard, Monnier. Концентрации сахарозы варьировали от 20 до 50 г/л, агар - 5-8 г/л, казеин - 50-400 мг/л, БАП и кинетин - 0,0-5,0 мг/л, ИУК и ИМК - 0,0-5,0 мг/л, активированный уголь - 0,0-1,5 г/л; pH - 5,6-5,9. Сосуды с эксплантами держались 2 суток при 24°C и среднем освещении, потом стратифицировались при 2°C в течение 3-5 месяцев в зависимости от культуры. После развития семядолей для образования корней и побегов сосуды перемещали в культуральные камеры при режиме 22-24°C и 16 часовом фотопериоде. Перенос растений в почвенный субстрат, их адаптацию и образование полноценных сеянцев осуществляли в теплице. Отметим, что 1/4 зародышей у всех видов *Prunus* не давали полноценных результатов без дополнительных пересадок. Зародыши всех видов размером 1/2 и 2/3 от нормально развитых давали разные результаты (37,7-84,4% нормально развитых растений в зависимости от года). Все три питательные среды индуцировали развитие проростков персика при: 0,1% кинетине ИМК, 100 мг/л казеине, сахарозе - 40г/л и агаре - 6 г/л. Разница результатов между сортами абрикоса менее существенна: получено 72,5-90% нормально развитых растений. При этом варьирование концентрации сахарозы и активированного угля не имело влияние. Не отмечено существенных различий между гибридами сливы, получено 40,8-65,7% растений. Растения вишни и черешни лучше развивались на среде MS с БАП или кинетином (1 мг/л), активированным углем (0,5-1 г/л) с пересадками.

Таким образом, получение жизнеспособных растений из недоразвитых зародышей у видов *Prunus* возможно начиная с 1/2 или 2/3 степени их развития после оптимизации питательных сред.

В результате селекционного изучения более 1000 гибридов выявлено 17 перспективных абрикосов, 5 персиков и 3 черешни. На ГСИ передано 6 рано созревающих высокопродуктивных элит с хорошим качеством плодов.

USE OF EMBRYOCULTURE FOR BREEDING OF SOME *PRUNUS L* SPECIES

M. A. Pinte

Research Institute for Horticulture and Alimentary Technologies,
Republic Moldova, MD19 Kishinau, Costiujeni Str. 14.,

e-mail: mariapinte@yandex.ru

In vitro culture of embryo method is opportune especially for breeding of early and extra-early ripening genotypes of *Prunus L* species. Our investigations revealed that the level of the development of embryos of stone early ripening genotypes (peach, sweet and sour cherries, apricot, plum) in the conditions of the Republic Moldova is different being incomplete.

Embryos of peach (cv. Favorita Morettini, Iulskii), apricot (cv. Bucuria, Iunskii), plum (hybrids 3-27-128, 3-4-35), sweet cherry (cv. Donetskaya Rannyaia, Brigantina), sour cherry (cv. Rannyaia-2, 6-106-4) of the development stages: 1/4, 1/2 and 2/3 seed fulfilment were used in the experiments. Following nutrient media were experimented: MS, Lee Fossard, and Monnier. Sucrose concentrations varied from 20 to 50 g/l, agar - 5-8 g/l, casein - 50-400 mg/l, BA and kinetin – 0,0-5,0 mg/l, IAA and IBA – 0,0-0,5 mg/l, activated charcoal - 0,0-1,5 g/l; pH - 5,6-5,9. Test-tubes were kept 2 days at 24°C and moderate light, and then stratified at 2°C for 3-5 months depending on species. After cotyledon post-developing, root system and sprout morphogenesis test-tubes were placed into cultural chamber at 22-24°C under a 16 h photoperiod. Transplanting into soil substrate, adaptation and further development of vigorous seedlings was performed in greenhouse. Embryos with 1/4 of seed volume did not show good results for all *Prunus* varieties without supplementary transplanting. Embryos of all species, developed to 1/2 and 2/3 of seed volume, showed a certain percentage (37.7-81.4%) of normally developed plants depending of the year. All the 3 selected media showed good results for both peach cultivars when added kinetin and IBA (0.1 mg/l), casein (100 mg/l) with sucrose (40 g/l) and agar (6 g/l). Differences between apricot cultivars are less substantial – 75.5 to 92.0% plants with an optimal root system and sprouts morphogenesis. Variation of sucrose and activated charcoal is less important. There were no evident morphogenetical differences revealed for both plum hybrids: percentage of normally developed plants varies between 40.8 to 65.7%. Sweet and sour cherry plantlets showed a better development on MS medium with BA or kinetin (1 mg/l), activated charcoal (0,5-1 g/l) with transplantations.

So the possibility of getting vital plants out of immature embryos of *Prunus* species is revealed only provided beginning of rudimentary embryo structures morphogenesis (1/2 and 2/3 seed volume) with specific optimisation of nutrient media.

After field selection there are evidenced 17 perspectives apricot, 5 peach and 3 sweet cherry genotypes. 6 elites with early period of ripening, good production and good organoleptical fruit qualities there are transmitted on State Test Comision and limited practical implementation as well.

ЭФФЕКТИВНОЕ КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ РАСТЕНИЙ ТОМАТОВ СОРТА «МАНИМЕЙКЕР»

И.В. Танасиенко, А.И. Емец, Я.Б. Блюм

ГУ «Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины»

Украина, Киев-123, ул. Осиповського 2а, e-mail: iratanasienko@gmail.com

Культура *in vitro* и технология клонального микроразмножения – удобные инструменты не только для клонирования редких, исчезающих видов растений, но и для получения качественного безвирусного материала для сельского хозяйства. Томаты – один из важнейших видов семейства Пасленовых (Rick, 1980), признаны весьма ценным и питательным продуктом и в настоящее время являются одной из основных овощных культур во всем мире (Atherton & Rudich, 1986; Chaudhry et al., 2010). Поэтому разработка эффективного протокола клонального микроразмножения томатов, в частности коммерческого тепличного сорта «Манимейкер», который характеризуется обильными урожаями и высокими вкусовыми показателями плодов, перспективная задача для обеспечения больших объемов качественного посадочного материала. Для этого два типа эксплантов, гипокотили и семядольные листья 7-дневных проростков, культивировали на среде МС (Murashige & Skoog, 1962), дополненной разными комбинациями регуляторов роста: зеатин/ИУК – 2/0,1 мг/л (среда МСТ1) и БАП/ИУК – 2/0,2 мг/л (среда МСТ2). Каллус формировался на обоих типах эксплантов на средах МСТ1 и МСТ2. Однако, каллус полученный на среде МСТ2, характеризовался более низким показателем регенерационного потенциала по сравнению с каллусом, полученным на среде МСТ1. Так, эффективность регенерации гипокотилей и семядольных листьев на среде МСТ1 составляла 94,5% и 50%, в то время как на среде МСТ2 – 35,2% и 33,4%, соответственно. При перенесении растительных тканей на среду МСТ1 уровень регенерационного потенциала каллуса возрастал. Также следует отметить, что спустя 15 дней после начала культивирования на среде МСТ2 наблюдали интенсивное развитие корней из каллусной ткани. В то время как на среде МСТ1 подобного эффекта не фиксировали. На поверхности каждого отдельно взятого каллуса, культивируемого на среде МСТ1, формировалось 4-6 почек, на среде же МСТ2 – всего 3-4 почки на эксплант. Все почки в дальнейшем формировали зеленные полноценные стебли, которые укореняли на безгормональной среде. Таким образом, нами установлено, что для эффективной регенерации и клонального микроразмножения растений данного сорта томатов наиболее подходящими в качестве эксплантов являются гипокотили проростков и соотношение 2 мг/л зеатина и 0,1 мг/л ИУК в питательной среде.

EFFECTIVE MICROPROPAGATION OF TOMATO VARIETY “MONEYMAKER”

I.V. Tanasienko, A.I. Yemets, Ya.B. Blume

Institute of Food Biotechnology and Genomics, National Academy of Sciences of Ukraine

Ukraine, Kyiv-123, Osipovskogo Str. 2a, e-mail: *iratanasienko@gmail.com*

A multiple cloning technique is successful tool not only for the production of rare endangered plants, but also for the production of disease-free, high quality growth material for commercial needs. Tomato is one of the most important Solanaceae crop grown throughout the world (Rick, 1980). It is recognized as a highly valuable and nutritious food and nowadays tomato is one of the major vegetable throughout the world (Chaudhry et al., 2010). It is grown in tropical, sub-tropical and temperate areas (Atherton & Rudich, 1986). The efficient protocol for micropropagation of commercial, greenhouse tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) variety “Moneymaker”, that a famous for the high yield, which fruit have both uniformity and excellent color, was developed. Two types of tomato explants, cotyledons and hypocotyls, were placed to the MS medium (Murashige & Skoog, 1962) supplemented with two different phytohormone compositions: zeatin/IAA – 2/0.1 mg/l (MST1 medium) and BAP/IAA – 2/0.2 mg/l (MST2 medium). Callus formations were observed for both types of explants on both media. Nevertheless, in spite of high cell proliferation the regeneration potential of these plant tissues on MST2 medium was lower in comparison to MST1 medium. However, the increase of the regeneration efficiency of both types of explants in case of explants transfer to MST1 medium was revealed. Thus, regeneration efficiency of hypocotyls and cotyledons on MST1 medium was 94.5% and 50%, while on MST2 medium – only 35.2% and 33.4% respectively. It is has to be noticed that after 15 days of explants cultivation on MST2 medium an intense root formation occurred. In the same time callus obtained on MST1 medium was rootless. On each separate callus obtained on the medium containing zeatin from 4 to 6 buds were formed in a month after beginning of the cultivation, while plant tissue on MST2 medium formed only 3-4 buds per explant. All buds subsequently developed into green shoots that were rooted on the hormone-free medium.

It was shown that the combination of 2 mg/l zeatin / 0.1 mg/l IAA and hypocotyls as explants are the prerequisites for the most efficient tomato micropropagation.

БИОТЕХНОЛОГИЯ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ КАННЫ САДОВОЙ (*CANNA* × *HYBRIDA HORT.*)

А.Ш. Тевфик, И.В. Митрофонова, Т.Н. Кузьмина

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр

298648, Россия, Республика Крым, г. Ялта, пгт. Никита,

e-mail: *in_vitro@ukr.net*

В течение последних лет применение биотехнологических методов при получении посадочного материала декоративных растений имеет огромный приоритет перед традиционными способами размножения. Культура *in vitro* в комплексе с другими методами обеспечивает оздоровление растений, позволяет ускорить создание новых форм и депонировать наиболее ценные сорта, поддерживая их в виде медленнорастущих коллекций *in vitro*.

Одной из декоративных культур представляющей большой интерес при оформлении садов и парков является канна садовая (*Canna* × *hybrida hort.*). Эта культура высокодекоративна благодаря ярким соцветиям и крупным широкоовальным листьям, имеющим очередное расположение.

Цель исследования – выявить морфогенетический потенциал органов и тканей и разработать биотехнологические приёмы микроразмножения перспективных сортов канны садовой.

Установлено, что для успешного прорастания изолированных зародышей канны садовой сортов Дар Востока и Ливадия необходима предварительная стратификация эксплантов в течение 60 суток при 5°C, без освещения. Затем пробирки с зародышами, культивируемые на среде Монье, помещают в стандартные условия, где на 35-е сут развиваются полноценные проростки сорта Дар Востока и Ливадия от свободного опыления. Количество проросших зародышей сорта Ливадия было не высоким. Гистологический анализ показал, что в процессе стратификации происходит более активное разрастание тканей семядоли. Это в некоторых случаях приводит к угнетению развития зародыша и к его гибели. В базальной части зародыша отметили формирование соматического зародыша.

Было установлено, что для массового размножения сортов Суевия, Дар Востока и Ливадия на этапе собственно микроразмножения эксплантов (вегетативных почек) их культивируют на питательной среде с ТДЗ. Для индукции ризогенеза необходимо введение в питательную среду ауксинов: 1,5 мг/л ИУК или 1,5 мг/л НУК.

Таким образом, нами разработаны биотехнологические приемы получения регенерантов канны садовой сортов Суевия, Дар Востока, Ливадия, проростков сортов Дар Востока, Ливадия и изучены особенности их развития на различных этапах клонального микроразмножения *in vitro*.

BIOTEHNOLOGY OF CANNA (*CANNA* × *HYBRIDA HORT.*) CLONAL MICROPROPAGATION

A.Sh. Tevfik, I.V. Mitrofanova, T.N. Kuzmina

Nikitsky Botanical Gardens - National Scientific Center

298648, Russia, Crimea, Yalta, Nikita, e-mail: *in_vitro@ukr.net*

Recently, using of biotechnological methods of ornamental plantlets obtaining has great priority in comparison with traditional methods of propagation. *In vitro* culture in a complex with other methods of plants cleaning up helps to create of new forms and conservation of the most valuable cultivars in form of long-term collections *in vitro*.

One of ornamental plants of great interest in the design of gardens and parks is *Canna* (*Canna* × *hybrida hort.*). This plant is high-ornamental because it has bright inflorescences and large chunky-oval leaves with alternate leaf arrangement.

The aim of our investigation was to reveal morphogenetic capacity of tissues and organs and to work out the biotechnological methods of micropropagation for perspective *canna* cultivars.

It was established that for successful germination of isolated embryos of cvs. Dar Vostoka and Livadia preliminary explants stratification during 60 days at 5°C in the dark is needed. The test tubes with embryos on the Monier culture medium were incubated at standart conditions and after 35 days of culture seedlings of cvs. Dar Vostoka and Livadia from free pollination developed. The number of seedling of cv. Livadia was not high. Gistological analysis demonstrated that during stratification process the cotyledon tissues have active overgrowth. In certain cases induced inhibition of embryo development and its death. The somatic embryo in basal part of zygotic embryo appeared.

It has been identified that for mass shoot formation of cvs. Suevia, Dar Vostoka and Livadia explants (vegetative buds) at the stage of propagation should be cultured with use of TDZ. For induction of roots formation the addition of 1.5 mg/ IAA and 1.5 mg/ NAA is needed.

Thus, from our results, we worked up the methods of obtaining regenerants of *canna* cvs. Suevia, Dar Vostoka, Livadia and seedlings of cvs. Dar Vostoka and Livadia. The peculiarities of their development on the different stages of clonal micropropagation *in vitro* have been studied.

МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ СОРТОВ СЛИВЫ В МОЛДОВЕ

А.М. Чернец

Научно-Практический Институт Садоводства, Виноградарства и Пищевых Технологий

Республика Молдова, Кишинев, e-mail: cernetsa@rambler.ru

Исследования по микроразмножению проводились в течении семи лет на базе лаборатории вирусологии Молдавского НИИ Плодоводства (ныне Научно-Практический Институт Садоводства, Виноградарства и Пищевых Технологий) с 13 сортами сливы домашней. В культуру вводили очищенные от покровных чешуй терминальные или латеральные почки с февраля по март и зеленые верхушки в апреле-начале мая. На этапе пролиферации испытано 10 питательных сред с варьированием сочетания цитокининов, ауксинов и типов агар-агара. Укоренение проводили с ИУК, ИМК, НУК, 2,4 Д, картолинов 1 и 2. Адаптацию осуществляли в перлите, смеси торф-перлит и торф-песок в контейнерах объемом от 8 см³ до 76 см³. При введении на искусственную питательную среду 92-100% эксплантов сортов Венгерка Крупная Сладкая и Ренклод Бовэ начали активный рост, 44-60% - Кишиневская Ранняя, Память Костиной, Ашатан, Ренклод Альтана. При этом эксплантаты из верхушечных почек развивались в 2-3 раза лучше, чем из латеральных - у Венгерки крупной сладкой 60 и 100%, у сорта Ашатан соответственно 60 и 20%. Предварительные исследования по введению *in vitro* эксплантатов после термотерапии *in vivo* для сорта сливы Осенняя Галя показали, что после термообработки в течение 4 недель при переменных температурах 40°C днем и фотопериоде 16 часов и 30°C без освещения 8 часов - в течение 8 часов прижилось 80%. После терапии в течение 4 недель при постоянной температуре 37°C прижилось только 30% изолированных верхушек. Пролиферация у 10 сортов сливы обычно начинается через 2-3 месяца после введения *in vitro*. Средний коэффициент размножения составил 1:3-4, при максимуме за пассаж 18-25 новых микропобега. Увеличение концентрации БАП с 3-4 мг/л до 8-12-16 мг/л приводило к угнетению и гибели побегов. Укоренение начиналось после 7-8-го пассажа и было от 38 до 97%. При этом чем меньшая концентрация ИМК использовалась в питательной бреде, тем выше был процент приживаемости при адаптации в нестерильны условиях в смеси торф-перлит в соотношении 1:1. Три сорта сливы, высаженные после размножения в стерильных условиях в сад, по сравнению с привитыми на сеянцы алычи были более низкорослы, имели на второй-третий год больше плодовых образований, хорошие углы отхождения скелетных ветвей. Для условий Молдовы отрицательным являлось образование корневой поросли.

MICROPROPAGATION OF PLUM VARIETIES IN MOLDOVA

A.M. Chernets

Practical Scientific Institute of Horticulture and Food Technologies

Moldova, Chisinau, e-mail: *chernetsa@rambler.ru*

Studies were conducted on micropropagation of 13 varieties of plum during seven years on the basis of virology laboratory Practical Scientific Institute of Horticulture and Food Technology. Terminal or lateral buds peeled epithelial scales were introduced into the culture from February to March, and the green tops were introduced in April and early May. At the proliferation part 10 cultural media were tested with various combinations of cytokinin, auxin and agar's types. IAA, IBA, NAA, 2,4-D, kartolin were used for the rooting. Microplants were planted in the container volume from 8 cm³ to 76 cm³ into perlite, peat-perlite mixture, and peat - sand for the adaptation. With the introduction of an artificial medium, 92%-100% explants of Vengerka Krupnaia Sladkaia varieties and Renclod Beauvais began active growth, 44%-60% of Chisinau Early, Memory Kostina, Ashatan, Renclod Altana began active growth as well. It's need to be mentioned that the explants of apical buds evolved better in 2-3 times comparing to the lateral buds: Vengerka Krupnaia Sladkaia showed 100% and 60% respectively, Ashatan's varieties showed 60% and 20% respectively. Earlier maid research about in vitro introduction of explants after thermotherapy for in vivo variety of Autumn plum Gal showed that after heat treatment during 4 weeks at variable temperatures of 40°C during the day time for 16 hours and 30°C at night during 8 hours stuck 80%. After treatment for 4 weeks at a constant temperature of 37°C caught only 30% isolated tops. Proliferation in 10 plum varieties usually begins 2-3 months after the introduction of in vitro. Average multiplication factor was 1:3-4, with a maximum of 18-25 for passage of new microshoots. Increasing the concentration of BAP with 3-4 mg/l to 8-16 mg/l resulted in inhibition and death of the shoots. Rooting started after 7-8 passages and was from 38% to 97% depending on the variety. Thus the lower concentration of IBA in the nutrient medium was used the higher was the percentage of survival in the adaptation to non-sterile conditions. Three varieties of own-rooted plum planted into the garden after micropropagation in comparison to the grafted ones on seedlings of cherry plum were more stunted, had more fruit formations on the second or third year, and had good angles of divergence of skeletal branches.

For Moldova's conditions is the minus the growth of root seedlings near the tree.

***IN VITRO* CLONING OF ‘LIVING FOSSILS’ - BLACK LOCUST (*ROBINIA PSEUDOACACIA* CV. ‘BÁBOLNA-1710’)**

G. Gyulai¹, R. Láposi^{1,2}, T. Demku¹, O. Melnychuk¹, A. Veres¹, O. Toldi¹

¹Szent István University, Genetic and Biotechnology Institute, Gödöllő

²Károly Robert College, KI, Gyöngyös

Industrial plant biotechnology provides effective tools for conservation genetics by producing a large number of clones. As the clones develop from somatic tissues or organs, the genome (DNA content) remains identical in each clone. In the case of the oldest, 304-year-old *Robinia pseudoacacia* cv. ‘Bábolna-1710’, planted in 1710, micropropagation was successfully used for clonal propagation, and resulted in identical resurrected clones. After rooting, clones will be planted in an archaeogenetical garden of botany in Gödöllő (Hungary).

Black locust (*Robinia pseudoacacia*) tree is the main species of the Fabaceae family (Fabales order) of temperate forest. It is native to North Americas, Appalachian Mountains, and its areas can be divided into Eastern and Western regions. However, *Robinia* is also native to Europe; nevertheless it became extinct in Europe from the Miocene flora (Middle Badenian; 14.3 to 3.8 My). In the Middle Ages, Jean Robin (1550-1629) Royal French gardener, planted the oldest European black locust at the Royal Herbal Garden Paris in 1601. This tree still grows under a strict protection. The oldest Hungarian black locust was planted about a century later in 1710 by count Szapáry at Bábolna. This tree still also grows in a good conditions. After this pioneering introduction, black locust quickly widespread in Europe. In 2012 the spreading area exceeded 464.000 ha in Hungary, which is 24,1% of our forests. The industries use almost every part of the tree; timbers have a high energy values; however the most important profit is the acacia honey.

Here, we report the *in vitro* cloning of the oldest Hungarian black locust in bud cultures. After successfully plant regeneration, clones were planted to the research field of the Szent István University, Genetic and Biotechnology Institute. To prove the true-to-type identity, regenerated clones were compared to the oldest ‘Bábolna-1710’ plant, and further black locust clones collected in Hungary and including the oldest European clone (‘Paris-1601’) by molecular analysis at three genetic loci of *scu7* (ACC₅ repeat), *scu10* (CAA₆ repeat), and ITS1-5.8S-ITS2. In total, 170 fragments of 28 alleles were detected among the 31 clones. Data showed that the process of ‘cloning of living fossils’ was successful as all *in vitro* clones showed the same fragment pattern alike the donor tree. Results also revealed that the ancient ‘Bábolna-1710’ and its *in vitro* clones show the closest genetic similarities not to the geographical closest, but the far Zalaszentgyörgy population grown in Hungary. Dendrogram analyses revealed the clonal propagation strategy of black locust in the natural habitats in Hungarian forests

СЕКЦИЯ 3.
SECTION 3.

СОЗДАНИЕ КОЛЛЕКЦИЙ РАСТЕНИЙ *IN VITRO*,
МЕТОДЫ СОХРАНЕНИЯ ГЕНОФОНДА

CREATION OF *IN VITRO* PLANT COLLECTIONS,
METHODS FOR GERMPLASM CONSERVATION

СОХРАНЕНИЕ РЕДКИХ И ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВИДОВ РОДА *ASTRAGALUS* (FABACEAE) *IN VITRO*

Э. Алтанцэцэг, Е.А. Калашникова

Российский государственный аграрный университет-МСХА имени
К.А. Тимирязева

127550, Россия, г. Москва, улл. Тимирязевская, 49.

Проблема охраны видов растений в настоящее время становится актуальной вследствие нерационального использования природных ресурсов, расширения воздействия человека на окружающую среду и ухудшения экологической обстановки. Для многих видов растений из-за сокращения их численности и распространения возникла реальная угроза исчезновения. К таким растениям относятся и различные виды рода Астрагал. Астрагалы относятся к семейству бобовых и представляют обширный род, насчитывающий до 2500 видов. В Монголии этот род представлен 59 видами астрагала. Все они многолетние, травянистые растения до 70 см высоты с многочисленными стеблями и большим количеством листьев.

Объектом исследования служили семена астрагала монгольского (*Astragalus mongholicus* Vge.) и астрагала приподнимающегося (*Astragalus adsurgens* Pall.), собранные в Монголии. Семена стерилизовали раствором сулемы (0,1%) в течение 10 минут, после чего их трижды промывали стерильной дистиллированной водой и помещали для проращивания на безгормональную питательную среду Мурасига и Скуга (МС). Для индукции образования адвентивных почек и побегов в состав питательной среды добавляли БАП, кинин, 2ip, препарат Дропп в различных концентрациях (1-3 мг/л) и в сочетании с ИУК 0,5 мг/л. В качестве эксплантов использовали изолированные верхушечные меристемы, сегменты гипокотилей и семядольных листьев.

Установлено, что из всех исследуемых регуляторов роста наибольшей морфогенетической активностью обладал БАП в концентрации 3 мг/л и препарат Дропп в концентрации 1 мг/л. В этих условиях выращивания наблюдали рост верхушечной меристемы и образование адвентивных почек в ее базальной части (от 3 до 5 побегов), которые в дальнейшем развивались в микропобеги. В вариантах с сегментами семядольных листьев и гипокотилей наблюдали образование только слабо пролиферирующей каллусной ткани. Присутствие в составе питательной среды 2ip или кинетина не приводило к образованию почек *de novo*. Видовые отличия были слабо выражены.

PRESERVATION RARE SPECIES AND MEDICINAL PLANTS ASTRAGALUS (FABACEAE) *IN VITRO*

E. Altantsetseg, E.A. Kalashnikova

Russian State Agrarian University - Moscow Agricultural Academy named after K.A.Timiryazev

127550, Russia, Moscow, Timiryazevskaya Str., 49

The problem of the plant species protection are now becoming topical because of irrational use of natural resources, expansion of human impacts on the environment and environmental degradation. There is a real threat of extinction for many plant species because of reduction of their number and distribution. These plants include and various species of *Astragalus*.

Astragalus belongs to the legume family and are extensive genus, numbering up to 2500 species. In Mongolia, this genus is represented by 59 species of *Astragalus*. All of them are perennial, herbaceous plants up to 70 cm in height with abundant stems and a lot of leaves.

The object of the study - seeds of *Astragalus mongholicus* Bge. and *Astragalus adsurgens* Pall., collected in Mongolia. Seeds were sterilized with a solution of mercuric chloride (0.1%) for 10 minutes, after which they're washed three times with sterile distilled water and placed on germination culture medium without hormone Murashige and Skoog (MS). To induce the formation of adventitious buds and escapes of the culture medium added BAP, kinetin, 2ip, Dropp the drug at various concentrations (1-3 mg/l) and in combination with IAA (0.5 mg/l). Isolated apical meristem, hypocotyls` segments and cotyledons were used as explants.

It has been found that out of all of these hormones most morphogenetic activity has BAP at a concentration of (3 mg/l) and Dropp the drug concentration of (1mg/l). Under these conditions, an increase in the cultivation of the apical meristem and the formation of adventitious buds in its basal part (3 to 5 shoots), which later developed in the micro shoots has been observed. In embodiments with cotyledons and by hypocotyls segments the formation of only weakly proliferating callus tissue was observed. The presence in the composition of the nutrient medium 2ip or kinetin did not lead to the formation of apex *de novo*. Specific differences were weakly expressed.

СОЗДАНИЕ КОЛЛЕКЦИИ *IN VITRO* СЕЛЕКЦИОННО-ОТОБРАННЫХ ФОРМ ТОПОЛЯ

Л.А. Богинская

ГНУ «Институт леса НАН Беларуси»

Беларусь, г. Гомель, e-mail: lpochta@mail.ru

В 60-х гг. в природно-климатических условиях Беларуси было начато сортоиспытание тополя с использованием материала полученного из географических областей бывшего СССР и Западной Европы. На современном этапе исследований в 50-летних сортоиспытательных культурах нами были отобраны формы различных видов и гибридов тополя, характеризующиеся высокой сохранностью (75% и выше). Внутри форм были выделены маточные деревья с наибольшими показателями высот и диаметров стволов. Для введения в культуру *in vitro* с деревьев был взят вегетативный материал – ветки диаметром 1-3 см. Источником эксплантов были ювенильные зеленые побеги, развившиеся из спящих почек на фрагментах толстых ветвей в ходе выгонки в лабораторных условиях. На одном фрагменте ветви развивались 2-3 конгломерата из 3-10 удлиненных побегов (до 6 см в длину) с хорошо развитыми междоузлиями. Схема стерилизации эксплантов – 1-2х узловых фрагментов зеленых побегов: мытье мягкой кистью в растворе хозяйственного мыла или жидкого средства для посуды, промывание в воде, обработка 3–4% раствором перекиси водорода 10 мин.; основная стерилизация – 1 мин. 70% этанолом, 3–4 мин. 0,1% раствором сулемы. Введение в культуру проводили путем стимуляции развития пазушных побегов на питательной среде $\frac{1}{2}$ МС с 0,5 мг/л БАП, 0,5 мг/л ИМК, 20 г/л сахарозы, рН 5,6-5,9 при интенсивности освещения 2-3 тыс. лк лампами типа ЛДЦ-40. Развившиеся первичные побеги отделяли от эксплантов и высаживали на среду для укоренения WPM с 0,1 мг/л НУК.

Поддержание клонов в коллекции *in vitro* проводится за счет побегов, развивающихся из пазушных и верхушечных меристем на средах с низкой концентрацией цитокининов и ауксинов (WPM 0,1 мг/л кинетин, 0,1 мг/л НУК, 10 мг/л аденина) для снижения вероятности проявления соматоклональной изменчивости. Для ювенилизации растений *in vitro* применяется также импульсная стимуляция (2-3 раза в год) веществами цитокининового и ауксинового типа действия на средах: $\frac{1}{2}$ МС 0,1 мг/л БАП, 30 мг/л аденина или $\frac{1}{2}$ МС 0,1 мг/л БАП, 0,1 мг/л ИМК, 0,1 мг/л НУК. Регулярное применение указанных сред вызывает нежелательное каллусообразование и развитие витрифицированных адвентивных побегов.

Коллекция тополя *in vitro* включает более 30 клонов, относящихся к таким видам и гибридам, как тополь китайский (*P. simonii*), *P. trichocarpa* 'Lettland', т. Петровского, или берлинский (*P. ×petrowskiana*, или *P. berolinensis*), т. корейский (*P. koreana*), т. Максимовича (*P. maximoviezii*), осина х т. бальзамический (*P. tremula × P. balsamifera*), а также клоны т. канадского (*P. deltoides*).

Коллекция селекционно-отобранных клонов тополя *in vitro* используется для получения посадочного материала используемого для закладки лесосырьевых плантаций.

THE ESTABLISHMENT OF *IN VITRO* COLLECTION OF SELECTED FORMS OF POPLAR

Liudmila A. Boginskaya

Forest Institute of the National Academy of Sciences of Belarus, Genetics and Biotechnology Laboratory

Belarus, Gomel, e-mail: *lpochta@mail.ru*

The forms of genus *Populus* that held the greatest promise for incorporation into *in vitro* genotype collection were selected on variety-testing sites established way back in the 1960s, local selection material and material brought from various geographic regions of the former USSR and Western Europe being used. High value of the form safety (75% and more), the highest means of tree height and trunk diameter among trees of the form characterize maternal trees selected for *in vitro* culture establishment.

Old branches, 1-4 cm thick collected from the crown and cut in 25-30 cm. Juvenile shoots forced from the dormant buds on the thick branches in laboratory conditions were the source of explants. The development of epicormic shoots takes 1-5 weeks in growth room with a temperature 18–23°C. As a rule two-three conglomerates consisting of 3-10 shoots with elongated internodes appear in one branch. Scheme of sterilization of one-two intermodal explants: clearing of pollution by water with detergents, sterilization with 3-4% solution of hydrogen peroxide during 10 min.; sterilization in laminar-box – 1 min. with 70% ethanol, 4 min. with 0.1% mercury chloride. For establishment of aseptic culture development of axillary shoots from explants were stimulated on the medium ½ MC 0.5 mg·l⁻¹ BAP, 0.5 mg·l⁻¹ IBA, 20 g·l⁻¹ sucrose, pH 5.6-5.9. Primary shoots were cut from explants and placed on the rooting medium WPM 0.1 mg·l⁻¹ NAA.

For purposes of reduction of somaclonal variability the collection is maintained by shoots developed from the axillary and apical meristems on the medium with low cytokine concentration (WPM 0.1 mg·l⁻¹ kinetin, 0.1 mg·l⁻¹ NAA, 10 mg·l⁻¹ adenin). For juvenilisation of *in vitro* plants pulse stimulation (two-three times a year) by cytokines is used: ½ MC 0.1 mg·l⁻¹ BAP, 30 mg·l⁻¹ adenin or ½ MC 0.1 mg·l⁻¹ BAP, 0.1 mg·l⁻¹ IBA, 0.1 mg·l⁻¹ NAA. Regular application of mentioned medium causes undesirable callus and vitrified adventive buds formation.

The *in vitro* collection comprised more than thirty clones of such species and hybrids as *Populus simonii* Carr., *P. koreana* Rehd., *P. trichocarpa* 'Lettland', *P. ×petrowskiana* Shroed. ex Regel or *P. berolinensis* C. Koch, *P. maximoviezii* Henry, *P. tremula* × *P. balsamifera* and clones of *P. deltoides* Bartl. ex Marsh.

For purposes of forest planting stock production for plantation establishment the *in vitro* collection of selected poplar forms is currently being used.

КОЛЛЕКЦИЯ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА ERICACEAE L. В ГЕНЕТИЧЕСКОМ БАНКЕ *IN VITRO* ГБС РАН

О.Г. Васильева, Т.С. Стахеева

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина Российской академии наук

Россия, г. Москва, e-mail: olgozerova@yandex.ru

В ГБС РАН создан один из крупнейших в России генобанков *in vitro*, насчитывающий около 1200 наименований растений.

Семейство Ericaceae L. в генобанке представлено двумя родами: род *Rhododendron* L. (26 генотипов) и род *Vaccinium* L. (15 генотипов). Представители рода *Rhododendron* - это, прежде всего, интродуцированные в ГБС РАН видовые рододендроны, в том числе редкие, а также высокодекоративные морозостойкие сорта преимущественно финской селекции. Род *Vaccinium* представлен 8 сортами высокорослой голубики раннего и среднераннего срока созревания ягод, 5 межвидовыми гибридами полувысокой голубики и 2 сортами брусники обыкновенной.

Особенности культивирования растений семейства *Ericaceae* в культуре *in vitro* определяются их биологическими особенностями: наличием эндотрофной микоризы во всех частях растения, высоким содержанием фенольных соединений, строгими требованиями к значению рН и элементам питания, трудностью укоренения.

Для всех изученных таксонов оптимизирована методика клонального микроразмножения. Выявлены оптимальные сроки отбора эксплантов модельных видов рододендронов и сортов высокорослой голубики в период минимального содержания фенолов (с ноября по март).

Для растений семейства Ericaceae на стадии размножения оптимальной является среда Андерсона, дополненная для голубики и брусники ИУК и 2iP (4 мг/л:15 мг/л), а для рододендронов - зеатином либо кинетином (1 мг/л) или в сочетании с ИУК (1 мг/л). Изучение морфогенетического потенциала позволило выделить генотипы, характеризующиеся более высокой способностью к регенерации побегов.

На представителях рода *Rhododendron* впервые была выявлена тесная взаимосвязь между значением коэффициента размножения и емкостью почек модельных объектов. Морфологический анализ почек интактных растений был предложен нами для предварительной оценки регенерационного потенциала. Для трудноукореняемых генотипов представителей семейства Ericaceae был выявлен положительный эффект кратковременных обработок базальной части микропобегов с последующей высадкой на безгормональную питательную среду. При этом было отмечено ускорение процесса корнеобразования в 2-2,5 раза и увеличение процента укоренившихся микропобегов. Показана перспектива использования подросших регенерантов в качестве маточников для размножения ценных сортов этих культур методом зеленого черенкования.

COLLECTION OF REPRESENTATIVES OF ERICACEAE L. FAMILY IN GENE BANK IN VITRO OF MBG RAS

O.G. Vasilyeva, T.S. Stakheyeva

Federal State Budget Institution of Science Main Botanical Garden named after
N.V. Tsitsin of the Russian Academy of Sciences

Russia, Moscow, e-mail: *olgozerova@yandex.ru*

One of the largest genebanks in Russia including 1200 plant species was created
in MBG RAS.

Ericaceae L. family stored in genebank is represented by two genus:
Rhododendron L. (26 genotypes) and *Vaccinium* L. (15 genotypes).

Representatives of *Rhododendron* L. genus are mainly introduced in MBG RAS
rhododendron specific species, including rare and decorative frost-resistant varieties
mainly Finnish selection.

Vaccinium L. genus is represented by 8 varieties of early and mid-early maturing
tall blueberry, 5 interspecies hybrids of demi-high blueberry and 2 varieties of
cowberry.

Features of cultivation for plants in the family Ericaceae in *in vitro* culture are
determined by their biological features: the presence endotrophic mycorrhiza in all
parts of the plant, high content of phenolic compounds, strict requirements to the pH
value and nutrients, the difficulty of rooting.

Method of clonal micropropagation was optimized for all studied taxa. Optimal
terms of sampling explants of model species of rhododendrons and varieties of tall
great bilberry were discovered in the period of minimum content of phenols (from
November to March).

Anderson nutrient medium, supplemented with IAA and 2ip (4 mg/l 15 mg/l) for
blueberry and cranberry; and with either zeatin or kinetin (1 mg/l), or in combination
with IAA (1 mg/l) for rhododendrons – is optimal for Ericaceae family plants on the
stage of reproduction. The study of the morphogenetic potential has allowed
identifying genotypes, characterized by a higher shoot regeneration capacity.

The representatives of *Rhododendron* genus first showed a close correlation
between the value of model objects multiplication factor and capacity of buds. A
morphological analysis of intact plant buds was proposed for the preliminary
assessment of regenerative potential. For hard-rooting genotypes of Ericaceae family a
positive effect of short-term processing of microshoots basal parts with subsequent
planting on hormone-free medium was revealed. At that, the enhancing of rooting
process in 2-2.5 times and an increase in the percentage rooted microshoots was
noticed. The perspective of using of grown regenerated plants as parent plants for
reproduction of valuable varieties by the method of green grafting was showed.

СТРАТЕГИЯ СОХРАНЕНИЯ ГЕНОФОНДА ВЕГЕТАТИВНО РАЗМНОЖАЕМЫХ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ В КОНТРОЛИРУЕМЫХ УСЛОВИЯХ СРЕДЫ В ВИРе

Т.А. Гавриленко, С.Е. Дунаева, О.Ю. Антонова, Н.А. Швачко, А.Р. Шувалова, Е.А. Крылова, А.Б. Овчинникова, Г.И. Пендинен, Л.Е. Шувалова, М.М. Черепко, Н.Н. Волкова

Государственное научное учреждение Всероссийский институт растениеводства им. Н.И. Вавилова Россельхозакадемии (ВИР)
190000, Россия, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, д. 42-44,
e-mail: t.a.gavrilenko@vir.nw.ru

Сохранение генофонда культурных растений и их дикорастущих родичей является основной задачей Института растениеводства им. Н.И. Вавилова (ВИР). Коллекция ВИР насчитывает более 320 000 образцов и является одной из крупнейших и старейших в мире коллекций генетических ресурсов растений. Основная часть коллекции ВИР представлена видами растений, размножаемых семенами, для долгосрочного сохранения которых используются методы низкотемпературного хранения. Однако хранение генофонда таких важных сельскохозяйственных культур, как картофель, плодовые, ягодные, декоративные, некоторые овощные в виде семян невозможно, поскольку половое размножение нарушает генетическую составляющую сортов, представленных высоко гетерозиготными генотипами. Коллекции этих культур можно стабильно воспроизводить только при вегетативном размножении.

В докладе рассматривается стратегия и приводится обзор современных технологий сохранения генофонда вегетативно размножаемых культурных растений в контролируемых условиях среды. Эти технологии включают: введение в культуру *in vitro* различных типов эксплантов, оздоровление растений от вирусных и бактериальных инфекций, микроразмножение, мониторинг фитосанитарного статуса микрорастений, генотипирование, среднесрочное *in vitro* хранение, криоконсервацию и долгосрочное криохраниение.

В докладе особое внимание уделено исследованиям, проводимым в этих направлениях в институте растениеводства им. Н.И. Вавилова (ВИР). В ВИРе в условиях *in vitro* сохраняется коллекция вегетативно размножаемых растений (представителей родов: *Solanum*, *Rubus*, *Ribes*, *Lonicera*, *Sorbus*, *Fragaria*, *Allium*), включающая около 700 образцов. Проведена успешная криоконсервация 80 местных сортов картофеля. Тестирование растений на наличие вирусных инфекций проводится с использованием методов ELISA и ОТ-ПЦР. Для оздоровления микрорастений картофеля от вирусных инфекций используется модифицированный метод комплексной хемо- и термотерапии. Местные сорта картофеля и большинство селекционных сортов малины генотипированы с использованием SSR маркеров.

STRATEGY OF CONSERVATION OF VEGETATIVELY PROPAGATED CROPS UNDER CONTROLLED CONDITIONS AT THE VIR

T.A. Gavrilenko, S.E. Dunaeva, O.Y. Antonova, N.A. Shvachko, A.R. Shuvalova, E.A. Krylova, A.B. Ovchinnikova, G.I. Pendinen, M.M. Cherepko, L.E. Shuvalova, N.N. Volkova

N.I. Vavilov All-Russian Research Institute of Plant Industry RAAS
190000, Russia, St. Petersburg, Bolshaja Morskaja Str., 42-44,
e-mail: t.a.gavrilenko@vir.nw.ru

The N.I.Vavilov Institute of Plant Industry (VIR) holds one of the biggest and oldest germplasm collections worldwide. Its collection represents plant genetic resources (diversity of crop species and their wild relatives) encompassing more than 320,000 accessions. Long-term storage of seeds at low temperature is the most convenient, traditional method for plant germplasm conservation. However, this method is not applicable for vegetatively propagated species like fruits, small berry crops, potato.

Most germplasm of the vegetatively propagated crops at VIR is maintained in field collections. However, the collections are endangered by diseases, pests and abiotic stress. To avoid the possible loss of these germplasm collections, new strategies, technologies and information are needed.

Modern technologies of *in vitro* and cryopreservation provide the opportunity to create safe duplicates conserved under controlled conditions. These technologies include: the establishment of *in vitro* culture, elimination of viral and bacterial infections, micropropagation, monitoring of phytosanitary status of microplants, genotyping, medium-term *in vitro* storage, cryoconservation and long-term storage of cryocollections.

Detail information about current stay of *in vitro* and cryopreservation programs at VIR will be provided. At present, about 700 of clonally propagated stocks (representatives of *Solanum*, *Rubus*, *Ribes*, *Sorbus*, *Lonicera*, *Fragaria*, *Allium* genera) are stored under *in vitro* conditions at VIR. About 80 potato landraces are cryopreserved. ELISA and RT-PCR methods are used for testing of viral infections in microplants. Modified method based on chemo- and thermotherapy is applied for virus eradication of potato microplants. Potato landraces and raspberry varieties were genotyped using SSR markers.

IN VITRO КОЛЛЕКЦИЯ МАЛИН И ЕЖЕВИК В ВНИИР ИМ. Н.И. ВАВИЛОВА (ВИР)

С.Е. Дунаева, Л.Е. Шувалова, Ю.В. Ухатова, Т.А. Гавриленко

Государственное научное учреждение Всероссийский институт растениеводства им. Н. И. Вавилова Россельхозакадемии
190000, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, д.42-44,
e-mail: dunaevase@mail.ru

Проблема сбора и сохранения агроразнообразия приобретает особую актуальность в связи с вытеснением сортов народной и стародавней селекции, несущих ценные комплексы адаптивных к окружающей среде генов, а также сокращением генофонда дикорастущих родичей, обусловленным урбанизацией, стихийными бедствиями и деградацией окружающей среды. На фоне этих событий возрастает роль национальных и международных генетических банков для *ex situ* сохранения разнообразия генетических ресурсов сельскохозяйственных культур и их диких родичей.

In vitro коллекция представителей рода *Rubus* ВИР сформирована как дублетная коллекция наиболее ценного генофонда, сосредоточенного в полевых коллекциях ВИР, и видообразцов, собранных на территории России и бывшего СССР в экспедициях ВИР и Ботанического института им. В.Л. Комарова. Состав *in vitro* коллекции в значительной степени уникален, так как представлен большим числом сортов малины отечественной селекции, в том числе стародавних сортов, не имеющих дублетов в других генетических банках.

Коллекция пробирочных растений используется для криоконсервации, детекции на вирусную инфекцию, генотипирования, обмена растительным материалом и среднесрочного хранения в условиях пониженной температуры и поддерживается на основе оптимизированных способов микроразмножения и тестирования на наличие эндофитной бактериальной микрофлоры (Дунаева и др., 2011).

In vitro коллекция представителей рода *Rubus* в ВИРе включает 182 клона (генотипа). В их числе 89 сортов малины, среди которых 64 сорта российской селекции, 25 сортов ежевики, 12 дикорастущих видообразцов малин (включая 35 экотипов вида *R. idaeus* L.) и 22 дикорастущих видообразца ежевик, собранных на территории Кавказа экспедициями ВИР. Большинство сортов малины находясь в полевой коллекции генотипированы с использованием ISSR и SSR маркеров (Lamouge et al., 2011) и тестированы методом ИФА на наличие вирусной инфекции. Сорта ежевики в коллекции *in vitro* идентифицированы с использованием изоферментной системы эстеразы (Дунаева и др., 2005).

На сортах малины из коллекции *in vitro* начаты работы по криоконсервации и криотерапии.

COLLECTION *IN VITRO* RASPBERRIES AND BLACKBERRIES AT THE VIR

S.E. Dunaeva, L.E. Shuvalova, J.V. Ukhatova, T.A. Gavrilenko

N.I. Vavilov All-Russian Research Institute of Plant Industry RAAS

190000, Russia, St. Petersburg, Bolshaja Morskaja Str., 42-44,

e-mail: dunaevase@mail.ru

The problem of the collection and conservations agrobiodiversity is of particular relevance in connection with displacing cultivar public and aging breeding, carrying valuable complexes adaptive to environment genes, as well as reduction gene pool wild relatives, due to urbanization, natural disasters and environmental degradation. On background these event increases role national and international plant gene banks for *ex situ* conservations of the diversity genetic resource crops and their wild relatives.

In vitro collection of the genus *Rubus* VIR formed as a doublet collection most valuable genetic diversity concentrated in field collections at the VIR, and samples of plant species collected on the area of Russia and the former Soviet Union in expeditions VIR and V. L. Komarov Botanical Institute. Composition *in vitro* collection largely unique, as represented by a large number of domestic breeding raspberry varieties, including landraces without doublets in other genebanks.

Collection *in vitro* plants used for cryopreservation, detecting viral infection, genotyping, exchange of plant material and the medium-term storage at low temperatures and is supported on the basis of optimized micropropagation methods and testing for the presence of endophytic bacterial microflora (Dunaeva et al., 2011).

In vitro collection of the genus *Rubus* at the VIR includes 182 clones (genotype). Among them 89 raspberry varieties, including 64 varieties of Russian selection, 25 varieties of blackberries, 12 samples of wild species of raspberries (including 35 ecotypes *R. idaeus* L.) and 22 samples of wild species of blackberry collected VIR expedition to the Caucasus. Most varieties of raspberries initially in field collections genotyped using ISSR and SSR markers (Lamourex et al., 2011) and detected by ELISA for the presence of viral infection. Blackberry varieties *in vitro* collection identified using isozyme of esterase (Dunaeva et al, 2005).

On cultivars *in vitro* collection raspberries started work on cryopreservation and cryotherapy.

ОСОБЕННОСТИ РАЗМНОЖЕНИЯ И СОХРАНЕНИЯ ЭФИРОМАСЛИЧНЫХ РАСТЕНИЙ *IN VITRO*

**Н.А. Егорова, А.Г. Кривохатко, О.В. Якимова, И.В. Ставцева,
Л.И. Каменек**

Институт сельского хозяйства Крыма

Россия, Республика Крым, Симферополь, e-mail: yegorova.na@mail.ru

Биотехнологические методы играют важную роль в повышении эффективности селекции и семеноводства растений и сохранении биоразнообразия. В задачи работы входило изучение влияния экзогенных и эндогенных факторов на развитие меристемных культур для разработки методик клонального микроразмножения и сохранения *in vitro* у основных возделываемых и перспективных для Крыма эфиромасличных растений. Материалом для исследований служили ткани и органы различных сортов и селекционных образцов лаванды (*Lavandula angustifolia* Mill.), шалфея (*Salvia sclarea* L.), розы эфиромасличной (*Rosa spp.*), фенхеля (*Foeniculum vulgare* Mill.), тысячелистника (*Achillea millefolium* L.), полыни (*Artemisia dracuncunus* L.), душицы (*Origanum vulgare* L.), мяты (*Mentha spp.*), герани (*Pelargonium roseum* Willd.). Для всех изученных генотипов были оптимизированы приемы клонального микроразмножения с использованием эксплантов меристем или сегментов стебля с узлом. Выявлены особенности влияния на микроразмножение генотипа и происхождения донорного растения, расположения экспланта на растении, сезона, состава питательной среды, цикла размножения. Определены условия и питательные среды для всех этапов микроразмножения и показано, что для размножения можно использовать индукцию множественного побегообразования или микрочеренкование побегов. У большинства изученных видов коэффициент размножения не превышал 1:9, а у лаванды и полыни (при сочетании двух методов) – достигал 1:35-1:56 за один цикл. Наиболее активное образование пазушных и адвентивных побегов было характерно для душицы, у которой коэффициент размножения превысил 1:50-1:60 за цикл в некоторых вариантах эксперимента.

Исследовано действие различных типов эксплантов и концентрации сахарозы в питательной среде на развитие меристемных культур лаванды и мяты при длительном сохранении при +4°C без освещения, а также их отрастание после переноса в обычные условия культивирования при +26°C. Показано, что лучшее сохранение *in vitro* и последующее развитие меристемных культур у мяты происходило при использовании в качестве эксплантов микрочеренков и питательной среды с добавлением 8% сахарозы. У лаванды в качестве объектов для хранения предпочтительно использовать меристемы и среду с 2% сахарозы. Показана возможность сохранения при разработанных условиях в асептической культуре разных сортов и селекционных образцов лаванды до 1 года, а мяты – до 1,5-2 лет.

PECULIARITIES OF ESSENTIAL OIL PLANTS PROPAGATION AND CONSERVATION *IN VITRO*

**N.A. Yegorova, A.G. Krivochatko, O.V. Yakimova, I.V. Stavtzeva,
L.I. Kamenyok**

Institute of Agriculture of Crimea

Russia, Crimea Republic, Simferopol, e-mail: yegorova.na@mail.ru

Biotechnological methods play an important role in improving the efficiency of plant breeding and seed production and biodiversity conservation. The objective of the work was to study the effect of exogenous and endogenous factors on the development of meristem cultures for the development methods of micropropagation and *in vitro* conservation for the main cultivated and promising for the Crimea essential oil plants. The tissues and organs of different varieties and breeding samples of lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.), sage (*Salvia sclarea* L.), essential oil rose (*Rosa spp.*), fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.), yarrow (*Achillea millefolium* L.), tarragon (*Artemisia dracunculus* L.), oregano (*Origanum vulgare* L.), mint (*Mentha spp.*), geranium (*Pelargonium roseum* Willd.) were used as the material for the investigations. The micropropagation methods for all studied genotypes using meristem explants or stem segments with the node have been optimized. Peculiarities of influence on clonal micropropagation the genotype and donor plant origin, explant location on the shoot, season, culture medium composition, cycle of propagation have been revealed. The conditions and nutrient medium for all stages of micropropagation were identified. It was shown that for propagation can be used the induction of multiple shoot formation or microcutting of shoots. For majority of examined species multiplication coefficient did not exceed 1:9, and for lavender and tarragon (when combined two techniques) – reached 1:35-1:56 per cycle. The most active formation of axillary and adventitious shoots was typical for oregano, for which the multiplication coefficient exceeded 1:50-1:60 per cycle in some variants of the experiment.

The effect of different types of explants and sucrose concentration in the culture medium on the development of meristem cultures of lavender and mint at prolonged preservation under +4°C without illumination, and also their regrowth after transferring them in the usual culture conditions under +26°C were investigated. It was shown that a better preservation *in vitro* and subsequent meristem culture development in mint occurred when used as explants microcuttings and nutrient medium supplemented with 8% sucrose. For lavender the meristem culture as objects for storage and medium with 2% sucrose were preferably used. The possibility of preservation under elaborated conditions in aseptic culture of different varieties and selection samples of lavender up to 1 year and mint – up to 1.5-2 year was shown.

ДЛИТЕЛЬНОЕ ДЕПОНИРОВАНИЕ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO* ЭКСПЛАНТОВ *ACTINIDIA DELICIOSA*

Н.Н. Иванова, И.В. Митрофанова

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр
298648, Республика Крым, г. Ялта, пгт Никита, e-mail: in_vitro@ukr.net

Создание коллекции сортов актинидии (*Actinidia deliciosa* (Chev.) Liang, Ferguson) в условиях *in vitro* дает возможность надежного сохранения ценного растительного генофонда. Целью работы была разработка эффективного способа сохранения ценных сортов актинидии в условиях *in vitro*. Наши исследования были направлены на изменение кинетики роста эксплантов актинидии, увеличения интервала между пассажами при сохранении максимального уровня жизнеспособности. В исследованиях использовали экспланты актинидии сортов Abbot, Bruno и Monti. В состав питательной среды $\frac{1}{2}$ МС вводили осмотики (маннит, сорбит) и ретардант (ССС) в различных концентрациях. Контролем служила среда $\frac{1}{2}$ МС без регуляторов роста. Экспланты депонировали при температуре $5\pm 1^\circ\text{C}$ и интенсивности освещения $1,25-3,75 \text{ мкМ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$.

В результате проведенных исследований выявлено, что специализированная среда с добавлением маннита в концентрации 60-90 мг/л способствовала минимализации роста эксплантов исследуемых сортов актинидии. По сравнению с контролем происходило замедление роста, однако при длительном хранении жизнеспособность эксплантов снижалась до 40%. На среде с сорбитом (60-90 мг/л) также наблюдали изменение кинетики роста, однако у большинства эксплантов отмечали появление этиолированных побегов, а жизнеспособность снижалась до 35%. Лучшие результаты были получены при комплексном использовании в составе питательной среды сахарозы (60-90 г/л) и СССР (0,2-0,4 г/л). Совместное применение сахарозы и СССР позволило увеличить как продолжительность беспересадочной культуры, так и уровень жизнеспособности эксплантов исследуемых сортов. В течение длительного периода (до 48 месяцев) экспланты имели высокий уровень жизнеспособности, который достигал 80%. При этом отмечено снижение кинетики роста в 2 раза по сравнению с контролем. Вместе с тем у эксплантов происходило активное формирование дополнительных микропобегов и зеленых листьев. Экспланты актинидии, помещенные в стандартные условия культивирования на среду МС, дополненную регуляторами роста, формировали многочисленные микропобеги, при этом коэффициент размножения увеличивался в 2-3 раза.

LONG DEPOSITING OF *ACTINIDIA DELICIOSA* EXPLANTS *IN VITRO*

N.N. Ivanova, I.V. Mitrofanova

Nikitsky Botanical Gardens – National Scientific Center
298648, Crimea, Yalta, Nikita; e-mail: *in_vitro@ukr.net*

Creation of *Actinidia deliciosa* (Chev.) Liang, Ferguson varieties' collection *in vitro* gives a possibility of reliable conservation of valuable plant germplasm. The aim of this work was to develop effective method for *in vitro* conservation of valuable *Actinidia* varieties. Our investigations were aimed on the deceleration of growth kinetics in *Actinidia* explants, increasing the interval between the passages at the maintenance of the maximum rate of their viability. In our investigations *Actinidia* explants of varieties Abbot, Bruno and Monti were used. Various concentrations of osmotic active substances (mannitol, sorbitol) and retardant (CCC) were added to ½ MC medium. The control was ½ MC medium without growth regulators. Explants were depositing under the temperature $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ and light intensity $1.25\text{-}3.75\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$.

As the result of the investigations it has been found out that specialized medium with mannitol concentration 60-90 mg/l was favorable for plants' growth minimization in the studied *Actinidia* varieties. As compared to control deceleration of growth has been noticed but under the long conservation explants' viability reduced. In the medium with sorbitol (60-90 mg/l) we also observed changes of the growth kinetics, but in most explants etiolated tissues appeared and viability decreased to 35%. The best results have been got under the use of sucrose (60-90 g/l) and CCC (0.2-0.4 g/l) in the medium. Joint use of sucrose and CCC let to increase both terms of non-transplant culture and the rate of explants' viability for studied varieties. During the long period (up to 48 months) explants had high viability rate up to 80%. Thus it has been noticed two times deceleration of growth kinetics by comparison to the control. At the same time active formation of additional microshoots and green leaves took place. *Actinidia* explants in the standard culture conditions in MC medium added with growth regulators formed numerous microshoots and reproductive coefficient increased in 2-3 times.

ОТБОР НОВЫХ ОБЪЕКТОВ СОХРАНЕНИЯ ГЕНОФОНДА ДУБА СКАЛЬНОГО *IN SITU* В КРЫМУ

С.А. Лось, Л.И. Терещенко

Украинский институт лесного хозяйства и агролесомелиорации
им. Г.М. Высоцкого

Украина, г. Харьков, e-mail: svitlana_los@rambler.ru, tel@uriffm.org.ua

Система сохранения генофонда лесных древесных пород *in situ* предусматривает отбор и сохранение популяций и индивидуумов в местах их природного произрастания. Одним из основных объектов сохранения генофонда лесных древесных пород *in situ*, а также базой для дальнейшей селекции и семеноводства на индивидуальном уровне являются плюсовые деревья. В Украине, в частности, в Крыму, работы по отбору таких объектов ведутся с 60-х годов прошлого столетия. До 2010 г в Государственный реестр были включены 94 плюсовых дерева дуба скального (*Quercus petraea*), отобранных в 7 лесничествах главным образом в условиях свежей и сухой судубрав.

В 2012 – 2013 гг. в ходе выполнения «Программы развития лесосеменного дела в Украине на 2010 – 2015 гг», в Крыму, нами, совместно с лесохозяйственными предприятиями и Крымской лесосеменной лабораторией, было дополнительно отобрано 36 плюсовых деревьев дуба скального.

Были обследованы природные насаждения в Прияйлинском, Верхнереченском и Ущельном лесничествах, два из которых имеют статус плюсовых насаждений. Возраст насаждений 94 – 112 лет. На двух участках преобладает дуб скальный (96, 99%). В насаждении в Ущельном лесничестве его часть – 49%, часть бука крымского – 38%. Граба обыкновенного – 9%. Насаждения характеризуются хорошим состоянием и селекционной структурой. Так, процент деревьев дуба скального I и II селекционных категорий составляет от 23,8 до 44,4%. Это говорит о том, что третье насаждение, не имеющее статуса плюсового насаждения, соответствует этому статусу.

Следует также отметить, что на участке в Верхнереченском лесничестве в 70-е годы уже было отобрано 17 деревьев. Большинство вновь отобранных деревьев было отнесено к II селекционной категории из-за небольших превышений над средними показателями насаждений и только 4 – к I селекционной категории. В целом превышения отобранных деревьев составляют от 0 до 51,6 % по диаметру и от 0 до 48,1% высоте. Все деревья характеризуются прямыми стволами и хорошим состоянием. На них оформлена соответствующая документация и они внесены в Государственный реестр плюсовых деревьев.

Следующим этапом сохранения ценного генофонда дуба скального является создание архива клонов, семейственных и клоновых лесосеменных плантаций, и организация их испытания по потомству.

SELECTION OF THE NEW OBJECTS OF SESSILE OAK GENEPOOL *IN SITU* CONSERVATION IN CRIMEA

S.A. Los, L.I. Tereschenko

Ukrainian Research Institute of Forestry and Forest Melioration named after G.M. Vysotskij (URIFFM)

Ukraine, Kharkiv, e-mail: *svitlana_los@rambler.ru*, *tel@uriffm.org.ua*

System of forest tree species genepool conservation *in situ* includes populations and individuals selection and conservation in the areas of their natural habitat. One of the main objects units of forest tree species genetic diversity conservation *in situ*, as well as the base for further breeding and seed growing at the individual level, are plus trees. In Ukraine and particularly in the Crimea, the process of such objects selecting have been conducted since the 60s of the last century. Until 2010, the State register included 94 plus trees of sessile oak (*Quercus petraea*) selected in 7 forestry unit subdivision mainly in fresh and dry suboakeries conditions.

In 2012 – 2013 in the progress of the "Development Program of forest seed growing in Ukraine for 2010 – 2015" in Crimea we together with forest enterprises and Crimea forest seed laboratory additionally selected 36 plus trees of sessile oak.

Natural stands in Priyaylinskoye, Verhnerechenskoye Ushelnoye forestry unit subdivision were investigated; two of them have a plus stand status. Age of the trees is 94 – 112 years. Sessile oak dominates on two plots (96, 99%). In stand in Ushelnoye forestry unit subdivision its part – 49%, Crimean beech – 38%), hornbeam – 9%.

The stands were characterized with good condition and breeding structure. Thus, the percentage of sessile oak trees of I and II selection categories is from 23.8 to 44.4%. This let to suggest that the third stand, not having plus stands status now, corresponds to this status.

It should also be noted that on the area in Verhnerechensk unit subdivision in the 70s 17 trees have already been selected. The majority of new selected trees was related to II breeding category due to the small excess above the average of stands characteristic and only 4 – to I selection category. In general, excess of the selected trees are from 0 to 51.6% in diameter and from 0 to 48.1% by height. All trees are characterized by straight trunks and good condition. The relevant documentation has been framed for these trees and they were included in the State plus trees Register.

The next step of sessile oak valuable genetic diversity conservation is creating a clonal archive, seedling and clonal seed orchards, and the organization of their progeny testing.

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА ДЛИТЕЛЬНОГО ДЕПОНИРОВАНИЯ РАСТЕНИЙ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

А.В. Любинская, Л.М. Шпак, Д.Б. Рахметов

Национальный ботанический сад им.Н.Н.Гришко НАН Украины
Украина, г. Киев, e-mail: *alla-@ukr.net*

Размножение растений в культуре *in vitro* весьма актуально для видов, имеющих трудности с образованием полноценных семян или связанные с потерей их всхожести при длительном хранении.

По этой причине объектом наших исследований были выбраны представители рода *Vitex*, *Stevia*, *Actinidia* и *Daphne*.

При создании банка растительного материала исследователи модифицируют состав питательной среды, которая обеспечила бы затормаживание, а по возможности и остановку процессов метаболизма в организме, которые ведут к старению растений

Исходя с этого, целью наших исследований была разработка надежного и дешевого способа длительного хранения растений в условиях *in vitro*.

Растения различных генотипов, полученные из стерильных проростков, переносили на агаризированные питательные среды с разным содержанием микро- и макроэлементов, агара. За основу была избрана среда Мурасиге и Скуга.

Опыты показали, что замедление роста растений в условиях *in vitro* можно достичь используя пониженные дозы микро- и макроэлементов. При этом использование $\frac{1}{2}$ дозы не приводит к недостатку элементов питания растений при длительном хранении и не вызывает у них некротические явления по истечению некоторого периода времени.

Изменения в углеродном питании, в частности уменьшение количества сахарозы с 35 г/л до 15 г/л, обеспечивало и поддерживало соответственный уровень торможения ростовых процессов.

Изучение условий культивирования растений – освещенности, длительности светового дня, показало, что достичь постепенного постоянного замедления ростовых процессов у растений можно при уменьшении интенсивности освещения. Лучшие результаты были достигнуты при выращивании растений стевии при освещении 1-3 клк

Достичь постепенного замедления роста растений можно и путем увеличения плотности питательной среды. Контрольная среда содержала 7,5 г/л агара. Увеличение количества агара до 8,5 г/л замедляло рост растений, но дальнейшее увеличение содержания агара негативно влияло на состояние растений: среда трескалась, у проростков не формировались корни.

Таким образом, интеграция всех условий замедления роста растений в единую систему дала нам возможность депонировать растения в культуре *in vitro* без смены питательных сред на протяжении более 6 месяцев.

OPTIMIZATION OF THE METHOD OF LONG TERM CONSERVATION OF PLANTS IN IN VITRO CULTURE

A. Lyubinskaya, L. Shpak, J. Rakhmetov

M.M. Gryshko National Botanical Gardens of NAS of Ukraine

Ukraine, Kiev, e-mail: *alla-@ukr.net*

Reproduction of plants in *in vitro* culture is rather actual for the types having difficulties of formation of full-developed seeds or due to loss of germination ability at long storage.

For this reason the object of our researches representatives of genus *Vitex*, *Stevia*, *Actinidia* and *Daphne* have been chosen.

At creation of bank of plant material researchers modify structure of a nutrient medium which would provide braking, and whenever possible and a stop of processes of a metabolism in an organism that conducted the plants aging.

Proceeding from it the purpose of our researches was a working out of reliable and cheap method of long storage of plants in *in vitro* conditions.

Plants of various genotypes obtained from sterile seedlings were transferred on solidified culture media with the different contents of macro- and microelements and agar. As basic culture medium Murashige and Skoog medium was used.

Experiments have shown, that suppression of growth of plants in conditions *in vitro* can be reached by using of twice diluted concentration of mineral elements does not lead to a lack of necessary elements for a growth of plants at long storage and does not cause their necrosis after the long period of time.

Changes in a carbohydrate concentration, in particular reduction of quantity of sucrose from 35 g/l to 15 g/l provided and supported respective level of growth suppression.

Studying of culture conditions for plants - light intensity, duration of light period has shown that suppression of growth intensity is possible by the reduction of intensity of illumination. The best results have been reached during the culture of plants at illumination 1.0-1.5 Klux.

It is possible to reach gradual growth inhibition of plants by increase the density of nutrient medium. The control medium contains 7.5 g/l of agar. Increase of agar concentration up to 8.5 g/l slowed down growth of plants, but the further increase of agar content in the medium negatively influenced on plants: medium was burst, roots didn't form.

Thus, integration of all conditions of plants growth inhibition in uniform system gave us the chance to deposit plants in culture *in vitro* without change of culture medium during more than 6 months.

ОСОБЕННОСТИ РЕГЕНЕРАЦИИ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO* НЕКОТОРЫХ ВИДОВ РОДА *ACTINIDIA* LINDL.

Е.В. Малаева¹, Л.Н. Коновалова²

¹ГБУ ВО «Волгоградский региональный ботанический сад»

Россия, г. Волгоград, e-mail: *e.malaeva@mail.ru*

²ФГБУН Главный ботанический сад им. Н.В.Цицина РАН

Россия, г. Москва, e-mail: *new_tech@mail.ru*

Актинидия - дальневосточный эндемик, обладающий вкусовыми и целебными достоинствами. Бесконтрольные вырубки лесов в Приморском крае становятся угрозой уничтожения актинидии в естественных условиях. Использование современных методов биотехнологии позволит сохранить генофонд этой культуры и размножить в короткие сроки перспективные формы и сорта.

Цель наших исследований - совершенствование технологии клонального микроразмножения и изучение особенностей размножения *in vitro* некоторых видов сем. Actinidiaceae Van-Tiegh. (Актинидиевые) для пополнения генетического банка *in vitro* фиторесурсных и редких видов растений.

Методика исследований основывалась на общепринятых классических приемах работы с культурами изолированных тканей и органов растений (Бутенко, 1999). В качестве первичных эксплантов использовали апикальные и латеральные почки в фазе активного роста.

В нашей работе на этапе микроразмножения использовали следующие цитокинины: зеатин (Z), бензиламинопурин (6-БАП), тидиазурон (TDZ), изопентиламинопурин (2-iP), кинетин (K), в концентрациях от 0,5 до 5,0 мг/л.

На этапе укоренения изучали влияние различных регуляторов роста группы ауксинов (ИМК и ИУК в концентрациях от 1,0 до 3,0 мг/л) на формирование корней, при этом учитывали укореняемость и длину корня размножаемых растений.

Экспланты мужских экземпляров давали побеги, характеризующиеся повышенной энергией роста, а их число на эксплант было несколько выше по сравнению с женскими растениями.

Выявлено, что экспланты *Actinidia arguta* и *A. polygama* развивались более активно по сравнению с представителями *A. kolomikta*, что коррелирует с энергией роста этих видов в природных условиях. Важно отметить, что различия в реализации морфогенетического потенциала между этими видами сохранялись как на стадии инициации развития эксплантов, так и на стадии пролиферации побегов.

Установлены наиболее благоприятные сроки отбора экспланта - фаза начала активного роста (апрель-май).

Создана коллекция видов, сортообразцов и дикорастущих форм актинидии (около 70 наименований) *in vitro* и создан банк ДНК (47 наименований), подкрепленных гербарными образцами.

REGENERATION PECULIARITIES OF *IN VITRO* CULTURE OF SOME SPECIES IN GENUS *ACTINIDIA* LINDL.

E.V. Malaeva¹, L.N. Konovalova²

¹Volgograd Regional Botanical Garden

Russia, Volgograd, e-mail: *e.malaeva@mail.ru*

²Main Botanical Garden named after N.V. Tsitsin of RAS

Russia, Moscow, e-mail: *new_tech@mail.ru*

Actinidia is a Far East endemic having possessing taste and medical qualities. The uncontrolled deforestation in the Primorski Krai leads to endangering *actinidia* growing in the natural conditions. The use of the advanced biotechnology will allow preserving the genetic material of this culture and reproducing appreciable forms and varieties in a relatively short time.

The purpose of our research was to improve the clonal micropropagation technology and to study the preparation peculiarities *in vitro* of some species of family *Actinidiaceae* Van-Tiegh. to enlarge the genet-bank *in vitro* of phytoresource and rare plants.

The research methods are based on the classical ways of working with the cultures of isolated organs and tissues in plants (Butenko, 1999). Apical and lateral buds in their vegetative phase are taken as primary explants.

The cytokinins used in our research were the following: zeatin (Z), benzyladenine (BA), tidiuron (TDZ), isopentyladenine (2-iP), kinetin (K).

At the rootage stage the influence of the group of auxins (indoleacetic acid - IAA and indolebutyric acid - IBA) on the formation of the roots has been studied, and herewith the rooting ability and the length of the roost has been taken into consideration.

Male explants gave shoots characterized by a higher growing capacity and their number per one explant was larger compared to that of the female plants.

The explants of *Actinidia arguta* and *A. polygama* have been found out to develop more actively than those of *A. kolomikta* which corresponds to their growing capacity in the natural surroundings. It is important to note that the differences between these two species in the realization of their morphogenetic potential were apparent both at the initiation and proliferation stages.

The most favourable explant isolation terms have been defined - during the vegetative phase (April-May) has better results than that in the physiological dormancy phase.

The optimum storage conditions for *actinidia* meristems in the gene-bank of axenic cultures have been found. The collection of the species, variety samples and wild forms of *actinidia* (about 70 items) *in vitro* including herbarium samples and the DNA bank (47 items) have been created.

КОЛЛЕКЦИЯ ЛИСТВЕННЫХ ДРЕВЕСНЫХ РАСТЕНИЙ *IN VITRO* КАК ОСНОВА СОХРАНЕНИЯ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ЦЕННОГО ГЕНОФОНДА

О.С. Машкина^{1,2}, Т.М. Табацкая²

¹Воронежский государственный университет

Россия, г. Воронеж, e-mail: olga_mashkina@yahoo.com

²Всероссийский НИИ лесной генетики, селекции и биотехнологии

Россия, г. Воронеж, e-mail: ilgis@lesgen.vrn.ru

К числу современных подходов сохранения *ex situ* представителей ценного генофонда древесных растений относится создание и длительное хранение живых коллекций с помощью различных методов культивирования *in vitro*.

Показана возможность двух способов длительного (свыше 20 лет) культивирования микрорастений лиственных древесных растений (березы, тополя, осины и ивы) в условиях *in vitro*. 1. Способ, уменьшающий вероятность возникновения соматональной изменчивости при многолетнем хранении и обеспечивающий сохранение генетической и хозяйственной ценности исходных генотипов. Заключается в редком субкультивировании микрорастений (с интервалом раз в 5-6 месяцев) на специально подобранных безгормональных питательных средах при обычных условиях климатического режима (16-ти часовой фотопериод, освещенность 2-3 клк, 24-26°C). Свыше 6-21 года в условиях *in vitro* таким способом нами поддерживается коллекция клонов быстрорастущих, продуктивных и устойчивых триплоидов тополя белого и сереющего, гибридов осины, узорчатых форм карельской березы, декоративных форм березы далекарлийской, гибридов и видов ивы. Полевые испытания клонов березы и тополя после длительного (от года до 11 лет) культивирования *in vitro* выявили их внутрикловую однородность и идентичность исходным экземплярам (по особенностям роста, габитусу, качеству древесины, плоидности, цитогенетическим и молекулярно-генетическим особенностям). 2. Подход, способствующий удлинению периода субкультивирования до года. Заключается в депонировании коллекции при пониженной позитивной температуре (4°C) на специально подобранных питательных средах без гормонов в течение 4-5 месяцев, с последующим культивированием на свету в обычных условиях климатического режима еще 5-6 месяцев. Через 10-12 месяцев хранения выживало до 90% культур, тогда как при обычных условиях культивирования уже через 8 месяцев выживало не более 20%. Длительно поддерживаемая коллекция ценных генотипов (генетический банк микрорастений *in vitro*, который регулярно пополняется новыми генотипами) может быть использована для сохранения *ex situ* представителей ценного генофонда, а также для их селективного тиражирования и выращивания посадочного материала для создания лесных культур целевого назначения и лесоразведения быстрорастущих лиственных пород после пожаров, засухи, вырубок, техногенного загрязнения и др.

COLLECTION OF *IN VITRO* DECIDUOUS TREE SPECIMENS AS A BASIS FOR A CONSERVATION OF VALUABLE GENE POOL

O.S Mashkina^{1,2}, T.M. Tabatskaya²,

¹Voronezh State University

Russia, Voronezh, e-mail: *olga_mashkina@yahoo.com*

²All-Russian Research Institute of Forest Genetics, Breeding and Biotechnology
Russia, Voronezh, e-mail: *ilgis@lesgen.vrn.ru*

Among the modern methods of *ex situ* conservation of valuable specimens of tree genetic resources is the creation and long-term preservation of living collections by means of different *in vitro* cultivation methods. The possibility of two ways of long-term *in vitro* cultivation (over 20 years) of microplants of deciduous tree species (birch, poplar, aspen and willow) has been shown.

1. A method which reduce the probability of somaclonal variability arising due to long-term conservation and ensure the preservation of genetic and economic value of the original genotypes represents the infrequent microplants subculture (spaced 5-6 months apart) on special hormone-free nutrient media under regular climate conditions: 24-26°C, at an illuminance of 2-3 klx for 16 h per day). By this way over 6-21 years we maintain the *in vitro* clones collection of fast-growing, productive and resistant triploids of poplar (*Populus alba* L., *P. canescens* Sm.), aspen (*Populus tremula* L.); Karelian birch with patterned wood (*Betula pendula* Roth var. *carelica* Mercl.), ornamental birch forms (*B. pendula* "dalekarlica" (L.f)), willow species (*Salix* L. spp.) and hybrids have been maintained by us. Field trials of birch and poplar clones obtained during the long-term *in vitro* cultivation (from 1 up to 11 years) revealed their intraclonal homogeneity and their identity to original specimens (in growth features, habitus, wood quality, ploidy, cytogenetic and molecular genetic features).

2. A method to prolongate the period of subculture up to one year consists in the deposition of the plant collections on the selected hormone-free nutrient media within 4-5 months at low-temperature (4°C) with subsequent culture in the light under normal climate conditions for another 5-6 months. After 10-12 months of storage there were up to 90% survived specimens in *in vitro* culture, while there were no more than 20% of specimens survived after 8 months of ordinary cultivation.

The collection of valuable genotypes (*in vitro* microplants gene-bank, which is regularly supplemented with new genotypes) maintained over a long period of time can be used for *ex situ* conservation of valuable specimens of genetic resources, as well as for the selective replication and growth of planting stock for forest plantation and afforestation by means of fast-growing deciduous tree species planted upon areas damaged from drought, deforestation, industrial pollution and other negative impacts.

КОЛЛЕКЦИЯ РАСТЕНИЙ *IN VITRO* В ГЛАВНОМ БОТАНИЧЕСКОМ САДУ

О.И. Молканова, Л.Н. Коновалова, Е.И. Любимова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина Российской академии наук

Россия, г. Москва, e-mail: molkanova@mail.ru

Сохранение биоразнообразия растений – одна из актуальнейших задач ботанических садов. Наряду с традиционными методами сохранения растений *ex situ* применение культуры изолированных тканей и органов становится все более и более актуальным. Разработка эффективных методов устойчивого воспроизводства растений является основой работ по сохранению генофонда.

На основе массового скрининга разработаны высокоэффективные технологии клонального микроразмножения растений различных таксономических групп для более 1200 генотипов, 144 видов, 57 семейств, включающих 64 вида занесенных в Красную книгу РФ. На основе этих исследований создана крупнейшая в России коллекция *in vitro* ценных видов и сортов растений. Особое внимание уделяется применению биотехнологических методов для сохранения редких и исчезающих видов растений. Наиболее представительными в банке меристем редких видов являются семейства: Orchidaceae, Iridaceae, Liliaceae, Paeoniaceae, Rosaceae, Amaryllidaceae, Araliaceae.

Коллекция растений *in vitro* используется для изучения морфогенетических и регенерационных процессов у эксплантов. Способность к органогенезу *in vitro* существенно отличается между семействами, видами и сортами растений. Для устойчивого воспроизводства растений определены компетентные экспланты (апикальная меристема с листовыми примордиями).

Подобраны оптимальные условия, определены оптимальные типы эксплантов различных жизненных форм растений для длительного хранения *in vitro* (3-7°C). Установлены важнейшие факторы, влияющие на длительность сохранения в условиях *in vitro*. Особую роль в сохранении растений *in vitro* принадлежит осмотикам, ретардантам и физическим факторам культивирования - температуре и освещенности.

Первостепенное значение при создании генетического банка *in vitro* уделяется репрезентативности и сохранению генетической чистоты. На модельных объектах, для оценки стабильности образцов хранящихся в банке *in vitro*, проведен RAPD-анализ.

Коллекция ценных генотипов поддерживается нами свыше 10-15 лет с периодической высадкой растений в питомник. Полевые испытания растений высаженных в питомник после длительного (от года до 15 лет) культивирования *in vitro*, выявили однородность исходным экземплярам по фенотипическим признакам и особенностям роста.

COLLECTION OF PLANTS IN VITRO IN THE MAIN BOTANICAL GARDEN

O.I. Molkanova, L.N. Konovalova, E.I. Lyubimova

Federal State Institution of Science Botanical Garden named after N.V. Tsitsin of the Russian Academy of Sciences

Russia, Moscow, e-mail: *molkanova@mail.ru*

Conservation of plants biodiversity is one of the most actual problem of botanical gardens. Equally with traditional methods of plant preservation *ex situ* application of isolated tissue and organ cultures has become more and more actual. The development of sustainable reproduction plants methods 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 on the basis of mass screening for more than 1200 plant genotypes attributed to 144 genera and 57 families, including, 64 species listed the Russian Federation Red list. 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. Orchidaceae, Iridaceae, Liliaceae, Paeoniaceae, Rosaceae, Amaryllidaceae, Araliaceae families are the most representative in bank of rare plant species.

The collection of plants *in vitro* are used for studying of regeneration and morphogenetic processed in explants.

The ability for organogenesis plant differed essentially between plant families, species and cultivars. Competent explants for sustainable reproduction of plants (apical meristem with leaf primordial) have been determined.

The optimum storage conditions have been selected and the optimal types of explants have been determined for different life forms of plants for conservation *in vitro* at 3-7°C. The major factors influencing on duration of explants of plants in condition *in vitro* have been established. Special roles in plants conservation *in vitro* play retardants, osmotics and physical factors of cultivation - temperature and light intensity.

During creation of gene-bank *in vitro* primary importance is given to representative and preservation of genetic stability. For model species RAPD-analysis has been carried out to control the genetic stability of the items kept in bank in vitro.

The collection of valuable genotypes has been supported for more than 10-15 years periodically planting trees in nursery. Field tests of after prolonged (from one year to 15 years) *in vitro* cultivation revealed their identity to original samples on the specifics of growth and phenotypic.

BELAMCANDA CHINENSIS* (L.) DC. В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO

А.А. Мухаметвафина

Федеральное бюджетное учреждение науки Ботанический сад – институт Уфимского научного центра Российской академии наук
Россия, г. Уфа, e-mail: *mukhametvafina@mail.ru*

Belamcanda chinensis (L.) DC. – травянистое короткокорневищное многолетнее растение высотой 80-150 см. В естественных условиях произрастает в Китае, Японии, Северной Индии, на территории России – юге Приморского края.

Вид внесен в Красную книгу России, как находящийся под угрозой исчезновения, имеющий 1 (Е) категорию редкости и нуждающийся в охране (перечень объектов растительного мира). Также включен в Красную книгу Приморского края.

Растение интересно как красивоцветущее и декоративно-лиственное. Является одним из элементов традиционной китайской медицины.

Перспективным способом сохранения редких и исчезающих растений является размножение в культуре *in vitro*.

Испытаны три типа эксплантов: семена, зародыши (из семян восковой спелости) и пазушные почки цветоносов. Оптимальными эксплантами из трех изученных оказались зародыши. Использование метода культуры зародыша *in vitro*, во-первых позволило получить до 100% стерильных эксплантов, около 70% из которых оказались жизнеспособными, во-вторых сократить сроки получения регенрантов. Уже через 3 месяца культивирования растения-регенранты имели следующие параметры: длина побега - $11,12 \pm 1,60$ см, длина корней – $21,26 \pm 2,15$ см, количество листьев – $5,17 \pm 1,19$ шт. Коэффициент мультипликации составил 1-2. Весной следующего года растения-регенранты были высажены в полевые условия. Более 30% растений цвели и плодоносили в тот же год.

***BELAMCANDA CHINENSIS* (L.) DC. IN VITRO**

A.A. Mukhametvafina

Botanical Garden – Institute of Ufa Scientific Center

Russia, Ufa, e-mail: *mukhametvafina@mail.ru*

Belamcanda chinensis (L.) DC. is herbaceous shortrhizomatous perennial plant from 80 to 150 cm in height. In the natural conditions it grows in China, Japan, North India, on the territory of Russia – in the south of Primorsky Krai.

The species is included in the Red book of Russia (the first category of rarity) because it stands in need of protection.

This beautiful flower species is used as ornamental plant and it is one of the elements of traditional chinese medicine.

Perspective method of conservation of rare and disappear plants is clonal micropropagation. Three types of explants were tested: seeds, embryos (taken from seeds of wax stage of ripeness) and axillaries buds of flower shoots. It is show that optimal explants are the embryos. Embryo culture method let us reach 100% sterility of explants and to short the time of plant-regenerants formation. After 3 months of culture regenerated plants had the following parameters: the length of shoot – 11.12 ± 1.60 cm, root length – 21.26 ± 2.15 cm, number of leaves – 5.17 ± 1.19 pcs. Micropropagation coefficient was equal 1-2. Regenerated plants were transferred in field conditions next spring. About 30% plants were started to flower and fruit in the same year.

СОЗДАНИЕ КОЛЛЕКЦИИ ОЗИМОГО И ЯРОВОГО РАПСА (*BRASSICA NAPUS* L.) В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Н.В. Никифорова, О.Л. Кляченко

Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины
03041, Украина, г. Киев, ул. Героев Оборона 13,
e-mail: nikiforova.n.v@mail.ru

Рапс (*Brassica napus* L.) – одна из важнейших сельскохозяйственных культур зоны Лесостепи и Полесья. Создание высокопродуктивных сортов способствовало внедрению этой масличной культуры в сельское хозяйство, увеличению посевных площадей и усовершенствованию технологии выращивания.

Создание коллекций генетического разнообразия растений считается наиболее эффективным путем его сохранения, обогащения и использования. При решении проблемы сохранения генофонда растений успешно используются методы биотехнологии растений, включающие клональное микроразмножение и другие методы *in vitro*, в основе которых лежит уникальная тотипотентность растительной клетки. Для массового получения растений используют метод клонального микроразмножения, который обеспечивает высокий коэффициент размножения, отбор растений с селекционно-ценными признаками в условиях *in vitro*, оздоровление от патогенов. Сохранение растительного материала можно осуществлять и путем замедления его роста (растущие коллекции *in vitro*).

Целью нашей работы была разработка биотехнологических приемов для создания коллекции перспективных генотипов ярового и озимого рапса на основе комплекса методов культуры изолированных тканей и органов *in vitro*.

Объектами исследований были 18 сортов озимого и 20 сортов ярового рапса. Стерильные семена вводили в культуру *in vitro*, используя безгормональную среду Мурасиге и Скуга (МС). На седьмые сутки полученные стерильные проростки переносили на МС, дополненную кинетином (0,25 мг/л) и помещали в термостат с постоянной температурой +4°C, интенсивностью освещения 4 клк и 16-часовым фотопериодом. Далее в три этапа (на 7, 14 и 21 сутки) оценивали состояние растений-регенерантов и их реакцию на низкую положительную температуру, после чего коллекцию переносили на свежую питательную среду, и культивировали при постоянной температуре +24 °С. Фотопериод и интенсивность освещения оставались прежними. Чередование низких и умеренных положительных температур, при культивировании коллекции, произвели в трехкратной повторности.

В результате наших исследований были получены медленно растущие коллекции озимого и ярового рапса (*Brassica napus* L.) *in vitro* с замедленными метаболическими процессами путем чередуемого воздействия низких и умеренных положительных температур на исследуемые регенеранты.

CREATION OF THE WINTER AND SPRING RAPESEED COLLECTION (*BRASSICA NAPUS* L.) *IN VITRO* CULTURE

N.V. Nykyforova, O.L. Klyachenko

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine

03041, Ukraine, Kiev, Heroev Oborony Str. 13, e-mail: nikiforova.n.v@mail.ru

Rapeseed (*Brassica napus* L.) is one of the most important crops of forest-steppe and forest area zones. Creation of high-yielding varieties promoted introduction of this oilseed crop in agriculture, increased acreage and improved the cultivation technology.

Creation of plant's genetic diversity collections is considered to be the most effective way to save, enrich and use it. In the performance of the problem of plants' genetic diversity conservation plant biotechnology techniques are successfully used, including micropropagation and other *in vitro* methods, which are based on unique totipotency of plant cells. For the mass reproduction of plants the method of clonal micropropagation is used, which provides a high multiplication factor, selection of plants with breeding and valuable traits *in vitro* conditions, recovery from pathogens. Preservation of plant material can be carried out also by slowing its growth (growing collection *in vitro*).

The aim of our study was to develop biotechnological methods to create collection of potential genotypes of spring and winter rape, based on the complex of isolated tissues and organs *in vitro* methods.

The study included 18 varieties of winter and 20 varieties of spring rape. Sterile seeds were brought *in vitro* culture with usage of hormone-free Murashige and Skoog medium (MS). On the seventh day sterile seedlings were transferred on MS medium supplemented with kinetin (0.25 mg/l) and placed in thermostat with a constant temperature + 4°C, light intensity 4 Klux and 16 hour photoperiod. Further, in three stages (7, 14 and 21 days) state of regenerated plants and their reaction to the low positive temperature were evaluated, and then collection was transferred on the fresh nutrient medium and cultivated at a constant temperature + 24°C, photoperiod and light intensity remained the same. Alternation of low and moderate positive temperatures during cultivation collection was made in three replications.

As a result of our research slow-growing collection of winter and spring rape (*Brassica napus* L.) *in vitro* with slower metabolisms was obtained through the rotating influence of low and moderate temperatures on the investigated regenerated plants.

ОСОБЕННОСТИ ДЛИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ РЕДКИХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ КУЛЬТУРЫ *IN VITRO*.

М.А. Седченко, Н.Г. Чоркина

Ботанический Сад (Институт) Академии Наук Молдовы
MD -2002, Республика Молдова, Кишинев, ул. Пэдурий 18,
e-mail: *m.s.84@mail.ru; ninaciorchina@mail.ru*

На сегодняшний день для решения задач сохранения и восстановления генофонда редких и исчезающих видов растений широкое применение получил метод культуры *in vitro*. Коллекции *in vitro* можно длительно хранить в состоянии активного или замедленного роста. Но постоянные пересадки растений *in vitro* довольно трудоёмки. Поэтому важное значение в создании коллекции вегетативно размножаемых растений *in vitro* получает метод длительного беспересадочного хранения пробирочных растений. Депонирование позволяет уменьшить затраты труда и времени, сэкономить расходы на реактивы. Методики, обеспечивающие медленный рост, основаны на снижении температуры и освещенности, модификации среды, особенно путем добавления осмотиков или ретардантов. Для различных культур используются специальные модификации этих процедур, поэтому поиск путей создания благоприятных условий для длительного беспересадочного хранения пробирочных растений является актуальной проблемой для каждого культивируемого вида. Объектами наших исследований являются виды, занесенные в Красную Книгу – *Fritillaria montana*, *Bellevalia sarmatica*, а также редкий вид, обладающий высокой степенью декоративности – *Lilium martagon*. Ранее нами были подобраны наиболее оптимальные условия по интродукции данных видов в условия *in vitro*, оптимизирована система микроклонального размножения в зависимости от минеральных и гормональных факторов питательной среды. Затем, когда было получено достаточное количество регенерантов, следующим этапом наших исследований в разработке системы сохранения редких видов, стал поиск оптимальных условий, при которых было бы эффективно длительное беспересадочное хранение растений. Разрабатывая систему депонирования, мы отталкивались от имеющихся у нас возможностей и решили провести ряд экспериментов, которые могли бы показать эффективность использования в качестве сдерживающего рост растений легкодоступного и недорогого реактива – сахара. Для каждого из видов были определены оптимальные условия, которые позволяют содержать культуры в течение 12 месяцев без пересадок. Высокий процент жизнеспособности пробирочных растений (84-93%) был обеспечен культивированием микролуковичек на базовой среде по МС (Мурасиге и Скуг, 1962) дополненной различными концентрациями сахара, для: *Lilium martagon* - 100 г/л; *Fritillaria montana* - 90 г/л; *Bellevalia sarmatica* – 90 г/л.

Растения содержались в культуральной комнате (при 20°С) в темноте.

PARTICULARITIES OF LONG-TERM STORAGE OF RARE PLANT SPECIES UNDER THE *IN VITRO* CULTURE CONDITIONS

M.A. Sedcenco, N.G. Ciorchina

Botanical Garden of the Academy of Science of Moldova

2002, Moldova, Kishinev, Padurij Street, 18, e-mail: *m.s.84@mail.ru*;

ninaciorchina@mail.ru

To meet the challenges of preserving and restoring the gene pool of rare and endangered plant species, the *in vitro* culture method is widely applied nowadays. *In vitro* collections can be stored in a state of active or slow growth for a long time. However, constantly transplanting *in vitro* plants is a rather laborious task. Therefore, the method of long-term non-transplanting storage of test-tube plants is of great importance in creating a collection of clonal *in vitro* plants. Deposition reduces the time and labor spent, and allows lowering the reagent costs. The techniques that provide for slow growth are based upon temperature and light reduction, and the medium modification, especially by adding osmotics or retardants. For different cultures, special modifications to these procedures are applied; hence, finding the ways to create favorable conditions for long-term non-transplanting storage of test-tube plants is an urgent problem for each species to be cultivated. Our research is focused upon the species listed in the Red Book, such as *Fritillaria montana*, *Bellevalia sarmatica*, and *Lilium martagon*, a highly decorative rare species. We have previously found the best conditions possible for introducing these species in the *in vitro* conditions, and optimized the microclonal reproduction system depending on the mineral and hormonal factors of the growth-supporting nutrient medium. After obtaining a sufficient quantity of regenerates, the next stage of our research in developing a system for conservation of rare species has been focused upon finding the optimal conditions for making long-term non-transplanting storage of plants efficient. When developing a storage system, we have used the available opportunities as a starting point and held a series of experiments to demonstrate the efficiency of using sucrose, which is an available and inexpensive reagent, for deterring plant growth. For each of the species, optimal conditions that allow storing the cultures for 12 months without replanting them, have been determined. A high percentage of test-tube plant viability (84 – 93%) has been achieved by cultivating microbulbs in the basic environment according to MS (Murashige and Skoog, 1962), supplemented with different concentrations of sucrose, for the following: *Lilium martagon* – 100 g/l; *Fritillaria montana* – 90 g/l; *Bellevalia sarmatica* – 90 g/l.

The plants have been stored in the culture room (at 20°C) in the dark.

СКОРОСТЬ ВОССТАНОВЛЕНИЯ И КОЭФФИЦИЕНТ РАЗМНОЖЕНИЯ ЗЕМЛЯНИКИ ЛЕСНОЙ ПРИ РАЗЛИЧНОЙ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ДЕГИДРАТАЦИИ АПЕКСОВ ПЕРЕД ЗАМОРАЖИВАНИЕМ

А.И. Соловьева, О.Н. Высоцкая

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН
127276, Россия, Москва, ул. Ботаническая, 35,
e-mail: shvjova.aleksandra@rambler.ru

В последние пятнадцать лет при криосохранении тканей и органов растений все чаще применяют протоколы, несвязанные с использованием дорогостоящего и сложного в обслуживании программного оборудования, в частности, набирает популярность метод дегидратации, поскольку он прост и позволяет исключить инкубирование клеток в растворах токсичных криопротекторов. Однако необходимо особое внимание уделять режиму дегидратации растительного материала, поскольку он имеет огромное значение для восстановления тканей после их оттаивания.

В качестве объекта исследования использовали апексы, изолированные из растений земляники (*Fragaria vesca* L., сорта Reine des Valles), культивируемых *in vitro*. Перед замораживанием, после соответствующей подготовки, апексы дегидратировали в стерильном потоке воздуха ламинар-бокса в течение 3, 4 или 5 ч, каждая группа включала в себя 10-16 образцов, опыт проводили в двукратной повторности.

Достоверно показано, что продолжительность дегидратации, используемая в рамках нашего исследования, не оказывала существенного влияния на жизнеспособность образцов *F. vesca* после их замораживания в жидком азоте. Она составила около 80%. Апексы, принадлежащие к разным опытным группам, восстанавливали рост с неодинаковой скоростью. Быстрее всех признаки жизнеспособности проявляли апексы, которые перед замораживанием дегидратировали в течение 5 ч. Вероятно, при уменьшении продолжительности дегидратации происходит недостаточное удаление свободной воды из тканей и как следствие растительный материал повреждается во время замораживания и оттаивания из-за образования кристаллического льда. Кроме того, растения, полученные из апексов, которые дегидратировали в течение 3, 4 или 5 ч, значительно отличались друг от друга по коэффициенту размножения. У растений, восстановленных после криосохранения из апексов, которые подсушивали в течение 5 ч, коэффициент размножения был в два раза выше, чем у растений, восстановленных из апексов, которые дегидратировали в течение 3 ч.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 14-04-31615.

RECOVERY AND PROPAGATION RATES OF FOREST STRAWBERRY DERIVED FROM CRYOPRESERVATION FOLLOWED DIFFERENT DEHYDRATION DURATION

A.I. Solov'yova, O.N. Vysotskaya

Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences
127276, Russia, Moscow, Botanicheskaya Str. 35,
e-mail: *slyjova.aleksandra@rambler.ru*

Cryopreservation protocols not included high cost and complex cryo-freezers are frequently used in preservation of plant tissues and organs the last fifteen years. Dehydration is a simple cryopreservation techniques which allow eliminate the incubation of plant cells in toxic cryoprotectant solutions. The regime of plant cell dehydration is particularly important to achieve the successful tissue recovery after rewarming.

Shoot tips excised from *in vitro* strawberry plants (*Fragaria vesca* L., cv. Reine des Valles) was used in the present study. The shoot tips were dehydrated in sterile airflow for three, four or five hours before freezing, each group of shoot tips included 10-16 samples. The experiment was repeated twice.

It was revealed the dehydration duration not significantly affected the viability of strawberry shoot tips after freezing in liquid nitrogen in our experiments. Regrowth frequency was about 80%.

The experimental groups were significantly different at recovery rates. The group of specimens having been dehydrated for five hours before freezing had highest rate of recovery. The decrease of dehydration duration probably led to deficient free water removal from the tissues and as a consequence ice crystals formed and damaged the plant material during freezing and rewarming. Further, the plants obtained from the shoot tips having been dehydrated for three, four or five hours, were significantly different at a rate of propagation. Maximum of propagation rate was observed in the latter experimental group of plants. Propagation rate of plants recovered from cryopreserved shoot tips having been previously dehydrated for five hours was two times higher than that of plants recovered from shoot tips having been dehydrated for three hours.

The work supported by grant RFBR №14-04-31615.

СОХРАНЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO* ГЕНОФОНДА СИРЕНИ СЕЛЕКЦИИ ЦБС НАН БЕЛАРУСИ

Е.В. Спиридович, А.Б. Власова, А.Н. Юхимук, Н.Г. Брель, А.В. Зубарев, Т.И. Фоменко

ГНУ «Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси»,
270012, Республика Беларусь, г. Минск, ул. Сурганова 2В,
e-mail: A_Spiridovich@cbg.org.by

В настоящее время биотехнологическая коллекция *in vitro* рода *Syringa* Центрального ботанического сада НАН Беларуси состоит из 66 сортов и видов. Все сорта собственной селекции ЦБС введены в культуру *in vitro*, как ценный материал, представляющий национальное наследие в историческом и генетическом отношении.

Сохранение исходного генотипа у полученных микроклонов немаловажное условие для стабильного поддержания коллекции *in vitro* наряду с подбором оптимального состава питательных сред, используемого гормонального баланса и ряда других факторов. Изменчивость среди растений-регенерантов *in vitro* бывает очень высокой. Наиболее вероятными источниками генетической вариабельности могут являться мутации, хромосомные нарушения, а также возникновение полиплоидных клеток. Эти изменения накапливаются, главным образом, при культивировании каллусных тканей. Следует отметить, что генотипы *Syringa* spp. в ЦБС получали прямым органогенезом из апикальных и аксиллярных почек без образования каллуса. Таким образом, в разработанной нами технологии этап, при котором наиболее часто наблюдается накопление генетических отклонений – культивирование каллуса, отсутствует.

Проведен сравнительный анализ клонов и исходных генотипов с использованием RAPD-PCR и ISSR-PCR. Примененные методы показали, что *in vitro* популяции различных генотипов различаются по степени генетической вариабельности их представителей. Вариабельность проявлялась в обнаружении уникальных для некоторых растений полиморфных локусов ДНК (качественные различия), а также различной количественной интенсивности гомологичных для генотипа фрагментов. Методы позволяют с высокой достоверностью контролировать процесс воспроизводства исходного генотипа.

Биотехнологическая коллекция сирени является уникальным фондом для селекционной работы. Полученные данные по ДНК типированию образцов коллекции сирени включены в отдельный раздел «Биохимические паспорта» информационно-поисковой системы Hortus Botanicus Centralis – Info (<http://hbc.bas-net.by/bcb/>) и разделов портала Совета ботанических садов России, Беларуси и Казахстана (<http://hortusbotanicus.ru>), что дает основу для расширения сотрудничества и информационного обмена в целях сохранения биоразнообразия.

CONSERVATION AND STUDY OF THE LILAC GENE POOL IN VITRO OF CBG NAS BELARUS BREEDING

A. Spiridovich, A. Vlasava, A. Uchimuk, N. Brel, A. Zubarev, T. Fomenko

Central Botanical Gardens NAS of Belarus

270012, Belarus, Minsk, Surganova Str. 2B, e-mail: A_Spiridovich@cbg.org.by

Syringa biotechnology collection *in vitro* of Central Botanical Gardens NAS of Belarus consists of 66 species and varieties. All varieties of CBG selection introduced in culture *in vitro*, as a valuable material of national heritage, historically and genetically.

Preservation of the original genotype of obtained mikroklones is an important task (condition) along with the selection of the optimal composition of culture media, used hormonal balance and other factors. Variability among plants regenerated *in vitro* can be very high. The most likely source of genetic variability can be mutations, chromosomal disorders, as well as the occurrence of polyploidy cells. These changes are accumulated mainly by tissue.

It should be noted, that *Syringa* genotypes of *in vitro* CBG collection were prepared by direct organogenesis from apical and axillary buds without callus formation. Thus, the proposed technology does not contain the step of callus formation in which the accumulation of genetic abnormalities most frequently observed.

A comparative analysis of clones and initial genotypes using RAPD-PCR and ISSR-PCR was conducted. The applied methods showed that *in vitro* populations of different genotypes differ in the degree of genetic variability of their representatives. Variability manifested in finding some unique plant polymorphic DNA loci (qualitative differences), as well as various quantitative intensity of homologous genotype fragments. These methods allow to control the process of original genotype reproduction with high reliability.

Lilac collection of CBG NAS of Belarus is a unique foundation for breeding. The data of DNA typing lilac collection samples included in a separate section "Biochemical passport" of information system Hortus Botanicus Centralis - Info (<http://hbc.bas-net.by/bcb/>) and sections of the portal Council of botanical gardens of Russia, Belarus and Kazakhstan (<http://hortusbotanicus.ru>), which provides the basis for enhanced cooperation and information exchange in order to preserve biodiversity.

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ КУЛЬТИВИРУЕМОГО КАРТОФЕЛЯ ИЗ *IN VITRO* КОЛЛЕКЦИИ ВИР

Н.А. Швачко, Н.Н. Волкова, Т.А. Гавриленко

Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт растениеводства им. Н. И. Вавилова Российской академии сельскохозяйственных наук, 190000, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Большая Морская 42-44, e-mail: n_shvachko@mail.ru

В коллекции ВИР сохраняется около 8000 образцов картофеля, в основном в полевых коллекциях. Для надежного сохранения генофонда картофеля, помимо полевых коллекций необходимо создавать дублетные *in vitro* и криоколлекции. При криохранении все метаболические процессы в растениях фактически останавливаются и теоретически возможно бессрочно долго сохранять генетически стабильный растительный материал в контролируемых условиях среды. В данной работе мы исследовали регенерационную способность почек после криоразмораживания образцов картофеля из *in vitro* коллекции ВИР.

Материалом исследования служили местные сорта картофеля из различных экспедиционных сборов ВИР в Южной Америке, предположительно отличающиеся по своей устойчивости к низким температурам. Нами были сформированы три группы: (1) образцы, собранные в Чили, в регионах на высоте менее 200 метров н.у.м.; (2) образцы, диплоидных и тетраплоидных андийских видов, собранные в Колумбии, Перу, Боливии на высотах от 2200 до 2850 метров н.у.м.; (3) образцы высокогорных андийских видов, собранные в Перу, Боливии на высоте более 3800 метров н.у.м. (верхний предел возделывания картофеля). В данной работе для криоконсервации использован метод Droplet vitrification (Panis et al., 2005) с модификацией (Shvachko and Gavrilenko, 2011; Дунаева и др., 2011). Получены следующие результаты.

Для образцов группы (1) значения регенерационной способности почек варьировали от $41,8 \pm 1,0\%$ до $71,1 \pm 1,9\%$, среднее значение регенерационной способности образцов для данной группы составило 38,7%. Для образцов группы (2) значения регенерационной способности варьировали от $26,7 \pm 2,8\%$ до $91,7 \pm 0,9\%$; среднее значение составило 56,8%. Для образцов группы (3) были получены значения регенерационной способности почек от $55,4 \pm 0,2\%$ до $76,7 \pm 6,1\%$, со средним значением 66,3%.

В пределах каждой группы выявлено существенное влияние генотипа на регенерационную способность почек после криоразмораживания. Были выявлены статистически значимые различия в регенерационной способности между образцами, собранными в Чили (группа 1) и высокогорными образцами (группа 3). Изученные образцы заложены на длительное хранение в криобанк ВИР.

CRYOPRESERVATION OF CULTIVATED POTATO FROM *IN VITRO* COLLECTION OF VIR

N.A. Shvachko, N.N. Volkova, T.A. Gavrylenko

N.I.Vavilov Institute of Plant Industry (VIR), Russian Academy of Agricultural Sciences

190000, Russia, St. Petersburg, Bolshaya Morskaya, 42-44,

e-mail: *n_shvachko@mail.ru*

Potato collection in VIR is stored about 8000 accessions, mainly under the field conditions. In addition to field collection must be created *in vitro* and cryocollections for duplicate security. At cryopreservation all metabolic processes in plant cells stop and it is theoretically possible to maintain genetically stable plant materials in the long term. In our work we investigated regeneration rates of potato buds after rewarming of samples from *in vitro* potato collection of VIR.

The plant material used consisted of 21 accessions of South America potato landraces with presumably different resistance to low temperatures. The material was divided into three groups: (1) the samples collected in Chile (about 200 meters above sea level); (2) samples of diploid and tetraploid Andean species collected in Colombia, Peru, Bolivia, at altitudes of 2200 to 2850 meters above sea level; (3) samples of high Andean species, collected in Peru, Bolivia, at an altitude of 3800 meters above sea level (upper limit of cultivation of potatoes). For cryopreservation we used the droplet-vitrification method of Panis et al. (2005) with modification (Shvachko and Gavrylenko, 2011; Dunaeva et al, 2011). Following results were obtained.

For samples of group (1) the value of the of regeneration rate varied from $41.8 \pm 1.0\%$ to $71.1 \pm 1.9\%$, %; the medium value of regeneration rates of samples for this group was 38.7%. For samples of group (2) the value of regeneration rate varied from $26.7 \pm 2.8\%$ to $91.7 \pm 0.9\%$; the medium value of regeneration rates of samples for this group was 56.8%. For samples of group (3) the value of regeneration rate varied from $55.4 \pm 0.2\%$ to $76.7 \pm 6.1\%$; with the medium value 66.3%.

The regeneration rates within each group were depended on genotype. There were found statistical differences in regeneration rate between samples collected in Chile (group 1) and high-altitude samples (group 3). The studied samples were left in cryotank on the long-term storage in the VIR Cryobank.

ДЕПОНИРОВАНИЕ РЕДКИХ ВИДОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ В КОЛЛЕКЦИИ *IN VITRO*

Т.И. Фоменко, Е.В. Спиридович, И.Ф. Вайновская, Л.Г. Бердичевец, Т.В. Мазур

Центральный ботанический сад НАН Беларуси
270012, Республика Беларусь, г. Минск, ул. Сурганова 2В,
e-mail: fomenko_ti@mail.ru

В отделе биохимии и биотехнологии растений создана коллекция лекарственных растений *in vitro* для формирования базы ресурсов перспективных ценных видов и сохранения генофонда. Одной из важных задач клеточной биотехнологии является обеспечить надежное хранение ценных генотипов неограниченное время в условиях *in vitro* методом депонирования или криоконсервации. Для торможения процессов роста используют различные ретарданты (маннит, хлорхолинхлорид, алар, анцимидол и др.). Для длительного сохранения в культуре *in vitro* *Agastache rugosa*, в среду культивирования добавляли маннит в концентрации 10, 20 и 30 г/л, что замедляло рост растений с увеличением в среде культивирования концентрации маннита. При депонировании *Scutellaria baicalensis* нами использовался поливинилпирролидон (ПВП) в концентрациях 20, 50, 100 и 150 мг/л. ПВП используется в культуре клеток и тканей с одной стороны как ретардант, а с другой, как катализатор синтеза эндогенных белков в суспензионных культурах растений. Одновременно с замедлением роста растений наблюдали индукцию развития пазушных почек. Добавление в среду маннита приводило к витрификации побегов, однако перенос растений на среду, не содержащую маннита, приводил к снятию витрификации и нормальному развитию растений. Субкультивирование можно удлинить до 6-24 месяцев, поместив коллекцию в условия низких положительных температур. Выбор температуры для хранения материала определяется особенностями вида растения, его холодостойкостью. Так, для культур, нормально растущих при 20-25°C, требуемая температура для депонирования находится в диапазоне 5-10°C, для культур, произрастающих при температуре 30°C - в диапазоне 10-15°C. Растения кадило сарматского хранили при температуре +8-10°C и пониженной освещенности на среде для укоренения МС, содержащей 0,3 мг/л ИУК в течение 6-8 месяцев. Депонирование коллекций с использованием низких температур проводится при пониженном освещении. Для депонирования растений в коллекции *in vitro* используют вещества, способные тормозить удлинение стеблей растения, но не оказывающие отрицательного влияния на другие физиологические процессы. Растения кадило сарматского *Melittis sarmatica* и наперстянки пурпурной *Digitalis purpurea* культивировали на среде МС с добавлением хлорхолинхлорида в концентрации 150 и 300 мг/л, что оказывало угнетающее влияние на морфометрические показатели и на образование побегов из пазушных почек. Разработка методов депонирования показала индивидуальный характер подбора условий для конкретного генотипа.

DEPOSITION OF RARE SPECIES OF PLANTS IN THE *IN VITRO* COLLECTION

T.I. Fomenko, E.V. Spiridovich, I.F. Vaynovskaya, L.G. Berdichevets, T.W. Masur

Central Botanical Garden NAN of Belarus

270012, Belarus, Minsk, Ul. Surganova 2B, e-mail: fomenko_ti@mail.ru

The collection of plants of *in vitro* for the formation of the resources base of perspective valuable types and gene pool preservation is created in the department of biochemistry and biotechnology of plants. One of the important problems of cellular biotechnology is to provide reliable storage of valuable genotypes for unlimited time in the conditions of *in vitro* by the methods of deposition or cryoconservation. Various retardants (mannitol, chlorcholinchlorid, alar, anstimidol, etc.) are used to break the process of growth. For a long preservation of *in vitro* culture *Agastache rugosa* the concentration of 10, 20 and 30 g/l on medium of cultivation was added which slowed down the growth of plants with reaction strengthening with increase in the environment of cultivation of mannitol concentration. At *Scutellaria baicalensis* deposition we used polyvinilpyrolidon (PVP) in concentration of 20, 50, 100 and 150 mg/l. PVP used in culture of cells and tissues on the one hand as a retardant, with another, as the catalyst of synthesis of endogenous proteins in suspension cultures of plants. At the same time with delay of growth of plants we observed the induction of the lateral buds development. It is proven that a mannitol addition to culture medium of all considered options led to vitrification of shoots, however, replacing plants in culture medium which doesn't contain a mannitol, led to removal of vitrification and normal development of plants. Subcultivation can be extended till 6-24 months, having placed the collection in conditions of low positive temperatures. Temperature choice for material storage is defined by features of a plant species, its cold resistance. Thus, for the cultures normally growing at 20-25°C, the demanded temperature for deposition is to be ranged from 5°C to 10°C, for the cultures growing at the temperature of 30°C, - from 10°C to 15°C. Deposition of collections with use of low temperatures is carried out at the lowered lighting. Plants *Melittis sarmatica* were stored within 6-8 months at the temperature of + 8-10°C on the MS culture medium for rooting containing 0.3 mg/l IAA and at the lowered illumination. For deposition of plants of *in vitro* collection the substances capable of slowing down lengthening of a plant stalks, but having no negative impact on other physiological processes are used. Plants *Melittis sarmatica* and *Digitalis purpurea* were cultivated on the MS environment with the addition of chlorcholinchlorid in the concentration of 150 and 300 mg/l which had an oppressing impact on morphometric indicators and formation of shoots from the lateral buds. The development of deposition methods has shown an individual way of choosing conditions for a concrete genotype.

СЕКЦИЯ 4.
SECTION 4.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В
ИЗУЧЕНИИ БИОРАЗНООБРАЗИЯ РАСТЕНИЙ

MOLECULAR GENETICS TECHNIQUES FOR PLANT
BIODIVERSITY STUDIES

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ СЕЛЕКЦИОННЫХ СОРТОВ КАРТОФЕЛЯ НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ПОЛИМОРФИЗМА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ЯДЕРНОЙ И ОРГАНЕЛЬНЫХ ДНК

О.Ю. Антонова, Н.А. Швачко, О.Ю. Шувалов, Л.Ю. Новикова, Л.И. Костина, Т.А. Гавриленко

ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт растениеводства им. Н.И. Вавилова Россельхозакадемии
190000, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Большая Морская 42-44,
e-mail: n_shvachko@mail.ru

Формирование объективных представлений об уровне и спектре генетического разнообразия культивируемых растений существенно расширяет возможности регистрации, систематизации, сохранения сортового генофонда и его рационального использования в селекции. Задача настоящего исследования состояла в изучении генетического разнообразия и в генотипировании селекционных сортов картофеля с использованием различных ДНК-маркеров.

Материал исследования включал 185 селекционных сортов из коллекции ВИР. Генотипирование сортов проводили с использованием монолокусных ядерных SSR маркеров из набора PGI (Ghislain et al., 2009). Для обработки результатов SSR анализа использовали ДНК-анализатор Li-Cor 4300S. Типы цитоплазм сортов определяли при помощи ПЦР-анализа с праймерами, специфичными к отдельным последовательностям хлДНК и мтДНК. Дополнительно проведен маркер опосредованный отбор с использованием серии CAPS и SCAR маркеров, ассоциированных с *R* генами, контролирующими устойчивость к различным патогенам: (1) к вирусам ХБК и YBK - маркеры CP60/DdeI и GP122/EcoRV, RYSC3, тесно сцепленные с генами *Rx1*, и *Ry-f_{sto}*, *Ry_{adg}*, соответственно; (2) маркер NI-25, сцепленный с геном *Sen1*, контролирующим устойчивость к патотипу 1 возбудителя рака картофеля - *Synchytrium endobioticum*; (3) маркеры TG689, 239E4left/*Alu* I и *Grol-4*, ассоциированные с генами *H1* и *Grol-4*, вовлеченными в контроль устойчивости к золотистой картофельной нематоды *Globodera rostochiensis*, патотип Ro1.

На основании результатов анализа полиморфизма 14 nSSR локусов проведено генотипирование 118 сортов из коллекции ВИР. Показано, что для однозначного различения селекционных сортов изученной выборки достаточно 3 пар праймеров: Сорты трех основных периодов селекции картофеля различаются по показателям уровня полиморфизма ядерных SSR маркеров, частотам типов цитоплазм и по частотам аллелей *R* генов, контролирующих устойчивость к различным заболеваниям.

Полученная информация позволит создать в дальнейшем систему идентификации и регистрации сортов и может быть востребована в системе сертификации семенного картофеля, а также в генбанках, сохраняющих разнообразие культурных растений.

STUDY OF GENETIC DIVERSITY IN POTATO CULTIVARS USING ANALYSIS OF SEQUENCE POLYMORPHISM OF NUCLEAR AND ORGANELLE DNA

O.Y. Antonova, N.A. Shvachko, O.Y. Shuvalov, L.Y. Novikova, L.I. Kostina, T.A. Gavrilenko

N.I.Vavilov Institute of Plant Industry (VIR), Russian Academy of Agricultural Sciences

190000, Russia, St.- Petersburg, Bolshaya Morskaya 42-44,

e-mail: n_shvachko@mail.ru

The creation of objective knowledge about the level and range of genetic diversity of cultivated plants greatly enhances the registration, classification, preservation of the gene pool of high-quality management and its use in breeding. The purpose of this study was to investigate genetic diversity of breeding potato cultivars and their genotyping using different DNA markers.

The plant material used consisted of 185 breeding potato cultivars from VIR collection. Genotyping was carried out using the various monolocus nuclear microsatellite (nSSR) markers from a PGI-set (Ghislain et al., 2009). For registration of the results of SSR analysis DNA analyzer Li-Cor 4300S was used. The cytoplasmic types of cultivars were determined by PCR analysis with primers specific to the individual sequences of cp-DNA and mtDNA.

Additionally MAS screening was performed using a series of CAPS and SCAR markers which are associated with the R genes controlling resistance to various pathogens: (1) for viruses PVX and PVY – the markers CP60/DdeI₃₅₀, GP122/EcoRV₄₀₆ and RYSC3₃₂₀, closely linked with genes *Rx1*, *Ry-f_{sto}* and *Ry_{adg}*, respectively; (2) the marker NL-25₁₄₀₀ linked with gene *Sen1*, controlling resistance to potato wart *Synchytrium endobioticum*, pathotype 1; (3) the markers TG689, 239E4left/*Alu* I and *Gro1-4* associated with genes *H1* and *Gro1-4* involved in the control of resistance to golden potato nematode *Globodera rostochiensis*, pathotype Ro1.

On the basis of analysis of polymorphism of 14 nSSR loci 118 cultivars from VIR collection were genotyped. It was shown that only three primer pairs were enough to distinguish all the studied cultivars.

The cultivars of the three main periods of potato breeding were distinguished by the level of polymorphism of nSSR loci, cytoplasmic types' frequencies and by allele frequencies of R genes controlling resistance to various diseases.

In the future, the obtained information allows creating a system of identification and registration of potato cultivars and may be required in the certification of seed potatoes, as well as in genebanks preserving the diversity of cultivated plants.

АНАЛИЗ СЕЛЕКЦИОННОГО МАТЕРИАЛА РЫЖИКА ПОСЕВНОГО (*CAMELINA SATIVA* (L.) CRANTZ) С ПОМОЩЬЮ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ

Г.Я. Баер, Ю.Н. Бойчук, Я.В. Пирко, В.И. Корховой, А.И. Емец

Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины

04123, Киев, ул. Осиповского 2а, e-mail: galinabayer@mail.ru

Интерес к биотопливу побудил исследователей критически оценить альтернативные источники, в том числе и растительные, для производства биотоплива. По мнению многих экспертов, одной из наиболее перспективных культур является рыжик посевной – (*Camelina sativa* (L.) Crantz) в связи с неприхотливостью к условиям выращивания. Более того, свойства биодизеля из масла рыжика уже хорошо описаны, первые испытания топлива в двигателях получили многообещающие результаты. Многочисленные факторы, включающие жесткую рыночную конкуренцию, глобальные климатические изменения, ускорение изменения патогенного комплекса и его расового состава требуют от селекционера все большей интенсификации селекционного процесса с получением предсказуемых результатов. Для достижения этой цели все чаще в последние годы селекционерами используется такой мощный инструмент как метод молекулярных маркеров. Несмотря на значительный биоэнергетический потенциал рыжика посевного, на сегодняшний день количество работ по молекулярно-генетическому анализу представителей рода *Camelina* невелико. Поэтому, на первом этапе, целью нашей работы было провести анализ генетического разнообразия образцов *C. sativa* коллекции Национального ботанического сада им. Н.Н. Гришко для выявления взаимосвязей между молекулярными маркерами и хозяйственно-ценными признаками.

В результате проведенного ISSR анализа было отмечено, что использованные праймеры имеют выраженные дифференцирующие свойства. На основе вариабельности межмикросателитных последовательностей в исследованных сортообразцах определена степень генетических различий и построена дендрограмма. Полученные результаты могут быть использованы в селекционных программах, для генетической идентификации сортов, защиты авторских прав и для контроля над распространением перспективного селекционного материала.

ANALYSIS OF BREEDING MATERIAL OF FALSE FLAX (*CAMELINA SATIVA* (L.) CRANTZ) BY MOLECULAR MARKERS

G.Ya. Baer, Y.N. Boychuk, Ya.V. Pirko, V.I. Korkhovoy, A.I. Yemets
Institute of Food Biotechnology and Genomics NAS of Ukraine
04123, Ukraine, Kiev, Osipovskogo Str., 2a, e-mail: galinabayer@mail.ru

Interest in biofuels has prompted researchers to critically evaluate alternative sources, including plant for the production of biofuels. According to many experts, one of the most promising crops is false flax (*Camelina sativa* (L.) Crantz) in relation to its unpretentious to growing conditions. Moreover, the properties of biodiesel from camelina oil has been well described, the first tests of fuel in engines have shown promising results. Numerous factors, including fierce market competition, global climate change, the acceleration changes pathogenic complex and its racial composition require the breeder to increasing intensification of the selection process to obtain predictable results. To achieve this, increasingly in recent years, breeders use such a powerful tool as a method of molecular markers. Despite of significant bioenergetic potential of false flax, today the number of works on the molecular genetic analysis of the genus *Camelina* is small. Therefore, at the first stage, the aim of our work was to analyze the genetic diversity of *C. sativa* samples from the collection of M.M. Gryshko National Botanic Garden to identify relationships between molecular markers and economically valuable traits.

As the result of ISSR analysis it has been noted that the primers used are expressed by the differentiating properties. On the basis of variability between microsatellite sequences in the studied accessions extent of genetic variation has been defined and the dendrogram constructed. The results can be used in breeding programs, for genetic identification of varieties, copyright protection and to control the spread of promising breeding material.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ГЕНОТИПОВ ИСТОРИЧЕСКИХ СОРТОВ *PAEONIA*: ДОКУМЕНТИРОВАНИЕ И СОХРАНЕНИЕ БОТАНИЧЕСКИХ КОЛЛЕКЦИЙ

А.Б. Власова¹, Д.С. Миченер², А.Н. Юхимук¹, В.В. Гайшун¹,
Е.В. Спиридович¹, И.К. Володько¹, Р.Е. Гриси², В.В. Титок¹

¹ГНУ «Центральный ботанический сад Национальной академии наук
Беларуси»

Беларусь, Минск, e-mail: nastassia_vlasova@yahoo.com

²Мэтай Ботанический сад и Николс Дендрарий Мичиганского
университета,

США, Анн-Арбор, e-mail: michener@umich.edu

Род *Paeonia* (семейство *Paeoniaceae*) включает более 30 видов древесных и травянистых растений, распространенных в Северном полушарии (Stern 1946; Pan 1979; Tzanoudakis 1983; Pei 1993), обладающих большим декоративным и лекарственным значением, что определяет высокий интерес к культуре, ее селекции и широкую представленность в коллекциях ботанических садов. Третья часть секции *Paeonia* это редкие и эндемичные виды. Многие сорта принадлежат к *Paeonia lactiflora* Pall.; ряд сортов является результатом межвидовой и межсекционной гибридизации. Поскольку многие вопросы таксономии и филогенетики культурного пиона остаются невыясненными, геномная идентификация сортов и видов *P. lactiflora*, направленная на дифференциацию генотипов и сохранение ботанических коллекций имеет большое значение.

Коллекция рода *Paeonia* Центрального ботанического сада НАН Беларуси (ЦБС) включает более 320 генотипов (в том числе сортов советской селекции и редких видов рода); Мэтай Ботанический сад и Николс Дендрарий Мичиганского университета (MBG NA) поддерживает более 250 стародавних сортов американской и европейской селекции, сорта китайской селекции, включая древовидные пионы. Коллекции пионов MBG NA и ЦБС являются ценным генофондом и основой для эффективного исследования генетического разнообразия, решении вопросов происхождения [<http://mbgna.umich.edu/peony/>; <http://hbc.bas-net.by/bcb/eng/>]. Проект направленный на идентификацию и дифференциацию генотипов *P. lactiflora* из коллекций MBG NA и ЦБС на основе молекулярных маркеров для сохранения, оптимального поддержания коллекций, воспроизводства и обмена сертифицированным растительным материалом был инициирован учреждениями. Разработана молекулярная система маркеров для эффективной дифференциации 54 генотипов из коллекций MBG NA и ЦБС на меж- и внутривидовом уровне на основе RAPD, ISSR, SRAP и SSR маркеров, оценено генетическое разнообразие исследованных генотипов, генетическое расстояние между ними, проведен кластерный анализ в соответствии с морфологическими особенностями сортов.

GENETIC DIFFERENTIATION OF THE GENOTYPES OF HISTORIC CULTIVARS OF *PAEONIA*: DOCUMENTATION AND CONSERVATION OF THE BOTANIC COLLECTIONS

Nastassia B. Vlasava¹, David C. Michener², Andrey N. Yukhimuk¹,
Valentina V. Gaishun¹, Elena V. Spiridovich¹, Ivan K. Volodko¹, Robert E.
Grese², Vladimir V. Titok¹

¹ The Central Botanical Gardens of the National Academy of Sciences of
Belarus

Belarus, Minsk, e-mail: nastassia_vlasova@yahoo.com

² Matthaei Botanical Garden and Nichols Arboretum of the University of
Michigan

USA, Ann Arbor, e-mail: michener@umich.edu

Paeonia (family *Paeoniaceae*) comprises above 30 species of shrubs and perennial herbs distributed widely in the northern hemisphere (Stern, 1946; Pan, 1979; Tzanoudakis, 1983; Pei, 1993) and possess great ornamental and medicinal value, which is a reason for the high interest in culture, breeding and wide representation in collections of botanical gardens. Section *Paeonia* contains one-third rare and endemic species. Many cultivars belong to *Paeonia lactiflora* Pall.; there is great diversity of interspecific and intersectional hybrids. As many points of taxonomy and phylogenetics of cultivated *Paeonia* are still unclear, genetic fingerprinting of the cultivars and species aimed at differentiation and conservation of the botanical collections are of high importance.

Paeonia collections of the Central Botanical Gardens NAS of Belarus (CBG) comprises more than 320 genotypes (including cultivars of Soviet selection and endangered *Paeonia* species); Matthaei Botanical Gardens and Nichols Arboretum of the University of Michigan (MBGNA) maintains more than 250 cultivars of American and European selection, Chinese origin, tree peonies. Databases of the collections of peonies of MBGNA and CBG are a valuable basis for effective genetic diversity investigation and resolving progeny issues of the genotypes [<http://mbgna.umich.edu/peony/>; <http://hbc.bas-net.by/bcb/eng/>].

The project aimed at identification and differentiation of genotypes of *Paeonia* spp. of the collections of MBGNA and CBG on the basis of molecular markers for conservation, optimal maintaining of the collection, reproduction and initiating exchange of the plant material. The development of effective molecular marker systems for genotyping of 54 accessions of the collections of MBGNA and CBG on the inter- and intraspecific level was conducted on the basis of RAPD, ISSR, SRAP and SSR markers. Preliminary results on genetic diversity of the collections, genetic distance between genotypes, its grouping according the set of genetic characteristics and features of the cultivars (type and color of flowers, season, year of creation, originator) was obtained. The data could be useful for passportization of collections, solving of controversial issues in relationships/origin of the cultivars, and exchange of the certified material.

ПОЛИМОРФИЗМ ISSR И SSR МАРКЕРОВ У ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *ALLIUM* L.

А.С. Домблидес, Е.А. Домблидес, В.С. Романов, Л.Ю. Кан, Н.И. Тимин, А.Ф. Агафонов, Т.С. Науменко

ГНУ ВНИИ селекции и семеноводства овощных культур РАСХН
143080, Россия, Московская обл., Одинцовский р-н, п. ВНИИССОК,
ул. Селекционная 14, e-mail: arthurdome@inbox.ru

Род *Allium* L. насчитывает около 750 видов растений и является огромным генетическим потенциалом для интродукции, переноса полезных генов, селекции на качество и устойчивость для различных культурных видов луков. ДНК типирование видов, сортов и различных селекционных форм определяет дальнейший успех селекционной работы в сфере контролируемого поиска генисточников и отдельных локусов в популяциях.

Исследование было проведено на следующих видах: *Allium altaicum* Pall, *Allium fistulosum* L., *Allium subhirsutum*, *Allium obliquum* L. *Allium polyphyllum* Kar. & Kir, *Allium hymenorhizum* Ledeb, *Allium nutans* L., *Allium angulosum* L., *Allium schoenoprasum* L., *Allium ramosum* L., *Allium cepa* L. ISSR и SSR маркеры были использованы для разделения видов и сортов. 8 праймеров для амплификации ISSR продуктов и 8 пар праймеров для амплификации SSR локусов были использованы для разделения сортов лука репчатого (*A. cepa*) и тестирования на других видах. Генетическое различие между генотипами определяли на основе отсутствия или присутствия локуса и считали матрицу, применяя коэффициент Jaccard. На основе матрицы была построена дендрограмма методом UPGMA, отражающая генетические взаимоотношения между взятыми образцами. Высокий уровень полиморфизма был обнаружен среди видов лука, который составлял 19,1% схожести. В отдельном кластере, который объединял сорта лука репчатого (*A. cepa*) степень схожести составила от 74,9% до 86,8%. В первом большом подкластере расположились виды подрода *Cepa* (*A. altaicum*, *A. fistulosum*, *A. schoenoprasum*), отдельные виды образовывали свои отдельные ветви дендрограммы, куда входили представители подродов *Rhizirideum*, *Polyprason*, *Butomissa*, такие виды как *A. nutans*, *A. obliquum*, *A. ramosum* соответственно. В некоторых случаях были обнаружены различия среди образцов внутри одного вида, что было отмечено у форм *A. schoenoprasum* и у форм *A. altaicum*. Подобранный набор маркеров также позволил доказать гибридное происхождение форм, полученных в результате скрещивания видов лука слизуна (*A. nutans*) и лука репчатого (*A. cepa*). Полученные межвидовые гибриды генетически отличались между собой по ДНК маркерам.

POLYMORPHISM OF ISSR AND SSR MARKERS IN ACCESSIONS OF *ALLIUM* GENUS

A.S. Domblides, E.A. Domblides, V.S. Romanov, L.Yu. Kan, N.I. Timin, A.F. Agafonov, T.S. Naumenko

All-Russian Research Institute of Vegetable Breeding and Seed Production
143080, Russia, Moscow district, Odintsovo region, Selectionnaya st. 14,
VNISSOK, e-mail: *arthurdom@inbox.ru*

Genus *Allium* L. consists of over 750 species and can serve as large genetic resources for introduction and important gene transferring into cultivated varieties.

DNA profiling is a powerful tool to make the breeding process controlled and enables to seek for genetic loci of interest in plant population.

The following *Allium* species were taken for this study: *Allium altaicum* Pall, *Allium fistulosum* L., *Allium subhirsutum*, *Allium obliquum* L. *Allium polyphyllum* Kar. & Kir, *Allium hymenorhizum* Ledeb, *Allium nutans* L., *Allium angulosum* L., *Allium schoenoprasum* L., *Allium ramosum* L., *Allium cepa* L.

ISSRs and SSRs markers were used to discriminate the species and onion cultivars.

Eight ISSR primers and eight pairs of primers for amplification of SSR loci were selected for plant classification.

The genetic similarity between accessions was calculated where presence or absence of locus was examined to construct the matrix on the basis of Jaccard's coefficient. The UPGMA dendrogram depicting the genetic relationship between accessions was drawn.

High level of variation was found among *Allium* species accessions, where the index of similarity was 19.1. The cluster of onion accessions (*A. cepa*) grouped all onion cultivars, where index of similarity varied from 74,9% to 86,8%. A large cluster combined the species belonging to *Cepa* subgenus *Allium altaicum*, *Allium fistulosum*, *Allium schoenoprasum*, whereas other species formed their own branches of deprogram corresponding to subgenera *Rhizirideum*, *Polyprason*, *Butomissa* including *Allium nutans*, *Allium obliquum*, *Allium ramosum* respectively.

The genetic differences were also observed among accessions of the same species as observed in *A. schoenoprasum* and *Allium altaicum*.

This set of markers was also very suitable for verification of true hybrids obtained by interspecific crossing between *A. nutans* and *Allium cepa*. The genetic differences within hybrid progeny were also observed.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ТИПА ЦИТОПЛАЗМЫ У ОБРАЗЦОВ СЕМЕЙСТВА КАПУСТНЫЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЦР

Е.А. Домблидес, А.С. Домблидес, Т.В. Заячковская, Л.Л. Бондарева

ГНУ ВНИИ селекции и семеноводства овощных культур РАСХН

143080, Россия, М.о., Одинцовский р-н, п. ВНИИССОК, ул.Селекционная

14, e-mail: Edomblides@mail.ru

Классификация основных типов цитоплазмы, определяющих мужскую стерильность важнейших культивируемых видов растений семейства Капустные (*Brassicaceae* Burnett.), была предложена Т. Shiga в 1980. ЦМС-формы относящиеся к определенному типу стерильности, характеризуются своим типом мтДНК и системой ядерного генетического контроля. Большинство митохондриальных генов, обуславливающих ЦМС, имеет химерную природу и содержит новые открытые рамки считывания, такие как *orf222*, *orf224*, *orf138*, *orf263*, характерные для разных типов. Изучение нуклеотидной последовательности этих генов/локусов, а также их наличие и расположение в мтДНК позволило дифференцировать различные типы цитоплазмы с использованием молекулярных маркеров. Проанализировав литературные источники, нами было отобрано 23 пары праймеров, и проведено исследование по определению типа цитоплазмы имеющихся в коллекции ГНУ ВНИИССОК стерильных растений семейства *Brassicaceae* Burnett. с использованием стандартной и мультиплексной ПЦР. Для исследования были взяты фертильные и стерильные растения капусты белокочанной, брокколи, капусты пекинской, дайкона и редиса. Отобранные праймеры позволяли идентифицировать основные типы цитоплазмы: *Ogura*, *Ogu-NWSUAF*, *nap*, *pol*, *cam*, *rad*, *tour/jun*. В результате проведенной работы был идентифицирован тип цитоплазмы *Ogura* у стерильных образцов капусты белокочанной, брокколи, дайкона, редиса и тип *Ogu-NWSUAF* у стерильных образцов капусты пекинской с использованием ПЦР. У фертильных образцов капусты пекинской был идентифицирован тип цитоплазмы *cam*, а у фертильных образцов дайкона и редиса обнаруживался тип цитоплазмы нормального редиса *rad*. Расшифровка последовательности продукта 788 п.н., полученного с праймерами *Orf138-F2* и *OrfB-R1* у образцов редиса, дайкона, капусты белокочанной и капусты пекинской подтвердила наличие в нем участка 417 п.н. на 100% гомологичного с митохондриальным геном *orf138* – типа А (всего выделяют 9 типов гена *orf138* от А до I), причем этот продукт был абсолютно идентичен у всех изученных образцов, несмотря на различное происхождение их стерильности. При проведении мультиплексной ПЦР с тремя парами праймеров (P11 и P12, P21 и P22, P21 и P32) у стерильного образца капусты пекинской присутствовало сразу два продукта размером 465 п.н. и 1102 п.н., что соответствовало типу стерильности *Ogu-NWSUAF*, описанному ранее на рапсе. Расшифровка нуклеотидной последовательности этих продуктов подтвердила их гомологию с локусами *orf138* и *orf222* соответственно.

PCR-BASED IDENTIFICATION OF CYTOPLASM TYPES IN ACCESSIONS OF *BRASSICACEAE* BURNETT.

E.A. Domblides, A.S. Domblides, T.V. Zayachkovskaya, L.L. Bondareva

All-Russian Research Institute of Vegetable Breeding and Seed Production, 143080, Russia, Moscow district, Odintsovo region, Selectionnaya st. 14, VNISSOK, e-mail: edomblides@mail.ru

Cytoplasm type classification that determines male sterility in cultivated species of Brassicaceae had been proposed by Shiga T. in 1980. CMS-types belonging to defined plant sterility are characterized by particular structure of mitochondrial DNA associated with nuclear genetic control.

Most mitochondrial genes leading to plant sterility have a chimeric nature and contain specific *open reading frame* such as *orf222*, *orf224*, *orf138*, *orf263* that underlie different types of CMS. Sequencing information on these genes/loci and definition of their location made it possible to develop PCR-based technique to identify different types of CMS.

Appropriate 23 primer pairs were selected out of summarized publication data to type the sterile cytoplasm among the Brassicaceae accessions of All-Russian Research Institute of Vegetable Breeding and Seed Production with use of protocols for standard and multiplexing PCR techniques. Fertile and sterile accessions of cabbage, broccoli, Chinese cabbage, daikon and radish were taken for this study. Chosen set of primers was proposed to detect all following types of CMS-cytoplasm: *Ogura*, *Ogu-NWSUAF*, *nap*, *pol*, *cam*, *rad*, *tour/jun*.

According to specified PCR product observed, the *Ogura* type cytoplasm was clearly defined in accessions of cabbage, broccoli, daikon, and radish. Moreover, the *Ogu-NWSUAF* initially described in rapeseed was *only* found in accessions of Chinese cabbage.

There is a *cam* type of cytoplasm observed in fertile accessions of Chinese cabbage and *rad* normal cytoplasm identified in daikon and radish genotypes.

Nucleotide sequence of 788 bp PCR-product amplified with primers Orf138-F2 and OrfB-R1 in radish, daikon, cabbage and Chinese cabbage revealed that 417 bp locus was absolutely identical (100% of similarity) to that of mitochondrial gene *orf138* corresponding to type A according to classification of 9 types from A to I. Only this type of *orf138* locus was found in all accessions in spite of their different origin.

Multiplex PCR analysis with three primer pairs P11, P12; P21, P22; P21, P32, revealed two products 465 bp and 1102 bp that had confirmed the presence of *Ogu-NWSUAF* cytoplasm in Chinese cabbage. Nucleotide sequence of these products had confirmed their identity with *orf138* and *orf222* loci respectively.

ЗНАЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ В СОХРАНЕНИИ ГЕНОФОНДА РЕДКИХ ВИДОВ СИБИРИ

О.В. Дорогина

Центральный сибирский ботанический сад СО РАН
630090, Россия, г. Новосибирск, ул. Золотодолинская, 101,
e-mail: olga-dorogina@yandex.ru

Молекулярно-генетические маркеры (запасные белки и ДНК), преимущества которых заключаются в значительном внутривидовом полиморфизме и независимости от условий произрастания растений, все в большей степени используются исследователями для решения многих задач.

Известно, что у ряда видов, особенно, у близкородственных видов, морфологические диагностические признаки зачастую перекрываются, что затрудняет проведение таксономического анализа. В этом случае достаточно продуктивным является использование молекулярно-генетических маркеров. Поэтому применение запасных белков, а в настоящее время ДНК-маркеров для решения систематических задач, особенно для редких и близкородственных им полиморфных видов, приобретает все большее значение.

Использование электрофоретических спектров запасных глобулинов семян у близкородственных, но трудно идентифицируемых по морфологическим признакам видов из родов *Hedysarum* L. и *Astragalus* L. позволило нам не только изучить внутри- и межпопуляционную изменчивость, но и для некоторых видов выявить видоспецифичные группы.

Изучение генетического потенциала и генетической структуры редких и исчезающих видов и популяций особенно актуально для прогнозирования их устойчивости, как в природных условиях, так и в условиях интродукции. Известно, что для малых популяций характерна потеря генетического разнообразия из-за родственного скрещивания и дрейфа генов, поэтому они более восприимчивы к разрушительным генетическим эффектам. Большая роль здесь отводится анализу изменчивости по запасным белкам и ДНК-маркерам - признакам, не зависящим от условий произрастания.

Например, высокий уровень генетического полиморфизма, выявленный нами для *Hedysarum theinum* Krasnob. (копеечник чайный) - редкого вида сибирской флоры, включенного в Красную книгу Республики Алтай (статус 3 R) свидетельствует об эволюционном потенциале этого вида и широких адаптационных возможностях, которые, однако, могут обрести тенденцию к сокращению.

Полученные результаты по популяционно-генетической структуре *H. theinum* могут быть использованы при выработке соответствующих рекомендаций для сохранения вида в будущем.

В связи с этим наиболее важными при решении данных задач являются исследования по поиску путей адаптации, а также критериев, характеризующих устойчивые природные и интродукционные популяции.

THE VALUE OF MOLECULAR-GENETIC MARKERS IN THE CONSERVATION OF THE GENE POOL OF RARE SPECIES OF SIBERIA

O.V. Dorogina

Central Siberian Botanical Garden, SB RAS

Russia, 630090, Novosibirsk, Zolotodolinskaya Street, 101,

e-mail: *olga-dorogina@yandex.ru*

Molecular-genetic markers (storage proteins and DNA), the advantages of which are significant intraspecific polymorphism and independence from plants growing conditions, increasingly used by researchers to solve problems. It is known that in a number of species, especially closely related ones, morphological diagnostic characters often overlap, making it difficult to conduct taxonomic analysis. In this case, quite effective is the use of molecular genetic markers.

Therefore, the use of storage proteins, for the solution of systemic problems, especially for rare and closely related to them polymorphic species, and currently DNA markers is becoming increasingly important.

Using of seeds storage globulins electrophoretic spectra for closely related, but hardly identified by morphological features of species from genera *Hedysarum* L. and *Astragalus* L. allowed us not only to study the intra- and inter-population variability, but for some species to identify species-specific groups. The study of the genetic potential and the genetic structure of rare and endangered species and populations is especially important for the prediction of their stability in natural and introduction conditions. It is known that small populations characterized by the loss of genetic diversity due to inbreeding and gene drift, so they are more susceptible to the damaging genetic effects. A great role is given to the analysis of storage proteins and DNA-markers variability - characteristics, independent of external conditions.

For example, high level of genetic polymorphism, revealed by us for *Hedysarum theinum* Krasnob. - a rare species of Siberian flora included in the Red book of the Altai Republic (status 3 R) indicates the evolutionary potential of this type and its wide adaptation opportunities, which, however, can have a tendency to decrease.

The results of *H. theinum* population-genetic structure can be used in recommendations for species conservation in future.

In this regard, the most important for solving these tasks are researches of the adaptation ways, as well as finding criteria for defining sustainable natural and introduction populations.

ЛОКУСЫ ЗАПАСНЫХ БЕЛКОВ КАК ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ РАЗНООБРАЗИЯ *AEGILOPS BIUNCIALIS* VIS.

Н.А. Козуб^{1,2}, И.А. Созинов¹, А.А. Созинов^{1,2}

¹Институт защиты растений НААН
Украина, Киев, e-mail: *sial@i.com.ua*

²ГУ "Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины"
Украина, Киев,

Популяции диких сородичей пшеницы являются потенциальным источником новых генов устойчивости к болезням и вредителям, абиотическим факторам, генов, определяющих качество зерна и другие признаки. Тетраплоидный вид *Aegilops biuncialis* Vis. – один из немногих видов эгилопсов, произрастающих в Крыму. Его геномная формула – UUM^bM^b ($2n=28$).

Целью данной работы являлось изучение разнообразия популяций *Ae. biuncialis* Vis. Для этого в качестве генетических маркеров были использованы локусы запасных белков, кодирующие глиадины и высокомолекулярные субъединицы глютеинов, которые являются высокополиморфными у мягкой пшеницы и ее сородичей.

Материалом исследования служили выборки из популяций *Ae. biuncialis* Крыма (Кара-Даг, Эчки-Даг, мыс Мартьян, Севастополь, Береговое, Песчаное, Бахчисарайского р-на). Ряд образцов были размножены на опытном участке (Киевская область), проведены скрещивания образцов, различающихся по спектрам запасных белков.

С помощью гибридологического анализа идентифицированы некоторые аллели глиадинкодирующих локусов *Gli-U1* и *Gli-M^b1* и локусов HMW субъединиц глютеинов *Glu-U1* и *Glu-M^b1* у образцов *Ae. biuncialis*, происходящих из Крыма, и составлен их каталог, который был дополнен в результате анализа выборок из популяций. Среди выборок из проанализированных популяций обнаружено значительное разнообразие аллелей по маркерным локусам (20 по *Gli-U1*, 13 по *Gli-M^b1*, 9 по *Glu-U1*, 16 по *Glu-M^b1*). Средний показатель генного разнообразия по Nei у суммарной выборки популяций Крыма достаточно высок – 0,714. Уровень внутривидового разнообразия значительно превышает уровень межвидовой вариации, о чем свидетельствует коэффициент генетической дифференциации по Nei (среднее значение для групп выборок 0,213).

Среди размноженных образцов *Ae. biuncialis* проведен отбор стандартов аллелей локусов *Gli-U1*, *Gli-M^b1*, *Glu-U1*, *Glu-M^b1*, 15 образцов зарегистрированы в Национальном центре генетических ресурсов растений Украины (НЦГРРУ).

Таким образом, запасные белки могут быть использованы как генетические маркеры для характеристики разнообразия *Ae. biuncialis in situ* и его сохранения *ex situ*.

STORAGE PROTEIN LOCI AS GENETIC MARKERS FOR STUDYING DIVERSITY OF *AEGILOPS BIUNCIALIS* VIS.

N.A. Kozub^{1,2}, I.A. Sozinov¹, A.A. Sozinov^{1,2}

¹Institute of Plant Protection NAAS

Ukraine, Kyiv, e-mail: sial@i.com.ua

²Institute of Food Biotechnology and Genomics NAN of Ukraine
Ukraine, Kyiv

Populations of wild relatives of wheat are a potential source of new genes for resistance to diseases and pests, abiotic factors, genes determining grain quality and other traits. The tetraploid species *Aegilops biuncialis* Vis. is one of few *Aegilops* species growing in the Crimea. Its genomic formula is UUM^bM^b (2n=28).

The objective of this investigation was to study diversity of *Ae. biuncialis* using storage protein loci encoding gliadins and high-molecular glutenin subunits, which are highly polymorphic in common wheat and its relatives.

Samples from *Ae. biuncialis* Crimean populations of (Kara-Dag, Echki-Dag, the cape Martian, Sevastopol, Beregovoye, Peshchanoye of Bakhchisarai region) served as the material for the investigations. A number of samples were propagated on the experimental plot (Kyiv region), crosses between samples differing in storage protein patterns were made.

Using hybridological analysis some alleles at the gliadin loci *Gli-U1* and *Gli-M^b1* and HMW glutenin subunit loci *Glu-U1* and *Glu-M^b1* were identified in Crimean *Ae. biuncialis* accessions. The catalogue of protein patterns encoded by these alleles was compiled, which was further supplemented based on the results of analysis of samples from the populations. Among the samples from the populations analyzed wide diversity in alleles at the marker loci was revealed (20 at *Gli-U1*, 13 at *Gli-M^b1*, 9 at *Glu-U1*, 16 at *Glu-M^b1*). Average Nei's gene diversity in the total sample from Crimean populations is rather high, 0.714. The level of diversity within populations significantly exceeds the level of diversity between populations, which is indicated by the coefficient of gene differentiation according to Nei (the average estimate for groups of samples is 0.213).

Standards of alleles at the loci *Gli-U1*, *Gli-M^b1*, *Glu-U1*, *Glu-M^b1* were selected among the propagated samples of *Ae. biuncialis*; 15 accessions were registered in the National Center of Plant Genetic Resources of Ukraine (NCPGRU).

Thus, storage proteins can be used as genetic markers for characterization of diversity of *Ae. biuncialis in situ* and its conservation *ex situ*.

ОТБОР СОМАКЛОНАЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ БЕРЕЗЫ ПО МОРФОЛОГИЧЕСКИМ ПРИЗНАКАМ И ДАННЫМ RAPD-АНАЛИЗА

А.В. Константинов, С.В. Пантелеев, Л.А. Богинская

Государственное научное учреждение Институт леса НАН Беларуси
246001, Беларусь, г. Гомель, ул. Пролетарская, 71,
e-mail: avkonstantinof@mail.ru

Создание исходного материала для селекции требует расширения генетического разнообразия, дающего возможность повышения адаптивности отдельных сортообразцов к меняющимся условиям среды и устойчивости к абиотическим стрессам. Потенциальным источником генетической изменчивости является использование методов фитобиотехнологии. Пролиферация и неорганизованный рост соматических клеток *in vitro* сопровождается цитогенетическими абберациями, реализующимися в растениях-регенерантах и передающимися потомству в виде морфофизиологических и биохимических изменений.

Целью работы было изучение соматической вариабельности регенерантов березы повислой и гибридной путем отбора линий по морфометрическим показателям и их последующего молекулярно-генетического анализа. Материалом для работы послужили 104 линии растений полученные на основе культур *in vitro* клонов плюсового генотипа березы повислой (клон № 6-161/3) и генотипа гибридного происхождения (клон № 52-84/8), полученных в результате непрямо́й регенерации в каллусных культурах инициированных из тканей листовых эксплантов.

По результатам изучения интенсивности органогенеза и морфологических отклонений отобрано по 10 линий для каждого изучаемого клона. Изучение полученных соматических клонов на протяжении 6 пассажей позволило установить, что они отличаются по характеру роста междоузлий, интенсивности ветвления и размера листовых пластинок. Кроме того, отметили неоднородность линий по интенсивности ризогенеза (от 30 до 95%).

Подтверждение соматической (наследственной) природы выявленной изменчивости проводили методом RAPD-анализа. Был выбран набор из пяти праймеров (UBC-106, UBC-154, UBC-203, UBC-254, UBC-268), ранее использовавшихся для анализа полиморфизма видов *Betula* spp.

В результате анализа в образцах линий клона № 52-84/8 обнаружены нарушения, связанные с изменением RAPD-спектров по праймерам UBC-106 (линии hSC 6 и 7) и UBC-254 (линии hSC 1, 4 и 8). При изучении растений линий клона № 6-161/3 по праймеру UBC-268 изменения ПЦР-продукта отметили у растений линий pSC 1 – pSC 3, UBC-154– линии pSC 5. По праймеру UBC-203 изменчивости среди линий регенерантов изученных клонов выявлено не было.

THE SELECTION OF BIRCH SOMACLONAL VARIETIES ACCORDING TO MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS AND RAPD-ANALYSIS

A.V. Konstantinov, S.V. Pantelev, L.A. Boginskaya

Forest Institute of the National Academy of Sciences of Belarus

BY-246001, Belarus, Gomel, Proletarskaya Str. 71,

e-mail: *avkonstantinof@mail.ru*

The generation of an initial material for breeding requires enrichment of genetic diversity, giving the possibility to select the individuals with increased adaptability to changing environmental conditions and resistance to abiotic stresses. Potential source of genetic variation is the use of plant biotechnology methods. Proliferation and disorganized growth of somatic cells *in vitro* is accompanied by heredity apparatus changes, which declare themselves in regenerated plants and are transmitted to posterity in the form of genetic, morphological and biochemical changes.

Hence the objective of this study was the investigation of somaclonal variation on silver birch plants and birch interspecific hybrid plants regenerated *in vitro*. The technical approach of the study consists in the selection of the shoot cultures (lines) with altered morphology and their subsequent RAPD-analysis. 104 lines derived from silver birch plus-tree (clone № 6-161/3) and birch interspecific hybrid (clone № 52-84/8) were used in the research. The *in vitro* cultures mentioned were obtained by regeneration from leaf callus cultures.

After the estimation of organogenesis intensity, growth rate and morphological features during six cycles of cutting in aseptic conditions 10 shoot cultures were selected for each of the studied clones. The differences in the characteristics of internodes growth, branching intensity, size of the leaf blades and frequency of spontaneous root formation (from 30 to 95%) were observed.

In order to confirm that selected lines bring changes in their DNA sequences RAPD-analysis were conducted. The set of five primers previously used for the polymorphism analysis on *Betula* species (UBC-106, UBC-154, UBC-203, UBC-254, UBC-268) was chosen.

In the samples derived from clone № 52-84/8 shoot cultures were detected the changes in RAPD-spectra over primers UBC-106 (hSC cultures 6 and 7) and UBC-254 (hSC cultures 1, 4 and 8). In the samples derived from clone №6-161/3 shoot cultures were detected the changes in RAPD-spectra over primers UBC-268 (pSC1–pSC3 cultures), UBC-154 (pSC 5 culture). In case of utilization of UBC-203 primer any variation in RAPD-spectra were not identified.

АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ПОПУЛЯЦИЙ РЕДКИХ И ИСЧЕЗАЮЩИХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ ВОЛГОГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ

А.А. Кочумова¹, Н.В. Хадеева¹, С.В. Горюнова¹, О.И. Коротков²,
А.М. Кудрявцев¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук
119991, Россия, ГСП-1 Москва, ул. Губкина, д.3

²ГУ Волгоградский региональный ботанический сад
400007, Россия, Волгоград, пос. Metallургов, 68, а/я 23,
e-mail: aichka89@mail.ru

Для изучения генетического разнообразия 56 образцов *Bellevalia sarmatica*, 50 образцов *Matthiola fragrans*, 95 образцов *Allium regelianum* - растений, занесенных в Красную Книгу РФ - был проведен AFLP –анализ. Все образцы были собраны в ходе экспедиций ГУ «Волгоградский региональный Ботанический сад» на территории Волгоградской области. Для проведения AFLP-анализа образцов *Bellevalia sarmatica* было использовано 3 комбинации праймеров, *Matthiola fragrans* – 2, *Allium regelianum* – 4. Средний процент полиморфных локусов составил 91,7 %- для *Bellevalia sarmatica*, 55,2% - для *Matthiola fragrans*, 84,4 % - для *Allium regelianum*.

Было показано, что популяции *Bellevalia sarmatica* разделяются на 3 группы. Наиболее обособлены популяции Кумылженского района, образующие отдельную группу. Ко второй группе относятся популяции Калачевского и Суровикинского районов, к третьей- популяции Серафимовичского и Клетского районов. Объединение популяций двух районов в одну группу, по-видимому, возникает из-за того, что в прошлом эти популяции были едины, а со временем произошло их частичное обособление, обусловленное, вероятно, антропогенным влиянием на среду обитания этих видов. Популяции *Matthiola fragrans* разделились на 3 группы соответственно их географическому положению. Популяции *Allium regelianum* более однородны, их можно разделить на три группы, соответственно их географическому положению, но границы между группами не четкие. Интересно, что генетическая дифференциация популяций внутри отдельных районов обусловлена различными причинами. Дифференциация популяций Серафимовичского района связана с естественными причинами, так в разные группы попали популяции, расположенные на противоположных берегах реки Дон. Дифференциация популяций Николаевского р-на связана, по всей видимости, с влиянием человека. Здесь в отдельные группы попали популяции, разделенные населенным пунктом и массивом распаханых земель.

Каждый из трех изученных видов растений обладает различным уровнем как внутри – так и межпопуляционной изменчивости и индивидуальной популяционной структурой. Эти показатели необходимо учитывать при разработке программ по их сохранению.

ANALYSIS OF GENETIC DIVERSITY IN THE POPULATIONS OF RARE AND ENDANGERED PLANT SPECIES OF VOLGOGRAD REGION

A.A. Kochumova¹, N.V. Khadeeva¹, S.V. Goryunova¹, O.I. Korotkov², A.M. Kudryavtsev¹.

¹Vavilov Institute of General Genetics Russian Academy of Sciences
119333, Russia, Moscow, Gubkina Str. 3

²Volgograd Regional Botanical Garden
400007, Russia, Volgograd, pos. Metallurgists, 68, PO Box 23,
e-mail: aichka89@mail.ru

We used AFLP profiling to analyze genetic diversity of 56 samples of *Bellevalia sarmatica*, 50 samples of *Matthiola fragrans* and 95 samples of *Allium regelianum*. All investigated species are rare and endangered and listed in the Red Book of the Russian Federation. All samples were collected during expedition of the Volgograd Regional Botanical Garden in Volgograd region. To carry out the AFLP profiling of *Bellevalia sarmatica* we used 3 primer combinations, *Matthiola fragrans* - 2 primer combinations, *Allium regelianum* – 4 primer combinations. The average percentage of polymorphic loci was 91,7% for *Bellevalia sarmatica*, 55,2% – for *Matthiola fragrans* and 84,4% – for *Allium regelianum*.

It was shown that populations of *Bellevalia sarmatica* are divided into 3 groups. Populations of Kumylzhenskaya area are more isolated and form separate group. Populations of Kalach and Surovikino area form the second group; Seraphimovich and Kletskaya area form the third group. Maybe, the cause of association of populations from two different areas is that this populations were united in past and then they slowly separated due to human impact on their habitat. Populations of *Matthiola fragrans* are divided into 3 groups according to their geographical location. Populations of the *Allium regelianum* are more homogeneous, they divided into 3 groups according to their geographical location, but differentiation between groups are not clear. Interestingly that genetic differentiation between populations *Allium regelianum* from the same area is determined by various factors. Differentiation of populations Serafimovich area associated with natural factors, so populations placed on opposite sides of the river Don are divided into separate groups. Likely, differentiation of populations Nikolayev area associated with human impact. Here, populations are divided by populated locality and arable form separate group.

Each of the investigated species has different levels of within- and among-population variability and individual population structure. We need to consider these data when we develop programs for the conservation of these species.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ПОПУЛЯЦИЙ *TULIPA SCHRENKII* REGEL В САРАТОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Т.А. Крицкая, А.А. Крицкий, А.С. Кашин

Учебно-научный центр «Ботанический сад» Саратовского государственного университета имени Н.Г. Чернышевского
410010, Россия, г. Саратов, ул. Ак. Навашина, 1,
e-mail: kriczkaya.tatyana@mail.ru

Тюльпан Шренка (*Tulipa schrenkii* Regel, Liliaceae) является высоко декоративным охраняемым видом. На территории Саратовской области *T. schrenkii* имеет тенденцию к сокращению численности.

Цель работы – оценить уровень внутривидового полиморфизма *T. schrenkii* с целью дальнейшего отбора и сохранения растений в генетическом банке.

Материалом для исследования были растения 6 популяций *T. schrenkii* Саратовской области. ДНК исходных образцов выделяли с использованием набора NucleoSpin® Plant II (MACHEREY-NAGEL, Germany) из 20 мг растительного материала в воздушно-сухом состоянии, полученного из молодых вегетирующих листьев дикорастущих тюльпанов. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в амплификаторе Mastercycler gradient (Eppendorf, Germany) с ISSR-праймерами, синтезированными ЗАО «Синтол» («Биоком», Россия). Для ПЦР были использованы наборы реактивов производства «Евроген» (Москва). Все реакции проводились в двукратной повторности. Расчёты генетических расстояний выполняли с помощью программы TFPGA (version 1.3) (Miller, 1997).

При проведении ISSR-анализа протестировали 26 праймеров, из которых для дальнейшего анализа было отобрано 10, обеспечивающих получение достаточного количества чётких полиморфных ампликонов (UBC810, UBC811, UBC816, UBC824, UBC827, UBC836, UBC841, UBC843, UBC845, UBC851). Размер амплифицированных фрагментов варьировал в диапазоне от 50 до 300 п.н. По полученным на основе ISSR-маркеров данным были составлены бинарные матрицы и проведён кластерный анализ методом UPGMA.

Всего в результате ISSR-анализа было получено и проанализировано 102 ДНК-фрагмента. Уровень полиморфизма внутри вида *T. schrenkii* составил в среднем 50,9%. Установлено, что по степени генетической близости исследуемые популяции объединяются в 2 основных кластера: 1 – образцы из Красноармейского, Озинского и Саратовского, 2 – из Балаковского, Пугачёвского и Фёдоровского районов. Образцы кластеризуются в соответствии с приуроченностью районов произрастания исследованных популяций к определённым элементам макрорельефа. Предполагается, что степень генетического сходства и различия обусловлены временем заселения растениями вида указанных территорий после последних трансгрессий Каспийского моря. Корреляция между генетическим полиморфизмом и полиморфизмом окраски венчика цветка в популяциях не обнаружена.

MOLECULAR-GENETIC POLYMORPHISM OF *TULIPA SCHRENKII* REGEL POPULATION IN SARATOV REGION.

T.A. Kritckaia, A.A. Kritckii, A.S. Kashin

Botanical Garden Saratov State University n.a. N.G. Chernyshevsky

410010, Russia, Saratov, e-mail: kriczkaya.tatyana@mail.ru,

kashinas2@yandex.ru

Tulipa schrenkii Regel (Liliaceae) is a highly decorative protected species. *Tulipa schrenkii* tends to deplete in number within the territory of Saratov region.

The work objective is to estimate *T. schrenkii* intraspecific polymorphism level in order to further select and save the plants in the genetics bank.

T. schrenkii populations in 6 Saratov region were studied. Original samples DNA was obtained from 20 mg of air-dry plant material with the help of NucleoSpin® Plant II kit (MACHEREY-NAGEL, Germany), such material being obtained from young vegetating leaves of wild-growing tulips. Polymerase chain reaction (PCR) was held in Mastercycler gradient amplifier (Eppendorf, Germany) using ISSR-primers synthesized by «Sintol» Closed Joint-Stock Company (Biocom, Russia). Reagents kits made by «Eurogen» (Moscow) were used for the PCR. All the reactions were repeated twice. Genetic distances were calculated with the help of TFPGA (version 1.3) program (Miller, 1997).

26 primers were tested under ISSR analysis; 10 of them producing enough clear polymorph amplicons (UBC810, UBC811, UBC816, UBC824, UBC827, UBC836, UBC841, UBC843, UBC845, UBC851) were selected for further analysis. Amplificated fragments size ranged from 50 to 300 base pairs. According to data received from ISSR-markers, binary matrices were composed and UPGMA-method cluster analysis was held.

Total 102 DNA fragments were obtained and analyzed by ISSR analysis. Polymorphism level within the *T. schrenkii* species was 50.9% on the average. It has been discovered that populations under the study can be united into 2 major clusters by genetic proximity: 1 – Krasnoarmeysk, Ozinki, Saratov territories samples; 2 – Balakovo, Pugachev, Fyodorovsky territories. The samples are clustered in accordance with relation between the growing region of the populations studied and particular macrorelief elements. It is supposed that genetic proximity and difference level is determined by the time the plants of the species populated the mentioned territories after the last Caspian Sea overlaps. Correlation between genetic polymorphism and the petals colour polymorphism has not been detected in the populations.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ РАСТЕНИЙ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ (*BETA VULGARIS* L.) СИНТЕТИЧЕСКИМИ *CRY*-ГЕНАМИ

В.В. Курило, А.И. Емец

Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины

04123, Украина, г. Киев, ул.Осиповского, 2а, e-mail: adreatyda@rambler.ru

Сахарная свекла (*Beta vulgaris* L.), наряду с сахарным тростником, занимает ключевое место при производстве сахара, являясь сырьем для 70% его мирового производства. На сегодняшний день около 40 государств вовлечены в ее коммерческое выращивание. К сожалению, посевы этой культуры часто погибают от неблагоприятных условий окружающей среды, различных болезней и поражения вредителями.

Целью нашей работы было получение генетически модифицированных линий сахарной свеклы, экспрессирующие синтетические *cry*-гены, а именно *cry1Ac*, *cry1C* и *cry2A*, и обеспечивающие устойчивость к насекомым-вредителям родов *Lepidoptera* и *Diptera*. Для агробактериальной трансформации использовали супервирулентный штамм *Agrobacterium tumefaciens* LB 4404 и векторные конструкции p1C PRD, p1CST PRD, p2A PRD, p1Ac PRD, содержащие гены *cry1C*, *cry2A* и *cry1Ac*, соответственно, любезно предоставленные проф. И. Альтасааром (Университет Оттавы, Канада). В качестве исходного растительного материала использовали родительскую селекционную линию ММ 1/2 (селекционный опылитель при гетерозисной селекции) сахарной свеклы, любезно предоставленную Институтом биоэнергетических культур и сахарной свеклы НААН Украины.

Генетическую трансформацию сахарной свеклы проводили, используя методику ко-культивирования листовых эксплантов с агробактерией, (Norouzi et al., 2005). В результате были отобраны растения-регенеранты, которые в течение нескольких пассажей росли на селективной среде, содержащей 100 мг/л канамицина. Для установления интеграции генов интереса в геном растений нами был проведен ПЦР-анализ отселектированных линий сахарной свеклы с использованием специфических праймеров к генам *cry1C* и *cry2A*. В результате проведенных исследований было установлено наличие исследуемых генов у трансформированных растений. Кроме этого для подтверждения не только встраивания исследуемых генов в геном растений-трансформантов, но и их эффективной экспрессии было проведено выделение РНК, получение кДНК в реакции обратной транскрипции и амплификация генов *cry1C* и *cry2A*. В результате была подтверждена экспрессия данных генов в исследуемых линиях *B. vulgaris*.

GENETIC TRANSFORMATION OF SUGAR BEET (*BETA VULGARIS* L.) BY SYNTHETIC CRY-GENE

V.V. Kurylo, A.I. Yemets

Institute of Food Biotechnology and Genomics NAS of Ukraine

04123, Ukraine, Kyiv, Osipovskogo Str., 2A, e-mail: adreatyda@rambler.ru

Sugar beet (*Beta vulgaris* L.), as well as sugar cane, has a key role in the production of sugar. It is a raw material for 70% of world production. About 40 states involved in its commercial cultivation today. Unfortunately, this culture crops often die from adverse environmental conditions, various diseases and pests.

The aim of our work was obtaining genetically modified sugar beet lines expressing synthetic *cry*-genes, namely *cry1Ac*, *cry1C* and *cry2A*, which provide resistance to insect genera *Lepidoptera* and *Diptera*. For *Agrobacterium*-mediated transformation a supervirulent *Agrobacterium tumefaciens* strains LB4404 carrying vector constructs p1C PRD, p1CST PRD, p2A PRD, p1Ac PRD containing genes *cry1C*, *cry2A* and *cry1Ac*, respectively, were used. The vectors were kindly provided by Prof. I. Altaaar (University of Ottawa, Canada). A parent breeding line *B. vulgaris* MM 1/2 was kindly provided by the Institute of Bioenergy crops and sugar beet, NAAS of Ukraine as initial plant material.

Genetic transformation of sugar beet was performed using the procedure of co-cultivation of leaf explants with *Agrobacterium* (Norouzi et al., 2005). As a result, regenerated plants survived on a selective medium containing 100 mg/l kanamycin for several passages have been selected. To establish integration of genes of interest into the genome of plants we performed PCR analysis picked up sugar beet lines using specific primers to *cry1C* and *cry2A* genes. It has been established the presence of investigated genes in transgenic plants. Besides, not only for verification of genes insertion into the genome of the studied transformants, but their efficient expression, the RNA isolation, obtaining the complementary DNA in a reverse transcription reaction and *cry1C* and *cry2A* genes amplification were performed. The result confirmed the expression of genes in obtained *B. vulgaris* lines.

LIS-1 КАК МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МАРКЕР ПОТЕНЦИАЛЬНО АДАПТИВНЫХ ГЕНОТИПОВ ЛЬНА (*LINUM USITATISSIMUM* L.)

В.А. Лемеш, Е.В. Гузенко, К.С. Тимофеенко

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси

220072, Беларусь, Минск, Академическая, 27,

e-mail: V.Lemesh@igc.bas-net.by, E.Guzenko@igc.bas-net.by

Лен (*Linum usitatissimum* L.) обладает уникальной особенностью – "пластичностью" генома. У определенных генотипов при воздействии стрессовых факторов окружающей среды (несбалансированность минеральных удобрений N:P:K, специфический температурный режим и др.) в течение роста одного поколения возникают наследственные изменения. У таких растений (генотрофы, некоторые сорта льна-долгунца, льна масличного) возрастает общее содержание ядерной ДНК, число генов, кодирующих рДНК, число копий повторяющихся последовательностей, а также появляется вставка LIS-1 (*Linum Insertion Sequence*). LIS-1 – это последовательность нуклеотидов размером 5,7 kb, которая встраивается в единичной копии в определенный сайт генома льна. Исследования показали, что LIS-1 собирается из коротких последовательностей, разбросанных по всему геному льна. В базе данных *Linum* EST были найдены совпадения по коротким последовательностям данной вставки. В LIS-1 не найдено больших открытых рамок считывания и гомологии с транспозонами или другими мобильными элементами. Данные показывают, что LIS-1 является результатом сложного инсерционного события. Механизмы формирования и функции вставки еще недостаточно изучены, однако LIS-1 является перспективным маркером для выявления форм льна с высокой «пластичностью» и адаптационной способностью генома.

Представлены результаты ПЦР-скрининга 30 сортов, 24 ландрас, 4 линий «escapes». «Escapes» – растения, приспособившиеся к существованию на селективной среде, но не содержащих в своем геноме чужеродной ДНК. Для анализа геномную ДНК выделяли из листьев и тестировали на присутствие LIS-1, используя праймеры 5'-cataaattcagtcctatcgac-3' и 5'-tgtaacagctcggatctaggc-3' (Chen et al., 2009). LIS-1 не обнаружена в ДНК сортов и ландрас, однако, выявлена у двух линий «escapes» (V-1, B-1), при этом в исходных сортах, из которых данные линии были получены, она отсутствовала. Анализ двух поколений «escapes» установил стабильное наследование вставки. Кроме того, ДНК растения, выделившегося из линии B-1 и обладающего устойчивостью к низким температурам (BB-1) также содержала последовательность LIS-1.

Таким образом, генотипы, имеющие вставку LIS-1, заслуживают особого внимания при исследованиях механизмов адаптации к неблагоприятным факторам внешней среды и при селекции новых сортов, устойчивых к абиотическим стрессам.

LIS-1 AS A MOLECULAR MARKER OF POTENTIALLY ADAPTIVE GENOTYPES OF FLAX (*LINUM USITATISSIMUM* L.)

V.A. Lemesh, E.V. Guzenko, K.S. Timofeyenko

Institute of Genetics and Cytology of National Academy of Sciences of Belarus
220072, Belarus, Minsk, Akademicheskaya St., 27,

e-mail: *V.Lemesh@igc.bas-net.by*, *E.Guzenko@igc.bas-net.by*

Flax (*Linum usitatissimum* L.) undergoes heritable genomic changes in response to nutrient stress, which include changes in total amount of nuclear DNA, in ribosomal DNA (rDNA) gene copy number, in repetitive sequence copy number and in appearance of Linum Insertion Sequence 1 (LIS-1). These changes occur during vegetative growth, before gamete production, and can therefore be passed to the next generation. The most characterized genomic change in flax is the appearance of LIS-1 (Chen et al., 2005). LIS-1 is a 5.7 kb sequence that is inserted into a specific single copy target sequence in the “plastic” flax genomes. Both LIS-1 and its target site have been sequenced. LIS-1 contains several short matches with the Linum EST database, and several informatically identified putative miRNAs, but no large open reading frames or homology to transposons or other mobile elements. The data indicate that LIS-1 is assembled or rearranged from short sequences found scattered throughout the genome. LIS-1 sequence is the result of complex insertion event that occurs during the formation of some of the genotrophs, and occurs naturally in flax and linseed varieties (Chen et al., 2005). Although the induction mechanisms and functions of LIS-1 insertion are still insufficiently studied, this sequence represents one of the most efficient molecular markers for finding the flax varieties with high genome plasticity and adaptation capacities.

In these research 30 flax varieties, 24 landrasses and 4 lines of “escapes” were screened. “Escapes” are false transformants, an undesirable effect of transgenesis. “Escapes” are able to survive on the selective medium but do not express the transferred trait and do not contain the T-DNA. The genome DNA isolated from flax leaves was tested for the presence of insertion LIS-1 using PCR with primer pairs 5'-cataaattcagtcctatcgac-3' and 5'-tgtaacagctcggatctaggc-3' (Chen et al., 2009). The LIS-1 sequence is not detected in the varieties and landrasses. LIS-1 is present in two lines of “escapes” (V-1, B-1), but is absent from the original varieties from which the lines were derived. Analysis of two generations of the lines showed inheritance of LIS-1. In addition, the line became tolerant to cold, which led to increased survival rate of seeds in winter. We can assume that “escapes” survivors influenced by many stress factors have increased physiological “mobility” and “flexibility”, expanded the range of genetic variation and can be used for creating forms with a valuable combination of characters. The forms with insertion LIS-1 deserve special attention in further studies of flax adaptation to adverse environmental factors and in breeding of new resistant varieties.

ЭКСПРЕССИЯ ГОМОЛОГОВ ГЕНА AP1 АСТРОВЫХ ВЫЗЫВАЕТ РАННЕЕ ЦВЕТЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ ХРИЗАНТЕМ

О.А. Шульга¹, Т.Ю. Митюшкина², А.В. Щенникова¹, К.Г. Скрыбин¹, С.В. Долгов²

¹Центр «Биоинженерия» РАН

117312, Россия, г. Москва, Проспект 60-летия Октября 7/1,

e-mail: shulga@biengi.ac.ru

Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

142290, Россия, Московская обл., г. Пущино, Проспект Науки 6,

e-mail: mitiouchkina@rambler.ru

Гены MADS семейства играют важную роль в онтогенезе растений, в частности, в регуляции развития цветка. В модельном растении *A. thaliana* ген *AP1* (*APETALA1*), принадлежащий MADS-семейству, определяет идентичность цветковой меристемы и влияет на развитие органов, принадлежащих к первому и второму кругу. Изучение процессов онтогенеза в растениях с мутацией гена *AP1* показало консервативность ключевых моментов генетической регуляции у растений разных видов с одновременным наличием особенностей проявления действия отдельных генов.

Ранее нами были клонированы кДНК генов, гомологичных *APETALA1*, из представителей астровых, одного из крупнейших семейств цветковых растений – подсолнечника (*Helianthus annuus*) и хризантемы (*Chrysanthemum morifolium*). Мы предположили, что эти гены (*CDM111*, *HAM75*, *HAM92*) участвуют в дифференцировке околоцветника, плодолистиков и определяют время цветения. Для того чтобы определить роль факторов *CDM111*, *HAM75* и *HAM92* непосредственно в растениях хризантемы, нами было получено 80 трансгенных линий *C. morifolium* с конститутивной экспрессией соответствующих генов астровых. Во всех растениях были подтверждены наличие трансгена и его экспрессия. Так как хризантема является растением короткого дня, влияние экспрессии введенных генов на развитие трансгенных растений хризантемы изучалось как в условиях индукции цветения (короткий день), так и без цветения (длинный день). Было показано, что в последнем случае развитие трансгенных и контрольных линий не отличается. В условиях же индукции трансгенные хризантемы зацветали на 2 недели раньше контрольных, при этом быстрее формировались соцветия. В результате полностью открытое соцветие формировалось на три недели раньше, чем в контроле. В то же время изменений морфологии не наблюдалось, и все сортовые характеристики сохранялись. Таким образом, мы полагаем, что гены *CDM111*, *HAM75*, *HAM92* астровых регулируют цветение, активируя (ускоряя) процесс закладки и формирования соцветия.

OVEREXPRESSION OF AP1-LIKE GENES FROM ASTERACEA INDUCES EARLY-FLOWERING IN TRANSGENIC CHRYSANTHEMUM PLANTS

O.A. Shulga¹, T.Yu. Mitiouchkina², A.V. Shchennikova¹, K.G. Skryabin¹, S.V. Dolgov²

¹Centre “Bioengineering” RAS

117312, Russia, Moscow, Prospect 60-let Oktyabrya 7/1,

e-mail: *shulga@biengi.ac.ru*

²Branch of Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, 142290, Russia, Moscow region, Pushchino, e-mail: *mitiouchkina@rambler.ru*

MADS-box genes play an important role in plant ontogeny, particularly, in the regulation of flower development. In the model plant *A. thaliana*, AP1 belonging to the MADS-box gene family, is required for determining the identity of the floral meristem and for proper development of first and second whorl organs. The AP1-like genes are only found in the core eudicots clade, probably linked to the origin of the eudicot flower. Functional studies using gain- or loss-of-function mutants revealed that putative AP1 orthologues have slightly diverged over evolution with respect to redundancy and gene function. We had cloned three AP1-like genes from chrysanthemum (CDM111) and sunflower (HAM75, HAM92) and have become interested in the generation of chrysanthemum transgenic plants that over-expressed these genes. Totally 37 independently regenerated plants carrying integrated transgenes were produced and used for subsequent experiments on flowering induction. Chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) is a short-day plant. Majority of chrysanthemum varieties is facultative for flowering initiation but all need a short-day photoperiod for flower development. We have demonstrated that over-expression of compositae AP1-homologous genes in transgenic chrysanthemum had no effect on flowering time and vegetative development under long-day conditions. Under inductive short-day conditions the most of transgenic plants grow faster and start bud initiation two weeks earlier than non-transgenic controls. There were no obvious changes in florets morphology of transgenic plants. Our results indicate that dominant role of analysed compositae AP1-like genes is the determination of floral meristem identity

ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ РЕДКОГО В БЕЛАРУСИ ВИДА САЛЬВИНИЯ ПЛАВАЮЩАЯ (*SALVINIA NATANS* L.) КАК ОСНОВА РАЗРАБОТКИ РЕКОМЕНДАЦИЙ ПО СОХРАНЕНИЮ ЕГО ГЕНОФОНДА

А.Н. Юхимук

ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси»

Беларусь, Минск, e-mail: andrey.yukhimuk@gmail.com

В комплексе природоохранных мероприятий, направленных на сохранение редких и исчезающих видов растений, изучение генетического разнообразия имеет первостепенное значение. Генетическое разнообразие, как один из уровней биологического разнообразия, является важнейшей характеристикой популяции и позволяет оценить состояние генетических ресурсов и выявить уровень адаптационной пластичности популяций и вида в целом.

Евразиатский субтропическо-неморальный реликтовый вид сальвиния плавающая (*Salvinia natans* L.) — охраняемый однолетний водный папоротник. На территории Беларуси находится на северной границе ареала. Является индикаторным видом, обитающим на мелководьях эвтрофных пресноводных стоячих и малопроточных водоемов.

Целью исследования являлась оценка генетического разнообразия популяций *S. natans* из трех современных локалитетов: Гадиловичи (р. Припять), Мозырь (р. Припять), Речица (р. Днепр), а также разработка практических рекомендации по сохранению отдельных популяций и вида в целом. Мультилокусное ДНК-маркирование проводили на основе RAPD- и ISSR-ПЦР. Были рассчитаны значения основных параметров генетического разнообразия: доля полиморфных локусов, среднее число аллелей на локус, средняя ожидаемая гетерозиготность, оценена степень подразделенности популяций, установлен уровень генетической дифференциации между исследованными популяциями *S. natans*. В частности, установлено, что наименьшим генетическим разнообразием обладает популяция из локалитета «Гадиловичи», находящаяся на северной границе в пределах белорусской части ареала. В совокупности с экологическими параметрами среды эти данные позволяют предположить, что по своему происхождению данная популяция является эволюционно наиболее молодой. Полученные данные легли в основу практических рекомендаций по сохранению *in situ* отдельных популяций и вида *S. natans* в целом. Данные рекомендации включают в частности комплекс мер по выявлению наиболее уязвимых популяций, первостепенных лимитирующих факторов распространения вида, уточнению охранного статуса. В качестве одного из важнейших этапов сохранения видов рекомендовано долговременное слежение за состоянием популяционных генофондов вида *S. natans* и прогнозирование их динамики во времени и пространстве (генетический мониторинг).

ASSESSMENT OF GENETIC DIVERSITY OF RARE SPECIES OF BELARUS FLOATING FERN (*SALVINIA NATANS* L.) AS A BASIS FOR THE DEVELOPMENT OF GUIDELINES FOR ITS GENE POOL CONSERVATION.

A.N. Yukhimuk

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

Belarus, Minsk, e-mail: andrey.yukhimuk@gmail.com

The study of genetic diversity is of primary importance within the complex of nature preserving actions oriented for conservation of rare and endangered plant species. Genetic diversity as one of the levels of biological diversity is the most important characteristics of the population, allows evaluating the status of genetic resources and identifying the level of adaptive plasticity of populations and species as a whole.

Salvinia natans L. (floating moss) is eurasian subtropical nemoral relict species, protected in Belarus. On the territory of Belarus the species is located on the northern border of its area. It is an indicator species, inhabiting the shallows of eutrophic freshwater standing and slowly flowing reservoirs.

The aim of this study was to evaluate the genetic diversity of three modern localities of *S. natans*: Gadilovichi (Pripyat river), Mozyr (Pripyat river), Rechica (Dnieper river), as well as to develop practical guidelines for the conservation of separate populations and species in whole. Multilocus DNA-fingerprinting was carried out on the basis of RAPD-and ISSR-PCR. The following values of genetic diversity parameters were calculated: the proportion of polymorphic loci, mean number of alleles per locus, the average expected heterozygosity, degree of subdivision of populations, the level of genetic differentiation between populations of *S. natans*. In particular it was found that «Gadilovichi», which is located on the northern border within the Belarusian area, has the smallest value of genetic diversity. Together with the environmental parameters, these data suggest that by the origin this population is evolutionarily the youngest. The obtained data were the basis of practical guidelines for *in situ* conservation of *S. natans* gene pool. These guidelines include set of measures to identify the most vulnerable populations, the primary limiting factors of the species distribution, conservation status clarification. As one of the most important stages of the long-term conservation of species the monitoring of the status of *S. natans* populations` gene pools and forecasting of their dynamics in time and space (genetic monitoring) are recommended.

GENETIC IMPROVEMENT OF CROPS FOR GROWING UNDER THE SALINE AND WATER DEFICIT CONDITIONS

S. Mohan Jain

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

Yield losses due to drought and salinity can reach 80%, depending on the timing, intensity, and duration of the stress coupled with other location-specific environmental factors. Moreover, the worldwide food production situation may further deteriorate under the climate change. It is generally agreed that the only about 80% of the genetic yield potential is achieved in farmers' fields because of reductions caused by abiotic stress, principally salinity and drought. Problems are particularly severe in developing countries in arid and semiarid regions, with both devastating short-term effects on the livelihoods of poor people and long-term effects on food security at a number of levels, and are likely to increase in future as competition for water increases. As well as drought, it is estimated that worldwide more than 13% of cultivated lands and around 50% of irrigated agricultural lands are affected by high salinity: these are estimated to be increasing at about 10% annually. Such land could be agriculturally productive if more salt tolerant species or cultivars were available. The constant challenge in world agriculture is therefore to reduce the gaps between the potential and the average yields obtained on farmers' fields under stress conditions to assure sustained food security for the benefit of resource-poor farmers. In view of the complex relationships between, and the number of traits involved in, tolerance to both drought and salinity, the innovative idea of gene and trait pyramiding, using molecular-assisted breeding, mutation and functional genomics, and in vitro selection. In rice, gene pyramiding has resulted in salt tolerance up to 400mM, tested in the greenhouse. These genes also express successfully in Brassica. By induced mutations, several salt and drought tolerant mutants have been produced, e.g. tomato, wheat. It is likely to provide the best route towards the development of region-specific tolerant crop germplasm. In addition, it offers the benefit of significant improvements in the tolerance of crops to these stresses, which have so far not been made at the level of yield on the farm. Despite the lack of substantial breeding progress, a large number of genotypes based upon mutation-assisted breeding and other biotechnologies have now been produced which are potential genetic resources for the improvement of drought and salinity tolerance. In addition, there is substantial variation for drought and salinity tolerance within existing natural populations of cereals and legumes. Some case studies of tomato, rice, date palm will be discussed, based on genetic engineering, gene pyramiding, marker-assisted selection and breeding, induced mutations for the enhancement of drought and salinity tolerance. The selection of abiotic stress tolerant phenotypes is most crucial, and different selection systems will be discussed before finally testing in the field.

ASSESSMENT OF THE GENETIC POLYMORPHISM IN NATURAL POPULATIONS AND CULTURES OF *ORIGANUM VULGARE* SUBSP. *VULGARE*

Ana Mutu¹, Angela Port¹, Rodica Martea, Oleg Budeanu¹, Elvira Gille², Maria Duca¹

¹University Center of Molecular Biology, University of the Academy of Sciences of Moldova

MD-2028, Republic of Moldova, Chisinau, 3/2 Academiei Str.,

e-mail: catedra_biologie@unasm.asm.md

²National Institute of R&D for Biological Sciences “Stejarul” Biological Research Centre

610004, Romania, Piatra Neamt, Alexandru cel bun 6

This study is the first to use RAPD markers and essential oil composition and content to investigate the genetic and chemical structure of intrapopulation differentiation of *Origanum vulgare* subsp. *vulgare* in R. Moldova.

Genotypic variations were assessed across various populations by means of analysis of molecular variance (AMOVA) using GenALEX 6. This analysis not only allows the partitions of the total variation into within-group and among-group variations components, but also provides a measure of inter-group genetic distances as the proportion of the total variation residing between accessions. The significance of the resulting variance components and inter-population genetic distances was tested using 999 random permutations.

RAPD DNA marker data were obtained and analysed with respect genetic diversity, population structure and gene flow. Twelve primers generated total of 298 discernible and reproducible bands in the analysed population, out of which 31 were polymorphic.

Variation of essential oils in the populations was subjected to cluster analysis, and one chemotype with *sabinen* / 4(10)-*thujene*, *trans-β-ocimene*, *γ-terpinen*, *β-caryophyllene*, *germacrene d* was identified.

The UPGMA cluster analysis permitted the discrimination of all the genotypes and their sorting into 3 main groups.

This study indicated there was no correlation between the RAPD data and chemical composition data. This result is evidence that genetic similarity may not always reflect similarity or difference in phenotypic traits, for instance oil composition; this has previously been reported. Also, effects of environmental conditions, the extraction method used, and plant growth stages on essential oil of medicinal and aromatic plants should be considered. In contrast, DNA genotyping is not affected by plant development stages and other environmental factors.

Use of RAPD markers has enabled discrimination of oregano populations and can be used successfully for the selection and improvement of cultivars in future studies. In addition, knowledge of chemical composition, revealed in this investigation, gives the opportunity to select genotypes containing different types of essential oil.

СЕКЦИЯ 5.
SECTION 5.

БИОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ
РАСТИТЕЛЬНОГО ГЕНОФОНДА, ПОЛУЧЕНИЕ И
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ
ВЕЩЕСТВ

BIOCHEMICAL STUDIES OF PLANT GERMPLASM;
SYNTHESIS AND USAGE OF BIOLOGICAL ACTIVE
SUBSTANCES

ИЗУЧЕНИЕ ЖИРНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА РЫЖИКА ПОСЕВНОГО (*CAMELINA SATIVA*) УКРАИНСКОЙ СЕЛЕКЦИИ

Ю.Н. Бойчук¹, Д.Б. Рахметов², А.И. Емец¹, Я.Б. Блюм¹

¹ДУ «Институт пищевой биотехнологии и геномики» НАН Украины, 04123, Украина, Киев, ул. Осиповского 2а,

e - mail: boychuk.yulia@gmail.com

²Национальный ботанический сад им. Н.Н. Гришко НАН Украины

01014, Украина, Киев, ул. Тимирязевская, 1, e - mail: jamal_r@bigmir.net

В последнее время среди масличных культур, растительное масло которых пригодно для технических и пищевых целей в силу их жирнокислотного состава, большой интерес представляет рыжик посевной (*Camelina sativa* (L.) Crantz), относящийся к семейству крестоцветных (*Brassicaceae*). Известно, что в его семенах содержится до 40% масла, в состав которого входят полиненасыщенные жирные кислоты, в том числе линолевая (С 18:2) и α -линоленовая (С 18:3), их содержание достигает 20 и 40 %, соответственно, в то же время содержание эруковой кислоты (С 22:1) достаточно низкое и составляет – 1,5-3,0 %. Благодаря жирнокислотному составу масло рыжика является ценным сырьем для использования на энергетические, технические, пищевые и лекарственные цели.

Целью данной работы было исследование жирнокислотного состава масла рыжика посевного (*Camelina sativa*) высокопродуктивных форм (ФЕОРЖЯФ-1, ФЕОРЖЯФ-2, ФЕОРЖЯФ-3, ФЕОРЖЯФ-4, ФЕОРЖЯФ-5, ФЕОРЖЯФД, ФЕОРЖЯФЧ, ФЕОРЖЯФЧП) и сортов (Мираж, Колондаик, Пэрэмога и Евро-12), полученные в отделе новых культур Национального ботанического сада им. Н.Н. Гришко, а также выделить среди них наиболее перспективные для пищевых целей и производства биодизеля.

Результаты исследований жирнокислотного состава рыжика посевного свидетельствуют, что для всех исследуемых форм и сортов растений *Camelina sativa* характерно высокое содержание линоленовой, линолевой, олеиновой, гондоиновой и пальмитиновой кислот, а также свойственная всем крестоцветным эруковая кислота. Наибольшее содержание полиненасыщенной линоленовой кислоты установлено для формы ФЕОРЖЯФД - 38,271% и сорта Евро-12 - 35,564%. Сорт Клондаик и формы ФЕОРЖЯФ-4, ФЕОРЖЯФЧ, ФЕОРЖЯФЧП отличались более высоким содержанием линолевой кислоты (24,646%, 21,860%, 21,619%, 21,981%) по сравнению с другими сортами и формами. Среди насыщенных кислот преобладает пальмитиновая кислота, содержание которой составляет 11,426 % для семян сорта Клондаик. Из форм, пригодных для использования масла на пищевые цели, заслуживает внимания форма ФЕОРЖЯФ-2, в которой высокое содержание олеиновой кислоты - 18,467%, сорта Мираж - 17,482% и Пэрэмога - 17,319%. При использовании масла рыжика на технические цели ценны формы ФЕОРЖЯФЧП, ФЕОРЖЯФ-5 и сорт Евро-12 с высоким содержанием эруковой кислоты, которая является ценным сырьем для производства биодизельного топлива.

STUDY OF FATTY ACID COMPOSITION IN UKRAINIAN FORMS AND VARIETIES OF FALSE FLAX (*CAMELINA SATIVA*)

Yu.N. Boychuk¹, D.B. Rakhmetov², A.I. Yemets¹, Ya.B. Blume¹

¹Institute of Food Biotechnology and Genomics, NAS of Ukraine

04123, Ukraine, Kyiv, Osipovskaya Str.2a, e-mail: *boychuk.yulia@gmail.com*

²National Botanical Garden named M.M. Gryshko, NAS of Ukraine

01014, Ukraine, Kyiv, Timiryazevskaya Str. 1, e - mail: *jamal_r@bigmir.net*

Last decades among oil crops containig oil suitable for technical and food purposes due to their fatty acid composition, false flax (*Camelina sativa* (L.) Crantz), family *Cruciferae* (Brassicaceae) is of great interest. It is known that its seeds contain up to 40% of oil, which consist of polyunsaturated fatty acids, including linoleic (C 18:2) and α -linolenic (C 18:3), their content is 20 and 40%, respectively, the content of erucic acid (C 22:1) is sufficiently low (1.5-3.0%). Owing to fatty acid composition *Camelina* oil is a valuable raw material for energy, technical, food and medical purpose.

The aim of this study was to investigate the fatty acid composition of *C. sativa* seed oil in forms (FEORZHAYAF-1, FEORZHAYAF-2, FEORZHAYAF-3, FEORZHAYAF-4, FEORZHAYAF-5, FEORZHAYAFD, FEORZHAYAFCH, FEORZHAYAFCHP) and varieties (Mirage, Klondayk, Peremoga and Euro-12) Ukrainian selection obtained in N.N. Grishko National Botanic Gardens, and select among them the most promising ones for human consumption and biodiesel production.

It has been found that all the studied forms and varieties of *C. sativa* characterized by a high content of linolenic, linoleic, oleic, palmitic and gondoic acids and erucic acid, typical for all cruciferous. The highest content of polyunsaturated linolenic acid have been found in the form FEORZHAYAFD - 38.271% and in variety Euro 12 - 35.564%. Variety Klondike and forms FEORZHAYAF-4, FEORZHAYAFCH, FEORZHAYAFCHP had a higher content of linoleic acid (24.646%, 21.860%, 21.619%, 21.981%) as compared to other varieties and forms. Among the saturated fatty acid palmitic acid prevails, its content is 11.426% for Klondike's seed. Among the forms with camelina oil suitable for food perspective ones are FEORZHAYAF-2, with a high content of oleic acid - 18.467%, and varieties Mirage – 17.482% and Peremoga – 17.319%. On usage this oil for technical purposes forms FEORZHAYAFCHP, FEORZHAYAF-5 and variety Euro-12 are valuable due to high content of erucic acid that is very important raw material for biodiesel production.

ОПЫТ ПОЛУПРОМЫШЛЕННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *DUNALIELLA SALINA* ТЕОД. ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ β-КАРОТИНА

А.Б. Боровков, И.Н. Гудвилович

Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского
299011, Республика Крым, Севастополь, пр. Нахимова, 2,
e-mail: *spirit2000@ua.fm, gudirina2008@yandex.ru*

Используемые в настоящее время промышленные технологии выращивания *D. salina* для получения β-каротина предусматривают, как правило, двухстадийный способ культивирования водоросли. На первой стадии технологического процесса водоросль выращивают в условиях, обеспечивающих максимальную скорость деления вегетативных клеток. На второй стадии в полученной биомассе индуцируют накопление β-каротина. Такие технологии, как правило, основаны на методе периодических культур, который является наиболее изученным и разработанным на сегодняшний день. Представляется перспективным ввести в технологическую схему промышленного выращивания *D. salina* менее распространённый квазинепрерывный способ культивирования, обеспечивающий более высокую и стабильную продуктивность культуры.

Цель работы заключалась в апробации двухстадийного культивирования *D. salina* с использованием квазинепрерывного метода выращивания в полупромышленных условиях.

Работа выполнена на базе тепличного комплекса (Харьковская область) и на базе солепромыслов (г. Саки). Эксперимент проводили в два этапа: первоначально культуру *D. salina* выращивали в квазинепрерывном режиме, с ежесуточным обменом 10%. На втором этапе выросшую биомассу отбирали из бассейна и разбавляли в 5 и 10 раз. Разбавление проводили питательной средой без солей – источников азота и фосфора. Постепенно повышали солёность в бассейнах от 120 до 240 г·дм⁻³.

Экспериментально показано, что повышения освещённости и солёности культуральной среды в условиях Харьковской области оказалось недостаточно для интенсивного накопления каротиноидов, их содержание не превышало 0,5% ОВ. Однако для варианта с 10-кратным разбавлением наблюдалось повышение соотношения Кар/Хла (от 0,3 до 0,65), что свидетельствует о перестройке пигментного аппарата и предшествует активному накоплению каротиноидов в клетках дуналиеллы. По-видимому, отрицательную роль сыграли погодные условия, так как при аналогичном проведении эксперимента в западной части Крыма, содержание каротиноидов увеличилось в 5 раз (от 0,5 до 4,5% ОВ).

Таким образом, проведена апробация двухстадийного полупромышленного культивирования *D. salina* для двух регионов Украины с использованием квазинепрерывного метода на первом этапе выращивания.

EXPERIENCE OF *DUNALIELLA SALINA* TEOD. MASS CULTIVATION FOR β -CAROTENE PRODUCTION

A.B. Borovkov, I.N. Gudvilovich

The O.A. Kovalevsky Institute of Biology of Southern Seas of NASU
99011, Crimea, Sevastopol, Nakhimov Avenue, 2, e-mail: *spirit2000@ua.fm*,
gudirina2008@yandex.ru

Industrial technologies of *D. salina* growing which are currently in use, envisage, typically, a two-step algae culturing method. At the first stage of technological process the algae is grown under conditions, which provide the maximum rate of vegetative cells division. At the second stage β -carotene accumulation is induced in the obtained biomass. Such technologies are usually based on the method of batch culture, which is the most studied and developed up to date. It seems promising to introduce less common semicontinuous method of *D. salina* cultivation to technological scheme of industrial cultivation, which provides higher and more stable culture productivity.

The aim of this work was an approbation of two-stage *D. salina* cultivation system using semicontinuous cultivation method within industrial conditions.

The work was done on the base of greenhouse complex (Kharkiv region) and on the base of sedimentary salt mining (Saki). The experiment was conducted in two stages: initially *D. salina* culture was grown in a semicontinuous mode with daily exchange of 10%. At the second step the grown biomass was taken from the pool and 5 and 10 times diluted. Dilution was carried out with nutrient medium without salts – sources of nitrogen and phosphorus. Salinity in pools was gradually increased from 120 to 240 g · dm⁻³.

It was shown experimentally that increase of illumination and salinity conditions of the culture medium in Kharkiv region was not enough for intensive accumulation of carotenoids; their content did not exceed 0.5% AFDW. However, for the experiment with a 10-times dilution, increase in the ratio Car/Chla (0.3 to 0.65) was observed, that indicated the restructuring of the pigment apparatus and preceded the intensive accumulation of carotenoids in *Dunaliella* cells. Apparently, weather conditions played the negative role, since during similar experiment in the western part of Crimea there was a 5-time increase in carotenoids content (from 0.5 to 4.5 % AFDW).

Thus, an approbation of two-stage system of *D. salina* industrial cultivation for two ukrainian regions using semicontinuous method was completed at the first stage of cultivation.

ОСОБЕННОСТИ ОБРАЗОВАНИЯ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В *LINUM USITATISSIMUM* С РАЗЛИЧНЫМ УРОВНЕМ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ

Е.А. Гончарук¹, Ю.А. Горчакова², Л.В. Назаренко²

¹ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН
127276, Россия, Москва, ул. Ботаническая, д. 35,
e-mail: *phenolic2012@yandex.ru*

²Московский городской педагогический университет
129226, Россия, Москва, 2-ой Сельскохозяйственный проезд, д. 4, корп. 1

Фенольные соединения (ФС) наиболее широко и разнообразно представлены в растительном мире. Выполняя ряд функций, жизненно важных для растений, они участвуют в различных метаболических процессах и таким образом обладают полифункциональным действием на растительный организм. Являясь вторичными метаболитами, ФС синтезируются в растительных клетках, при этом их спектр даже в пределах одного вида растений очень широк.

Содержание ФС и их состав зависит от типа и степени дифференциации тканей растений. Исследований, направленных на изучение ФС у льна масличного, являющегося культурой комплексного использования в различных отраслях промышленности, практически нет. Кроме того, биотехнологические подходы для выращивания этой важной культуры в условиях *in vitro* освоены недостаточно. В связи с этим в ходе эксперимента были использованы проростки и каллусные культуры льна масличного, выращиваемые в стерильных условиях на питательной среде Мурасиге и Скуга при 16-часовом фотопериоде в факторостате ИФР РАН.

Установлено, что у проростков льна суммарное содержание ФС в 1,5 раза превышало таковое у каллусной культуры. При этом накопление флавоноидов было почти в 6 раз выше относительно каллусной культуры в то время, как уровень фенилпропаноидов (ФП) оказался невысоким (в 3 раза ниже, чем в каллусе).

Следовательно, в дифференцированных тканях проростков льна преобладали ФС сложной структуры – флавоноиды, тогда как в недифференцированных каллусных клетках – ФС более простой структуры – фенилпропаноиды. Эти различия, вероятно, являются следствием формирования и уровня дифференциации хлоропластов – основных мест биосинтеза ФС, главным образом флавоноидов.

FEATURES OF PHENOLIC COMPOUNDS IN *LINUM USITATISSIMUM* WITH DIFFERENTIATION VARIOUS LEVEL

E.A. Goncharuk¹, Yu.A. Gorchakov² L.V. Nazarenko²

¹FGBUN Institute of Plant Physiology. KA Timirjazeva Academy of Sciences
127276, Russia, Moscow, Botanical Str., 35, e-mail: *phenolic2012@yandex.ru*

²Moscow City Pedagogical University,
129226, Russian, Moscow, 2-nd, Agricultural pr., 4, build. 1

Phenolic compounds are the most widely and variously represented in the plant world. They are involved in various metabolic processes and thereby have a polyfunctional effect on the plant. Phenolic compounds are secondary metabolites and are synthesized in the plant cells. Range of phenolic compounds is very wide even within the same plant species. Phenolic compounds content and their composition depend on the type and degree of plant tissue differentiation. At the moment there is practically no direction for the study of flax phenolic compounds, although it is a culture of complex use.

It was established that the total content of phenolic compounds in the flax seedlings was 1.5 times larger than that in callus culture. At the same time accumulation of flavonoids was almost 6 times higher than in callus culture, as the level of phenylpropanoids was low. So, in differentiated tissues of flax seedlings phenolic compounds complex structure - flavonoids dominated, whereas in dedifferentiated callus cells - phenolic compounds with simpler structure – phenylpropanoids predominated. These differences are probably a consequence of chloroplasts formation and the level of their differentiation of.

ЛЕТУЧИЕ СОЕДИНЕНИЯ ВОДНО-ЭТАНОЛЬНОГО ЭКСТРАКТА *MENTHA LONGIFOLIA* L.

О.А. Гребенникова, А.Е. Палий, Ю.П. Христова

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр
298648, Республика Крым, Ялта, e-mail: oksanagrebennikova@yandex.ru

Mentha longifolia L. и её эфирное масло широко применяются в медицине, парфюмерии и пищевой промышленности. Трава и эфирное масло этого растения оказывают антибактериальное, фунгицидное, противовоспалительное, антиоксидантное, спазмолитическое, желчегонное, ветрогонное и потогонное действия и входят в состав средств для лечения астмы, бронхитов, мигреней, нарушений пищеварения, болезней печени и мышц. Биологическая ценность *M. longifolia* обусловлена комплексом биологически активных веществ, среди которых ведущее положение занимают летучие соединения.

В связи с этим, целью работы явилось изучение качественного и количественного состава летучих соединений в водно-этанольном экстракте перспективного сортообразца *M. longifolia* селекции НБС – ННЦ для обоснования его практического использования.

Для исследования был выбран перспективный сортообразец *M. longifolia*, выращенный на коллекционных участках Никитского ботанического сада, собранный в фазу цветения. Содержание летучих соединений определяли в водно-этанольных экстрактах, приготовленных настаиванием 1 части воздушно-сухого растительного сырья в 10 частях 50 %-ного водно-этанольного раствора в течение 10 суток. Компонентный состав летучих веществ определяли методом газо-жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

В результате проведенных исследований установлено, что концентрация летучих соединений в водно-этанольном экстракте данного сортообразца *M. longifolia* составила 974,6 мг на 100 г воздушно-сухого растительного сырья; в нем обнаружено 20 компонентов из которых идентифицировано 17. Для полученного экстракта наиболее характерными летучими веществами являются монотерпены, монотерпеновые кетоны и спирты. Экстракт отличается значительным содержанием ментона (53,2%), изоментона (27,7%), транс-сабиненгидрата (8,2%) и 1,8-цинеола (6,2%), тогда как концентрация каждого из остальных компонентов не превышает 1%. В экстракт перешли наиболее ценные летучие соединения *M. longifolia*: ментон и 1,8-цинеол, придающие ему, наряду с приятным ароматом, антимикробное, противогрибковое и антиоксидантное действия.

Таким образом, экстракт данного сортообразца *M. longifolia* обладает высокой биологической ценностью за счёт содержания ментона, изоментона и 1,8-цинеола и может быть использован для создания продукции, обогащенной биологически активными веществами.

VOLATILE COMPOUNDS OF *MENTHA LONGIFOLIA* L. WATER-ETHANOL EXTRACT

O.A. Grebennikova, A.E. Paliy, J.P. Khristova

Nikitsky Botanical Gardens – National Scientific Centre

298648, Crimea, Yalta, e-mail: oksanagrebennikova@yandex.ru

Mentha longifolia L. and its essential oils are widely used in medicine, cosmetics and food industry. Herb and essential oils of this plant have antibacterial, antifungal, anti-inflammatory, antioxidant, antispasmodic, choloretic, carminative and diaphoretic action and are a part of the medicines for the treatment of asthma, bronchitis, migraines, digestive disorders, liver and muscles. Biological value of *M. longifolia* is stipulated by the complex of biologically active substances, among which the main ones are volatile compounds.

In this regard, the purpose of the work was to study qualitative and quantitative composition of volatile compounds in water-ethanol extract of *M. longifolia* perspective specimen bred in NBG - NSC to justify its practical use.

Perspective specimen of *M. longifolia*, grown on the collection sites of Nikitsky Botanical Gardens, collected in the flowering phase was selected for the study. The content of volatile compounds was measured in water-ethanol extract prepared by macerating one part of the air-dried plant material in 10 parts of 50% water-ethanol solution for 10 days. Component composition of volatile substances was determined by gas-liquid chromatography with mass spectrometric detection.

The studies have determined that concentration of volatile compounds in water-ethanol extract of *M. longifolia* specimen was 974.6 mg per 100 g of air-dried plant material; there have been found 20 components among which 17 are identified. The main volatile substances in this extract are monoterpenes, monoterpene ketones and alcohols. Extract is characterized by a considerable content of menthone (53.2%), isomenthone (27.7%), trans-sabinengidrata (8.2%) and 1,8-cineole (6.2%), whereas the concentration of any other component does not exceed 1%. The most valuable volatile compounds of *M. longifolia* - menthone and 1,8-cineole have passed to the extract and give it, along with a pleasant aroma, antimicrobial, antifungal and antioxidant action.

Thus, extract of this *M. longifolia* specimen is of high biological value due to the content of menthone, isomenthone, and 1,8-cineol, and can be used to produce products enriched with biologically active substances.

ВЛИЯНИЕ НАНОЭЛЕМЕНТОВ НА ВТОРИЧНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ *SILYBUM MARIANUM* (L.) GAERTN.

О.В. Копач¹, А.А. Кузовкова¹, С.Г. Азизбеян², В.Н. Решетников¹

¹ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси»

Беларусь, Минск, e-mail: olga-kopa@mail.ru

²ГНУ «Институт физико-органической химии НАН Беларуси»

Беларусь, Минск,

В качестве потенциальных регуляторов метаболизма каллусных культур *Silybum marianum* (L.) Gaertn. двух рас — красноцветкового сорта Золушка белорусской селекции и белоцветкового сортообразца венгерской селекции были выбраны наночастицы меди и комплексный препарат наночастиц кобальта, магния, меди и железа «Наноплант». Наночастицы представляют собой нерастворимые соединения, настолько малых размеров, что способны проникать через клеточную стенку и мембраны растений вместе с жидкой фазой. Они характеризуются высокой реакционной способностью и каталитической активностью.

Биологический эффект препаратов наночастиц оценивали в сравнение с каллусами (контроль) пассируемыми на среде Мурасиге-Скуга, содержащей БАП (2 мг/мл) и НУК (1 мг/мл). Нами было установлено, что внесение наномеди в среду увеличивало содержание флавоноидов и оксикоричных кислот (ОКК) в стеблевом и корневом каллусе 8 пассажа у исследуемых рас расторопши в 1,2 раза. В 11 пассаже сорта Золушка в корневом каллусе наблюдалось уменьшение содержания вторичных метаболитов, а в стеблевом каллусе содержание увеличилась в 1,2 раза. Такая же тенденция наблюдалась и в 24 пассаже. Однако добавление комплексного препарата «Наноплант» в корневом каллусе увеличивало содержание вторичных метаболитов в 1,5 (концентрация 0,15 мг/мл) и 1,1 (концентрация 1,5 мг/мл) раз, а в стеблевом каллусе в 1,8 и 1,9 раз соответственно. Внесение же наночастиц меди каллусным культурам венгерского сортообразца привело к увеличению содержания вторичных метаболитов в 11 и 24 пассажах. Так, в корневом каллусе 11 пассажа содержание увеличилась в 1,9 раз, а в стеблевом в 2,7 раза, концентрация наноэлементов не имела значения. Добавление наномеди к корневым и стеблевым каллусам 24 пассажа привело к увеличению содержания флавоноидов и ОКК в 1,9 и 2,9 раз (при концентрации 0,15 мг/мл) и в 2,4 и 2,6 раз (при концентрации 1,5 мг/мл). Однако добавление препарата «Наноплант» у сортообразца венгерской селекции привело к уменьшению синтеза БАВ в стеблевом каллусе при концентрации 0,15 мг/мл и увеличила данный показатель в 1,2 раза при концентрации 1,5 мг/мл. На корневом каллусе наблюдалось увеличение содержания флавоноидов и ОКК в 1,2 раза.

Увеличение содержания флавоноидов и оксикоричных кислот в клетках каллусов зависело от количества наноэлементов в среде, вида каллуса и расы растения.

INFLUENCE OF NANOELEMENTS ON SECONDARY METABOLISM *SILYBUM MARIANUM*

O.V. Kopach¹, A.A. Kuzovkova¹, S.G. Azizbekian² V.N. Reshetnikov¹

¹SSI "Central Botanical Garden of National Academy of Sciences of Belarus"
Belarus, Minsk, e-mail: *olga-kopa@mail.ru*

²SSI "Institute of Physical Organic Chemistry, National Academy of Sciences of
Belarus"
Belarus, Minsk

As potential regulators of metabolism in the callus cultures of *Silybum marianum* two races – red flower Cinderella Belarusian breeding variety and white flower variety of Hungarian selection copper nanoparticles and complex preparation of nanoparticles of cobalt, magnesium, copper and iron "Nanoplant" were chosen. Nanoparticles are insoluble compounds so small-sized that they are able to penetrate the cell wall and membrane plant together with the liquid phase. They are characterized by high reactivity and catalytic activity.

Biological effect of nanoparticle drugs was evaluated in comparison with callus (control) replant on Murashige and Skoog medium containing BAP (2 mg/ml) and NAA (1 mg/ml). We have found that the introduction of nanocopper into the culture medium increased flavonoids and hydroxy-cinnamic acids content in stem and root callus of the 8th passage in the studied races of thistle in 1.2 times. In the 11th grade passage variety Cinderella at the root callus a decrease of secondary metabolites content was observed, and at the stem callus it increased in 1.2 times. The same trend was observed in the passage 24. However, addition of complex preparation "Nanoplant" in root callus increased the content of secondary metabolites in 1.5 times (concentration 0.15 mg/ml) and 1.1 (concentration of 1.5 mg/ml), and in the stem callus in 1.8 and 1.9 times respectively. Adding copper nanoparticles to the callus of Hungarian variety led to increasing of secondary metabolism in the 11th and 24th passages. Thus, the root callus of 11 passage activity increased in 1.9 times, and in 2.7 times in the stem; concentration of nanoelements did not matter. Adding nanocopper to root and stem callus passage 24 led to increase of flavonoids and hydroxy-cinnamic acids in the content in 1.9 and 2.9 times (at the concentration of 0.15 mg/ml) and in 2.4 and 2.6 times (at a concentration of 1.5 mg/ml). However, for variety of Hungarian selection, the addition of "Nanoplant" drug resulted in a decrease of biological active substances synthesis in the stem callus at a concentration of 0.15 mg/ml and the indicator has increased in 1.2 times at a concentration of 1.5 mg/ml. Increase of flavonoids and hydroxy-cinnamic acids in 1.2 times was observed in the root callus.

Increasing of flavonoids and hydroxy-cinnamic acids content in the cells depended on the nanoelements number in the medium, type of callus and plant race.

СОДЕРЖАНИЕ АНТИОКСИДАНТОВ И ИХ АКТИВНОСТЬ В СОКЕ ВИДОВ КАЛАНХОЕ: *K. SCAPIGERA* И *K. RHOMBOPILOSA*

П.В. Лапшин¹, Н.В. Загоскина¹, Н.Н. Сажина²

¹ФГУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН
127276 Москва, ул. Ботаническая, 35, Россия, e-mail: phenolic@ippras.ru

²ФГУН Институт биохимической физики им Н.М. Эмануэля РАН
119334, Москва, ул. Косыгина 4, e-mail: Natnik48s@yandex.ru

Каланхое - суккулентные тропические растения с сочными, водозапасающими листьями. В их листьях содержатся многочисленные полифенольные соединения, органические кислоты, полисахариды, витамины и микроэлементы. Фенольные соединения и обуславливают, главным образом, биологическую, в том числе и антиоксидантную, активность, то есть способность его компонентов ингибировать окислительные свободнорадикальные процессы.

Амперометрическим и хемилюминесцентным методами измерены значения суммарного содержания антиоксидантов фенольного типа и их активности в соке более 30 видов Каланхое с целью выявления наиболее активных продуцентов биологически активных соединений. Выявлены виды *K. scapigera* и *K. rhombopilosa* антиоксидантная активность которых в 6 раз превышает активность широко использующихся в медицине *K. pinnata* и *K. daigremontiana*.

По результатам наших исследований для 34 видов Каланхое, наибольшие значения антиоксидантов наблюдали у *K. scapigera* и *K. rhombopilosa* (1981 и 1911 мг/л по галловой к-те). Наиболее изученный вид *K. pinnata* показал значения, в 6 раз ниже относительно этих видов (294 мг/л ГК), *K. daigremontiana* (550 мг/л ГК). Антиоксидантную активность измеряли хемилюминесцентным методом по степени ингибирования окисления системы «Нв-Н₂О₂-люминол» (к, мкг⁻¹), была показана высокая корреляция результатов, составлявшая $r=0,89$.

Измерения, проведенные обоими использованными в настоящей работе методами демонстрируют более высокие антиоксидантные свойства соков двух новых для фармации представителей рода Каланхое: *K. scapigera* и *K. rhombopilosa* по сравнению с широко используемыми в лечебных целях *K. pinnata* и *K. daigremontiana*. Повышенные значения антиоксидантной активности соков этих представителей Каланхое могут свидетельствовать о наличии в них других компонентов фенольной природы, ферментов, металлокомплексов или о более активном соотношении при использовании данных методов анализа. Для расширения возможности использования указанных видов Каланхое как источников биологически активных соединений необходимо проведение дополнительных исследований на предмет изучения их биохимического состава, антибактериальных, противомикробных, фиторегулирующих и других свойств их компонентов. Возможно, эти виды окажутся перспективными для использования в медицине.

ANTIOXIDANTS' CONTENT AND THEIR ACTIVITY IN THE SAP OF KALANCHOE SPECIES: *K. SCAPIGERA* AND *K. RHOMBOPILOSA*

P.V. Lapshin¹, N.V. Zagorskina¹, N.N. Sazhina²

¹Timiryazev Institute of plant physiology RAS

127276, Russia, Moscow, Botanicheskaya Str., 35, e-mail: *phenolic@ippras.ru*,

²Emanuel Institute of biochemical physics RAS

119334, Russia, Moscow, Kosygin Str. 4, e-mail: *Natnik48s@yandex.ru*

Kalanchoe – tropical plants with succulent leaves. These leaves contain many polyphenolic compounds, organic acids, polysaccharides, vitamins and minerals. Phenolic compounds mainly cause biological, including antioxidant activity, i.e. its components ability to inhibit oxidative free-radical processes.

Amperometric and chemiluminescence methods measured values of the total content of phenolic antioxidants and their activity in the juice for more than 30 species of Kalanchoe to identify the most active producers of biologically active compounds. The species with more than 6 times greater antioxidant activity: *K. scapigera* *K. rhombopilosa* have been selected and compared with widely used in medicine *K. pinnata* and *K. daigremontiana*.

According to the results of our measurements for 34 species of Kalanchoe, the highest values were observed in *K. scapigera* and *K. rhombopilosa* (1981 and 1911 mg/l gallic acid). The most studied species *K. pinnata* showed values up to 6 times lower with respect to these species (294 mg/l gallic acid), *K. daigremontiana* (550 mg/l). Antioxidant activity was measured by chemiluminescence method according to the degree of inhibition of the oxidation system «Hb-H₂O₂-luminol» (k, g⁻¹), a high correlation of the results, which amounted to $r = 0.89$ was shown.

Both methods used in this work demonstrated significantly higher antioxidant properties of the juice for two new for pharmacy species of the genus *Kalanchoe*: *K. scapigera* and *K. rhombopilosa* compared with widely used for medicinal purposes *K. pinnata* and *K. daigremontiana*. Higher values of the antioxidant activity of these Kalanchoe species juice may indicate the presence of some other phenolic components, enzymes, metal complexes or greater value than under using data analysis methods. To expand possibilities for using these Kalanchoe species as sources of bioactive compounds more research in order to explore their chemical composition, antibacterial, antimicrobial, bioregulation and other properties of their components are needed. Perhaps these species will be promising for use in medicine.

ДИНАМИКА НАКОПЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В НАДЗЕМНОЙ МАССЕ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *VITEX* L. В ТЕЧЕНИЕ ВЕГЕТАЦИОННОГО ПЕРИОДА

Н.Я. Левчик, Д.Б. Рахметов, В.В. Фещенко

Национальный ботанический сад им. Н.Н. Гришко НАН Украины

Украина, г. Киев, e-mail: natasha_levchik@mail.ru

Растения видов рода *Vitex* L.: *V. agnus-castus*, *V. cannabifolia*, *V. negundo* (порядок Lamiales, семейство Verbenaceae), интродуцированные в Национальном ботаническом саду им. Н.Н. Гришко, имея тысячелетнюю историю применения, на современном этапе ценятся и используются, благодаря своим антиоксидантным, противовоспалительным, антифунгальным и противомикробным свойствам.

Накопление биологически активных веществ в надземной массе растений – процесс динамичный. Нами в течение 2011-2013 гг. изучался этот процесс в связи со сменой фенологических фаз, а также периодов онтогенеза с тем, чтобы объяснить физиологическое состояние растений в условиях интродукции, а также дать качественную характеристику растительному сырью и определить оптимальные сроки его сбора при культивировании и переработке.

Было определено, что к концу вегетации происходит накопление одних компонентов, убывание других и волнообразное колебание содержания остальных. Так, происходит постепенное накопление сухого вещества, независимо от вида и возраста растений. Максимальные его показатели фиксируются в период фазы плодоношения: у *V. agnus-castus* 38,04%, *V. cannabifolia* 36,89%, *V. negundo* 35,40%.

Независимо от вида и возраста растений максимальное накопление содержания аскорбиновой кислоты можно зафиксировать в самом начале вегетации растений в фазу роста (*V. agnus-castus* - 615,8мг%, *V. Cannabifolia* - 702,6мг%, *V. negundo* - 441,9мг%), ощутимое снижение в фазу цветения (соответственно 58,1мг%; 31,7мг%; 28,7мг%) и небольшое повторное повышение в фазу плодоношения (60,7мг%; 87,7мг%; 78,2мг%).

Отмечена линейная зависимость между содержанием аскорбиновой кислоты и количеством хлорофилла.

По содержанию дубильных веществ наблюдается общая тенденция для старых генеративных растений с постепенным накоплением и максимальными показателями в фазу цветения (*V. agnus-castus* - 5,54%; *V. Cannabifolia* - 6,43%; *V. negundo* - 4,39%), для молодых и средних генеративных растений с двумя максимумами: в фазу цветения и в конце вегетации.

Итак, качественное и количественное содержание биохимических компонентов растений трех видов *Vitex* L. является признаком видоспецифичным признаком и определяется их возрастом, сменой фенологических фаз и погодными условиями года вегетации.

THE DYNAMIC OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES ACCUMULATION IN ABOVEGROUND PLANT MASSES OF *VITEX* L. GENUS' REPRESENTATIVES DURING VEGETATION PERIOD

N.Y. Levchyk, D.B. Rahmetov, V.V. Feschenko

M.M. Gryshko National Botanical Garden of NAS of Ukraine

Ukraine, Kiev, e-mail: natasha_levchik@mail.ru

The plants of *Vitex* L. genus (*V. agnus-castus*, *V. cannabifolia*, *V. negundo* (order Lamiales, family Verbenaceae), introduced in M.M. Gryshko National Botanical Garden, have more than one thousand-years history of usage and are currently actively in use due to their antioxidant, anti-inflammatory, antifungal and antimicrobial activity.

Accumulation of biologically active substances in aboveground plant masses is a dynamic process. We studied this issue during 2011-2013 in connection with changes of phenological phases and ontogenesis periods. Our aim was: to explain physiological state of plants in introduction conditions, to provide qualitative characteristic of plant row materials and to define optimal harvesting terms during cultivation and processing.

We identified accumulation of some components, expenditure and wave-tape variation of the others at the end of vegetation. Thus gradual accumulation of dry substance was observed regardless of genus and age of plants. Its maximum was recorded during fruiting phase, as follow: *V. agnus-castus* 38.04%, *V. cannabifolia* 36.89%, *V. negundo* 35.40%.

Regardless of genus and age of plants, maximum accumulation of ascorbic acid can be recorded at the early beginning of plants' vegetation – during regrowth phase (*V. agnus-castus* – 615.8 mg%, *V. cannabifolia* – 702.6 mg%, *V. negundo* – 441.9 mg%), perceivable declining during flowering phase (correspondingly 58.1 mg%; 31.7 mg%; 28.7 mg%) and some secondary growth during fruiting phase (60.7 mg%; 87.7 mg%; 78.2 mg%).

It is a linear dependency between ascorbic acid content and chlorophyll quantity.

The following tendency was observed for tannins content: gradual accumulation with maximum during flowering phase (*V. agnus-castus* – 5.54%; *V. cannabifolia* – 6.43%; *V. negundo* – 4.39%) – for old generative plants; two maximums - during flowering phase and at the end of vegetation – for young and mid-age generative plants.

So, qualitative and quantitative content of biochemical components in three *Vitex* L. species is genus-specified indicator. It is defined by the age of plants, changes of phenological phases and weather conditions during the year of vegetation.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТОВ ИЗ ТРАНСГЕННЫХ КОРНЕЙ *ALTHAEA OFFICINALIS* L.

Н.А. Матвеева¹, К.А. Дробот¹, А.С. Потрохов², А.А. Потрохов¹,
Е.Ю. Кваско

¹Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины,
03680, Украина, г. Киев, ул. Академика Заболотного, 148,
e-mail: joyna56@gmail.com

²Институт гидробиологии НАН Украины
04210, Украина, г. Киев, просп. Героев Сталинграда, 12,

Антиоксидантная активность (АОА) - один из показателей физиологического состояния растений. Повышение АОА свидетельствует о стрессовой реакции и о возможности повышения адаптивного потенциала растений. Одной из характеристик АОА является степень перекисного окисления липидов (ПОЛ), как проявление неспецифической реакции в ответ на действие стресса. Растения с повышенной АОА представляют интерес как источник соединений-антиоксидантов. Системой для наиболее эффективного накопления ценных соединений может быть культура трансгенных корней, полученных в результате *Agrobacterium rhizogenes*-опосредованной трансформации.

Целью данной работы было определение АОА экстрактов из трансгенных корней *Althaea officinalis* L., полученных путем *A. rhizogenes*-опосредованной трансформации вектором с геном интерферона- $\alpha 2b$ человека (*ifn- $\alpha 2b$*), по накоплению малонового диальдегида (МДА) и диеновых конъюгатов (ДК) как характерных продуктов ПОЛ. Содержание МДА определяли по способности взаимодействовать с 2-тиобарбитуровой кислотой с образованием окрашенного продукта. Содержание ДК определяли по методу Кургановой и соавторами (1997).

Интенсивность образования МДА и ДК служит показателем активности перекисных процессов: наблюдается обратная зависимость между уровнем накопления этих продуктов ПОЛ и активностью антиоксидантной системы. Нами показано, что для всех исследуемых линий наблюдалось снижение уровня накопления МДА с $0,19 \pm 0,006$ до $0,040 \pm 0,001 - 0,13 \pm 0,01$ мкмоль/г липидов. Уровень накопления ДК во всех исследуемых линиях трансгенных корней оказался ниже в 2,3-23,1 раза, чем в корнях контрольных растений.

Таким образом, для трансгенных корней *A. officinalis* с геном *ifn- $\alpha 2b$* наблюдалось снижение интенсивности ПОЛ по сравнению с контролем и, соответственно, повышение АОА. Вероятно, это обусловлено наличием стрессовой реакции, связанной с генетической трансформацией (перенесением и местом встраивания генов, метаболической активностью их продуктов), а также с возможным повышением адаптивных способностей полученных трансгенных корней. Выяснение причин таких изменений физиологического состояния трансгенных корней *A. officinalis* и возможностей их практического применения требует более детального биохимического изучения.

DETERMINATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF EXTRACTS FROM *ALTHAEA OFFICINALIS* L. TRANSGENIC ROOTS

N.A. Matvieieva¹, K.O. Drobot¹, A.S. Potrochov², A.A. Potrochov¹, E.Y. Kvasko¹

¹Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of NAS of Ukraine
03680, Ukraine, Kyiv-143, Academica Zabolotnogo Str., 148

²Institute of Hydrobiology of NAS of Ukraine
04210, Ukraine, Kyiv-210, Gerojiv Stalingradu ave., 12,
e-mail: joyna56@gmail.com

Antioxidant activity (AOA) is one that indexes of physiological state of plants. The increase of AOA testifies stress reaction and the possibility of enhancement of plants adaptive potential. The degree of lipid peroxidation (LP) is the non specific stress response in plants and is one of the AOA characteristics. Plants with enhanceable AOA are interesting to produce the antioxidants. The transgenic root culture obtained by *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation may be the most effective system for accumulation of valuable compounds.

The investigation of AOA in *Althaea officinalis* L. transgenic roots obtained by *A. rhizogenes*-mediated transformation with vector system containing human interferon- α 2b gene (*ifn- α 2b*) was the aim of this study. The assay to determine AOA is based on the measurement of malondialdehid (MDA) content by the thiobarbituric acid test and conjugated dienes (CD) content as lipid peroxidation markers.

The intensity of MDA and CD formation shows the index of peroxidation activity: there is reverse dependence between the level of its accumulation and antioxidant system activity. MDA content of all investigated transgenic roots lines was decreased from 0.19 ± 0.006 (control roots) to 0.040 ± 0.001 - 0.13 ± 0.01 $\mu\text{mol/g}$ of lipids in the transgenic lines. The level of CD accumulation in all transgenic roots lines appeared to be 2.3-23.1 folds lower then CD content in the roots of control plants.

Thus, *A. officinalis* transgenic roots with *ifn- α 2b* gene were characterized by reducing of the intensity of lipid peroxidation compared to control and, accordingly, by increasing of AOA. Probably, the increasing of AOA is due to the presence of the stress reaction related to genetic transformation (genes transferring and integration, metabolic activity of their products), and also is to the possible increasing of adaptive capacities of the obtained transgenic roots. The causes of these changes in the physiological state of *A. officinalis* transgenic roots and the possibilities of their practical application require more detailed biochemical studies.

РАСТЕНИЯ ЭКВАДОРА КАК НОВЫЕ ОБЪЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Н.А. Матвеева¹, Galo Jacinto Pabón Garcés², Ludmila Starodub Sauliak²

¹Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины

06380, Украина, Киев, ул. ак. Заболотного 154

²Северный технический университет Эквадора

Ibarra-Ecuador, El Olivo, Av. 17 de julio, e-mail: joyna56@gmail.com

Биотехнология растений – современное направление исследований, изучающее возможности использования растений для решения технологических задач и создания растений с новыми ценными свойствами. Культивируемые *in vitro* клетки и органы растений могут быть высокотехнологичными объектами для получения биологически активных соединений, синтезируемых в растениях как естественным путем, так и вследствие активности перенесенных генов. Выбор объектов является важным подготовительным этапом, особенно в перспективе промышленного получения БАС, которые могут быть использованы в медицине, ветеринарии, косметологии и др. Представляют интерес нетрадиционные или малоизученные растения, в том числе растения из экзотических для европейцев регионов.

Одним из таких регионов является южноамериканское государство Эквадор. Растения Эквадора особенно интересны, поскольку климатические условия страны необычно разнообразны для экваториального региона. Значительные площади занимают высокогорные Анды, где, несмотря на высоту более 1000 метров над уровнем моря, растут влажные тропические леса, представленные растениями как тропических, так и космополитных видов. На территории Эквадора растут растения семейств Agavaceae, Amaranthaceae, Apiaceae, Asteraceae, Boraginaceae, Bromeliaceae, Fabaceae, Iridaceae, Lamiaceae, Liliaceae, Orchidaceae, Papaveraceae, Passifloraceae, Piperaceae, Poaceae, Rutaceae, Valerianaceae и др., которые используются населением для лечения простудных и воспалительных заболеваний, диареи, диабета, вирусных инфекций и т.д. Работа по изучению возможности использования растений Эквадора в биотехнологиях была начата нами с составления базы данных, в которую входят местные и видовые названия, местообитания, описание и использование. В высокогорье и в тропическом лесу (4000 м и 1400 м над уровнем моря) были собраны растения - объекты исследований, в том числе *Euphorbia laurifolia*, *Araucaria angustifolia*, *Cecropia peltata*, *Equisetum bogotense*, *Ruta graveolens*, *Croton lechleri*, *Selaginella sp*, *Dorobea pimpinellifolia*, *Usnea rabicunda*. Изучали антиоксидантную, антимикробную активности, содержание белка и фруктозосодержащих сахаров.

Первичный скрининг выделил растения *U. rabicunda*, водный экстракт которых угнетал рост *Bacillus subtilis*, а также *C. peltata*, экстракт которых имел высокую антиоксидантную активность, сопоставимую с активностью аскорбиновой кислоты, высокое содержание белка (16 мг/г массы) и фруктанов (180 мг/г массы). В дальнейшем предполагается использование культивируемых *in vitro* растений для изучения накопления БАС и их активности.

Выражаем признательность ректору Северного технического университета Эквадора доктору Miguel Edmundo Naranjo Toro за поддержку исследований.

EQUADORIAN PLANTS AS NEW OBJECTS FOR BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTION OF BIOACTIVE COMPOUNDS

N.A. Matvieieva¹, Galo Jacinto Pabón Garcés², Ludmila Starodub Sauliak²

¹Zabolotny Institute of Microbiology and Virology NAS of Ukraine
06380, Ukraine, Kyiv, ak. Zabolotny Str., 154

²Northern Technical University of Ecuador

Ibarra-Ecuador, El Olivo, Av. 17 de Julio, e-mail: joyna56@gmail.com

Plant biotechnology is the modern research area which includes the study of plants usage for technological application and for obtaining of plants with new valuable properties. *In vitro* cultivated plant cells and organs can be hi-technology model for production of bioactive substances (BAS) synthesized in plants both naturally and as a result of foreign genes activity. Selection of suitable objects (plant species) is an important biotechnological stage especially in the prospect of industrial production of BAS which can be used in medicine, veterinary science, cosmetology etc. The studies of untraditional or insufficiently known plants including plants from exotic for Europeans regions are of great interest.

Ecuador is located in South America. Territory of Ecuador is both in the Northern and in the Southern hemispheres, as a line of equator passes there. Therefore in some regions climate is equatorial, moist and warm. Flora of these territories is presented mainly the tropical plant species, although there are also cosmopolitan plants. Considerable part of territory of Ecuador is located in the mountains on height of more than 2000 meters. At the same time vegetation is variegated even in highland. Plants from Ecuador which survive in different climatic terms are of interest for biotechnological researches.

Agavaceae, Amaranthaceae, Apiaceae, Asteraceae, Boraginaceae, Bromeliaceae, Fabaceae, Iridaceae, Lamiaceae, Liliaceae, Orchidaceae, Papaveraceae, Passifloraceae, Piperaceae, Poaceae, Rutaceae, Valerianaceae plants which grow in the mountains and in the tropical forest are using in nontraditional Ecuadorian medicine for treatment of cold and inflammatory diseases, diarrhea, diabetes, viral infections. Our work on the study of possibility of Ecuadorian plants using in biotechnologies was started by the plants database formation. This database includes now such parameters as the local and specific plants' names, ecotope, description and plants usage in medicine. In some regions (Papallacta, 4000 m; La Favorita, 1400 m) the plant samples were collected including *Euphorbia laurifolia*, *Araucaria angustifolia*, *Cecropia peltata*, *Equisetum bogotense*, *Ruta graveolens*, *Croton lechleri*, *Selaginella sp*, *Dorobea pimpinellifolia*, *Usnea rabcunda* plants. *C. peltata* extracts were characterized with high antioxidant activity comparable with activity of ascorbic acid. The one were also characterized with high protein and fructans content (up to 16 mg/g and 180 mg/g respectively). *U. rabcunda* extract inhibited *Bacillus subtilis* growth. At a later date we plan the usage of *in vitro* cultivated plants for the study of BAS accumulation and activity.

We are grateful to doctor Miguel Edmundo Naranjo Toro, Rector of the North Technical University of Ecuador, for support of the researches.

ОКСИБЕНЗОЙНЫЕ КИСЛОТЫ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА НАКОПЛЕНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ *IN VITRO* РАСТИТЕЛЬНЫХ ТКАНЯХ

Т.Л. Нечаева, Н.В. Загоскина

Федеральное государственное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН,
127276, Россия, Москва, ул. Ботаническая, 35, e-mail: *phenolic@ippras.ru*

Уникальной особенностью высших растений является образование вторичных метаболитов, к числу которых относятся и разнообразные фенольные соединения (ФС). ФС значительно отличаются по структуре, химическим свойствам и биологической активности. Они участвуют в процессах фотосинтеза, дыхания, регуляции роста, а также защиты клеток от стрессовых воздействий. Высокая биологическая и антиоксидантная активность, характерная для многих ФС, вызывает большой интерес к этим вторичным метаболитам и способствует все более широкому их использованию в различных отраслях народного хозяйства.

К числу перспективных и уже успешно применяемых ФС относятся оксисбензойные кислоты, в частности салициловая кислота (СК), которую рассматривают как полифункциональную сигнально-регуляторную молекулу. Близким соединением СК по структуре является *n*-оксисбензойная кислота (ОК), функциональная роль которой исследована мало.

Для изучения экзогенного действия различных веществ, в том числе и фенольной природы, на клетки растений могут быть использованы культуры *in vitro*, имеющие более простой уровень внутриклеточной организации (по сравнению с интактными растениями) и растущие в строго контролируемых условиях. И в этом случае большой интерес вызывает каллусная культура чайного растения, характеризующаяся специализированным обменом, направленным на образование различных ФС.

Проведенные исследования показали отличия в действии СК и ОК (концентрации от 10^{-3} до 10^{-6} М) на накопление в каллусных культурах чая различных ФС, в том числе и характерных для интактного растения флаванов – веществ обладающих Р-витаминной капилляроукрепляющей активностью. Ответная реакция культур зависела от уровня внутриклеточной дифференциации, а именно наличия в них хлоропластов, являющихся одним из основных мест биосинтеза ФС. При их отсутствии (гетеротрофные культуры) ответная реакция клеток на действие ОБК, судя по накоплению в них ФС, была выражена в большей степени, чем при их наличии (фотомиксотрофная культура).

HYDROXYBENZOIC ACIDS AND THEIR INFLUENCE ON PHENOLIC COMPOUNDS ACCUMULATION IN *IN VITRO* CULTURED PLANT TISSUES

T.L. Nechaeva N.V. Zagoskina

Science Federal State Institution Institute of Physiology of Plants of K.A. Timiryazev of the Russian Academy of Sciences

127276, Russia, Moscow, Botanicheskaya St., 35, e-mail: *phenolic@ippras.ru*

Higher plants have an ability to the biosynthesis of secondary metabolites, which include phenolic compounds (PhC). PhC considerably different in their structure, chemical properties and biological activity. They are involved in the processes of photosynthesis, respiration, growth regulation, protection of cells from stress factors. High biological and antioxidant activity, typical for many PhC arouses great interest to these secondary metabolites and contributes to their use in various sectors of economy.

Among the promising and successfully applied PhC there are hydroxybenzoic acids, particularly salicylic acid (SA), which is considered as multifunctional signal-regulatory molecule. Its nearest analogue is the p-hydroxybenzoic acid (OA), which functional role is slightly investigated.

Callus cultures are suitable models for studying cell metabolism. They are preferably to the intact plants in a simpler organization of their cells and tissues and in an ability to tightly control their growth conditions. Tea plant callus cultures can be regarded as a suitable model for such studies, because they are characterized by a specialized metabolism aimed at the synthesis of various PhC.

Our researches have shown the differences in SA and OA (10^{-3} to 10^{-6} M) action on the accumulation of different PhC, including the typical for intact plants flavans - substances with the P-vitamin activity in callus cultures of tea. The response of cultures depends on the level of intracellular differentiation, namely the presence of chloroplasts, which are one of the main places of PhC biosynthesis. In case of their absence (heterotrophic culture) response of cells on the hydroxybenzoic acids influence, according to their accumulation of the PhC, was expressed to a greater extent than in their availability (fotomiksotrofnaya culture).

ЭФИРНЫЕ МАСЛА И ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ПРЯНО-АРОМАТИЧЕСКИХ И ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

А.Е. Палий, В.Н. Ежов, О.А. Гребенникова, Г.В. Корнильев,
И.Н. Палий, В.Д. Работягов, Н.В. Марко

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр
298648, Республика Крым, г. Ялта, e-mail: onlabor@yandex.ru

Структурное многообразие и широкий спектр физиологической активности веществ вторичного синтеза растений делает их незаменимой основой многих лекарственных препаратов. Актуальным является поиск нетоксичных, доступных и дешевых растительных источников биологически активных соединений. Целью нашей работы являлось изучение качественного и количественного состава эфирного масла и фенольных соединений ряда пряно-ароматических и лекарственных растений из коллекции НБС – ННЦ.

При помощи химических и хроматографических методов установлен качественный и количественный состав эфирного масла и фенольных соединений водно-этанольных экстрактов следующих видов: *Satureja montana* L., *Satureja hortensis* L., *Nepeta cataria* var. *citriodora* Beck., *Artemisia dracunculus* L., *Artemisia absinthium* L., *Elsholtzia stauntonii* Benth., *Scutellaria baicalensis* Georgi., *Echinacea angustifolia* DC., *Echinacea purpurea* (L.) Moench.

Содержание эфирного масла в растительных экстрактах колеблется в пределах 0,01 - 0,33 г/100 г (в пересчете на воздушно-сухое растительное сырье). Максимальные концентрации выявлены в экстрактах *S. montana* (0,33 г/100 г), и *A. dracunculus* (0,32 г/100 г); минимальные – в экстрактах *E. angustifolia* (0,02 г/100 г) и *S. baicalensis* (0,01 г/100 г).

Содержание фенольных соединений установлено в пределах от 1,3 г/100 г до 18,5 г/100 г. Максимальные концентрации фенольных веществ выявлены в экстрактах *S. baicalensis* (18,5 г/100 г) и *E. purpurea* (3,3 г/100 г), минимальные – в экстракте *S. hortensis* (1,3 г/100 г) и *A. absinthium* (0,8 г/100 г). Компонентный состав фенольных соединений представлен флавоноидами и гидроксикоричными кислотами. В экстрактах *A. absinthium* и *A. dracunculus* выявлены кумарины.

Из гидроксикоричных кислот во всех исследованных видах обнаружены кофейная, хлорогеновая кислота и ее изомеры, в некоторых растениях – изомеры розмариновой кислоты. Среди флавоноидов идентифицированы гликозиды флавонов: лютеолина, апигенина, акацетина, а также гликозиды флавонола кверцетина. Отдельно следует выделить *S. baicalensis* с уникальным набором флавоноидов, производных скутеллярина и байкалина.

На основании полученных данных выделены перспективные виды с повышенным содержанием биологически активных веществ – *S. baicalensis*, *N. cataria*, *E. purpurea*, *S. taurica*.

ESSENTIAL OILS AND PHENOL COMPOUNDS OF AROMATIC AND MEDICINAL PLANTS

A.E. Paliy, V.N. Yezhov, O.A. Grebennikova, G.V. Kornil'yev, I.N. Paliy, V.D. Rabotyagov, N.V. Marco

Nikitsky Botanical Gardens – National Scientific Centre

298648, Crimea, Yalta, e-mail: onlabor@yandex.ru

Structural diversity and a wide range of physiological active substances of plants' secondary synthesis make them indispensable basis of many medicines. Actual search is non-toxic, affordable and cheap plant sources of biologically active compounds. The aim of our work was to study the qualitative and quantitative composition of essential oils and phenol compounds in aromatic and medicinal plants from the collection of NBG – NSC.

Using chemical and chromatographic methods it has been set qualitative and quantitative composition of essential oils and phenol compounds in aqueous-ethanol extracts of some species - *Satureja montana* L., *Satureja hortensis* L., *Nepeta cataria* var. *citriodora* Beck., *Artemisia dracunculus* L., *Artemisia absinthium* L., *Elsholtzia stauntonii* Benth., *Scutellaria baicalensis* Georgi., *Echinacea angustifolia* DC., *Echinacea purpurea* (L.) Moench.

Content of essential oils in the plant extracts varies as 0.01 – 0.33 g/100 g (of air-dried plant material in terms). Maximum concentrations have been detected in the extracts of *S. montana* (0.33 g/100 g) and *A. dracunculus* (0.32 g/100 g); minimum – in the extracts of *E. angustifolia* (0.02 g/100 g) and *S. baicalensis* (0.01 g/100 g).

It has been found out that the content of phenol compounds is in the range of 1.3 to 18.5 g/100. Maximum concentration of phenol compounds has been found in the extracts of *S. baicalensis* (18.5 g/100 g), and *E. purpurea* (3.3 g/100 g), minimum – in the extract of *S. hortensis* (1.3 g/100 g) and *A. absinthium* (0.8 g/100 g). Component composition of phenol compounds is represented by flavonoids and hydroxycinnamic acids. In the extracts of *A. absinthium* and *A. dracunculus* some coumarins have been identified.

Through hydroxycinnamic acids in all the investigated species it has been found caffeic, chlorogenic acid and its isomers, in some plants – rosmarinic acid isomers. Among the flavonoids some glycosides of flavones have been identified: luteolin, apigenin, akatsetin and flavonol quercetin glycosides. We should also distinguish *S. baicalensis* with an unique composition of flavonoid derivatives - skutellyarin and baicalin.

Based on the results of investigation perspective species with higher content of biologically active substances – *S. baicalensis*, *N. cataria*, *E. purpurea*, *S. taurica* have been determined.

ЗНАЧЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА СЕЯНЦЕВ ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ДЛЯ МИКРОКЛОНИРОВАНИЯ *IN VITRO*

Л.В. Полякова, П.Т. Журова

Украинский НИИ лесного хозяйства и агролесомелиорации

Украина, г. Харьков, e-mail: *polyakova_lv@mail.ru*

Для оптимизации процесса микроклонирования сеянцев дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) применили изучение особенностей накопления вторичных метаболитов (гидролизуемые танины – ГТ, флавоноиды – ФЛ) и белка (Б) в листьях деревьев и сеянцев, как показателей устойчивости к внешним воздействиям. Оказалось, что между группами компонентов Б - ГТ, начиная с ювенильного возраста (2-6-месяцев), поддерживается устойчивая негативная корреляция, достигающая среднего уровня для насаждений возраста 100-300 лет. Благодаря устойчивости негативной связи каждую популяцию можно разбить на три биохимических фенотипа: 1-й - низкое содержание Б и высокое ГТ; 2 -й - высокий Б - низкое ГТ; 3-й - смешанные пропорции. Оказалось, что в ювенильных популяциях преобладают фенотипы 3- группы (45% выборки), в то время как в насаждениях старшего возраста их численность не выше 30%. Это показывает, что в процессе отбора более активно элиминируются биохимические фенотипы 3-й группы.

Другой важной группой компонентов являются ФЛ. В растительной клетке ФЛ активно участвуют в нейтрализации оксидных радикалов, возникающих в результате биотических и абиотических стрессов (Agati et al., 2012). Изучая ювенильные популяции дуба, нами проанализировано изменение содержания ФЛ за период активного инфицирования листьев мучнистой росой (2-6 месячного возраста). Выявлено, что наиболее уязвимыми были сеянцы с низким ($x - 1-2\sigma$), либо максимально высоким уровнем ФЛ ($x + 1-2\sigma$) в возрасте 2 месяцев. Кроме того, анализ состояния корневой системы клонально микроразмножаемых сеянцев показал, что высокое содержание ФЛ в листьях ингибирует развитие корневой системы эксплантов, а лучшие ростовые характеристики имели экспланты от сеянцев с низким уровнем ФЛ. Можно добавить, что работа с полусибовым потомством взрослых деревьев позволила рассчитать наследуемость сеянцами некоторых групп веществ (Houle, 1992). Оказалось, что в широком смысле наследуемость общего содержания Б находится на уровне 0.71 (600 лет) и 0.61 (300 лет), для ГТ этот показатель составил - 0.86 (600-лет) и 0.75 (300 лет). Группа ФЛ, напротив, дает низкие соответствующие показатели. Полученные данные показывают, что 1) для закрепления признаков содержания Б, ГТ можно использовать полусибовое потомство; 2) без биохимического анализа при клонировании *in vitro*, в случае низкого уровня содержания ФЛ в маточном материале, можно получить растения повышенной ростовой активностью, но с пониженной устойчивостью к действию внешних факторов.

BIOCHEMICAL ANALYSIS OF COMMON OAK SEEDLINGS WHICH IS USED FOR MICROCLONAL PROPAGATION *IN VITRO*

L.V. Polyakova, P.T. Jurova

Ukrainian institute of forest research and forest melioration named after G.M. Vysotsky

31024, Ukraine, Kharkov, Pushkinskaja, 86, e-mail: *polyakova_lv@mail.ru*

The peculiarity of correlation between some groups of second metabolites (hydrolysable tannins – HT) and first one (total content of protein – PR) showed their meaning for old forest stands and seedling populations in connection with selective pressure on some biochemical phenotypes. We determined three kinds of biochemical phenotypes and found that one of them - with deviation from negative correlation of HT-PR - is more susceptible to selective pressure. So it is possible to decrease the amount of such kinds of phenotypes among seedlings that used for micropropagation.

Next important group of second metabolites is flavonoids (FL). These compounds are very important for process of avoiding active forms of ROS from plant cell (Agati et al., 2012). Moreover, these compounds are connected with susceptibility of seedlings to *Macrospora alphytoides* infection and also with development of root system for 1.3-year old seedlings and for 5-month old microclonal explants in conditions *ex vitro*. The more active development of roots was noticed for explants from seedlings with low level of FL in leaves.

The offsprings (halfcibes) from oak plus-trees are often used for micropropagation. We used halfcibes from two old trees – 600-and 300-years old. Biochemical analysis was made for mature trees and population of their 2-6 month old offsprings. So we can determine heritability of some group of compounds (Houle, 1992). It appeared that level of heritability of total content of PR was 0.71 (600 year old tree) and 0.61 (300 years old). The same was for HT 0.86 (600-y) and 0.75 (300-y). On the contrary heritability of FL was very low. These data show that it is possible to take into account the level of PR and HT in seedlings (according to their mature tree) before using for micropropagation *in vitro*. Next important feature for seedlings is level of FL content. The very low FL level in leaves is good trait for explant development in tubes but this factor can decrease stability of future trees to the environmental conditions.

ИЗУЧЕНИЕ КОМПОНЕНТНОГО СОСТАВА ЭФИРНОГО МАСЛА ВИДОВ РОДА *NEPETA* L.

В.Д. Работягов, Ю.В. Аксенов, И.В. Митрофанова

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр,
298648, Республика, Крым, г. Ялта, пгт. Никита, e-mail: nbs1812@ukr.net

Знание особенностей химического состава эфирного масла конкретного вида рода *Nepeta* позволяет судить о перспективах его использования в различных отраслях деятельности человека, в том числе и в биотехнологии. Нами впервые представлена характеристика эфирных масел некоторых видов рода *Nepeta* L..

N. melissifolia. Эфирное масло – бесцветная легкоподвижная жидкость. В масле идентифицировано 13 основных компонентов, из которых доминирующими являются: β -пинен (10,10%), сабинен (2,16%), 1,8-цинеол (5,15-7,06%), β -кариофилен (3,36-5,96%), γ -мууролен (20,12-22,25%), октанон-3 (1,84-2,76%) и сумма непетолактонов (27,57%).

N. pubescens. Эфирное масло – легкоподвижная жидкость зеленовато-желтого цвета, с тонкой освежающей нотой. Идентифицировано 15 основных компонентов при доминировании следующих: β -пинен (5,11-7,44%), сабинен (3,93-5,39%), 1,8-цинеол (20,20-24,15%), β -кариофилен (2,26-4,36), γ -мууролен (6,14-8,25%), цитронеллол (20,80-25,26%) и сумма непетолактонов (5,06%).

N. olgae. Эфирное масло без цвета со слабым травянистым ароматом. В масле идентифицирован 21 компонент. Отмечены некоторые различия в составе эфирного масла в различных органах растения: в масле из листьев значительно больше цитронеллола (27,82% против 3,08% такового в соцветиях), несколько больше γ -мууролена (9,80 и 7,16% соответственно) и β -кариофилена (7,78 и 5,17% соответственно) и заметно меньше α -пинена (0,61 против 5,86%), β -пинена (24,19 против 40,06%), сабинена (10,09 против 13,24%) и суммы непетолактонов (3,63 против 18,20%).

N. reischenbachiana имеет эфирное масло светло желтого цвета с приятным травянисто цветочным ароматом. Идентифицировано 16 компонентов, из которых основными являются: цитронеллол (50,18-58,42%), геранилацетат (12,20-14,66%), гераниаль (4,04-5,86%), нераль (2,26-3,94%), 1,8-цинеол (3,03-3,57%), цитронеллаль (2,94-3,38%).

N. heldreichii. Эфирное масло желтовато-зелёного цвета с тяжелым запахом. В масле идентифицировано 9 основных компонентов. Доминирующими являются непетолактоны (в сумме 80,83%), эпинепетолактон (65,16-72,91%), неонепетолактон (5,73-7,12%), 1,8-цинеол (7,14-9,79%), цитронеллаль (4,80-5,05%).

N. latifolia имеет бесцветное эфирное масло, идентифицировано 11 компонентов при значительном доминировании непетолактонов – 88,26%, непетолактон до 39,79%, эпинепетолактон — до 40,60%, неонепетолактон — до 7,36% и неэпинепетолактон до 0,51%, β -кариофилена (1,66-2,64%), γ -мууролен (4,00-4,21%), октанон-3 (0,95-1,15%). Особенностью эфирного масла является присутствие 4 стереоизомеров непетолактона.

STUDY OF COMPONENT COMPOSITION OF ESSENTIAL OIL IN *NEPETA* L. SPECIES

V.D. Rabotyagov, Yu.V. Aksenov, I.V. Mitrofanova

Nikita Botanical Gardens – National Scientific Center
298648, Crimea, Yalta, e-mail: *nbs1812@ukr.net*

Knowledge of essential oil chemical composition peculiarities for particular species from genus *Nepeta* allows making conclusion about prospects of its use in different industries, including biotechnology. We gave the description of essential oils in some *Nepeta* L. species for the first time.

N. melissifolia. Essential oil is a colourless liquid. In essential oil 13 basic components have been identified, among which dominant are: β -pinen (10.10%), sabinen (2.16%), 1,8-tsineol (5.15-7.06%), β -kariofilen (3.36-5.96%), γ -muurolen (20.12-22.25%), oktanon-3 (1.84-2.76%) and sum of nepetolaktone (27.57%).

N. pubescens. Essential oil is a greenish-yellow liquid with thin refreshing note. There are 15 basic components identified as following: β -pinen (5.11-7.44%), sabinen (3.93-5.39%), 1,8-tsineol (20.20-24.15%), β -kariofilen (2.26-4.36%), γ -muurolen (6.14-8.25%), tsitronellol (20.80-25.26%) and sum of nepetolaktone (5.06%).

N. olgae. Essential oil is without any color, with weak grassy aroma. 21 components have been identified in the oil. Some distinctions in the composition of essential oil in the different organs of plant were marked: in oil from leaves considerably more tsitronellol (27.82% against 3.08% in inflorescences), some more γ -muurolen (9.80 and 7.16% respectively) and β -kariofilen (7.78 and 5.17% respectively) and notably less α -pinen (0.61 against 5.86%), β -pinen (24.19 against 40.06%), sabinena (10.09 against 13.24%) and sums of nepetolaktone (3.63 against 18.20%).

N. reischenbachiana has light yellow essential oil with pleasant grassy floral aroma. 16 components have been identified as basic: tsitronellol (50.18-58.42%), geranilatsetat (12.20-14.66%), geranial' (4.04-5.86%), neral' (2.26-3.94%), 1,8-tsineol (3.03-3.57%), tsitronellal' (2.94-3.38).

N. heldreichii. Essential oil is of yellow-green color with an oppressive smell. 9 basic components have been identified in oil. Dominant are nepetolaktone (in a sum 80.83%), epinepetolaktone (65.16-72.91%), neonepetolaktone (5.73-7.12%), 1,8-tsineol (7.14-9.79%), tsitronellal' (4.80-5.05%).

N. latifolia has colourless essential oil, 11 components have been identified with considerable prevailing of nepetolaktone – 88.26%, nepetolaktone up to 39.79%, epinepetolaktone – to 40.60%, neonepetolaktone – to 7.36% and neiepinepetolaktone to 0.51%, β -kariofilen (1.66-2.64%), γ -muurolen (4.00-4.21%), oktanon-3 (0.95-1.15%). The distinctive feature of the essential oil is a presence of 4 stereoisomers of nepetolaktone.

БИОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОМЫШЛЕННОГО ШРОТА ШИШЕК ХМЕЛЯ

Н.Е. Стадницкая¹, И.В. Павлюк¹, И.И. Думыч¹, Н.В. Толкачёва²,
Р.Н. Гулько¹, В.П. Новиков¹

¹Национальный университет «Львовская политехника»

Украина, г. Львов, e-mail: stadnytska@mail.ru

²Никитский ботанический сад - Национальный научный центр

298648, Республика Крым, г. Ялта, e-mail: tolkocheva_n@mail.ru

Существующая в мире проблема снижения природных ресурсов официальных растений для производства биологически активных препаратов для нужд сельского хозяйства, косметологии и фармации служит основой для поиска максимально рационального использования сырья. В связи с этим, мы изучали биохимический состав отработанного промышленного сырья шишек хмеля (*Humulus lupulus* L.).

В производственных условиях исходное сырье подвергалось экстракции 96%-ным этанолом, поэтому в качестве растворителей были использованы 70 и 40%-ные растворы этилового спирта и вода. Для чистоты эксперимента влажный шрот высушивали до содержания влаги 3-6% и только после этого экстрагировали. Отработанный шрот шишек хмеля и полученные экстракты были исследованы на качественное и количественное содержание различных групп биологически активных соединений. Количественное обнаружение содержания суммы флавоноидов проводили спектрофотометрическим методом, с перерасчетом на рутин. Методом тонкослойной хроматографии проводили идентификацию ксантогумола, гумулонов и лупулонов. Идентификацию флавоноидов и органических кислот проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Также проанализировали количество веществ, которые экстрагируются 70% этиловым спиртом из шрота. Атомно-эмиссионным спектральным анализом определяли количество микроэлементов и макроэлементов. Количественное содержание суммы полифенольных соединений и аминокислот определяли спектрофотометрическим методом. Также методом тонкослойной хроматографии определяли содержание аминокислот.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в сравнении с нативным сырьем, исследуемый шрот содержит в незначительных количествах эфирное масло, ксантогумол, гумулон и лупулоны. В исследуемых образцах обнаружены такие микроэлементы как: железо, марганец, медь, цинк, кобальт, хром, кадмий и макроэлементы: магний, калий, натрий. Идентифицированы такие соединения, как рутин, гиперозид, лютеолин, апигенин, апигенин-7-глюкозид, аминокислоты. В результате проведенных исследований можно сделать вывод, что производственные отходы шишек хмеля целесообразно повторно использовать с целью извлечения биологически активных веществ.

BIOCHEMICAL ANALYSIS OF INDUSTRIAL WASTE HOP CONES

**N.E. Stadnytska¹ , I.V. Pavlyuk¹, I.I. Dumych¹, N.V. Tolkacheva²,
R.N. Gulko¹, V.P. Novikov¹**

¹National University "Lviv Polytechnic"

Ukraine, Lviv, e-mail: *stadnytska@mail.ru*

²Nikitsky Botanical Garden – National Scientific Center,
Crimea, Yalta, e-mail: *tolkocheva_n@mail.ru*

The existing problem of reducing the world's natural resources officinal plants for production of biologically active compounds (BAC) for agriculture, cosmetics and pharmacy serves as a basis for finding the most efficient use of raw materials. In this regard, we have started to study the biochemical composition of the waste feedstock hop cones (*Humulus lupulus* L.).

Under production conditions, the feedstock was subjected to extraction with 96% ethanol, so we used as solvents 70 and 40% solutions of ethanol, and water . In order for clarity of experiment wet seed cake was dried to a moisture content of 3-6%. It was extracted only thereafter.

We have investigated the spent seed cake hop cones and the extract we have analyzed before for qualitative and quantitative analysis of different groups of BAC.

Quantitative detection of the total content of flavonoids was carried out by spectrophotometry, translated by rutin. TLC was carried out to identify xanthohumol, humulones and lupulones. The identification of flavonoids and organic acids were determined by HPLC. Also we have analyzed the amount of substances that are extracted with 70% ethanol seed cake. Atomic emission spectral analysis determined the number of microcells and macrocells magnesium, potassium, sodium. Quantitative content of polyphenolic compounds and amino acids was carried out by spectrophotometry. TLC also determined the content of essential and nonessential amino acids.

These results indicate that, in comparison with native raw materials, analyzed seed cake contains small amounts of volatile oil, xanthohumol and lupulones humulone. In the studied samples revealed trace elements such as Fe, Mn, Cu, Zn, Co, Cr, Cd and macronutrients: Mg, K, Na. It has been identified rutin, hyperoside, luteolin, apigenin, apigenin -7- glucoside, a number of amino acids.

The studies we can conclude that the industrial waste hop cones can be reused to produce BAC.

ВЛИЯНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НА ПОЛУЧЕНИЕ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР ТИСА ЯГОДНОГО *IN VITRO*

Л.М. Теплицкая, А.И. Сидякин

Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского
Республика Крым, Симферополь, e-mail: *Lm_teplitskaya@ukr.net*

В настоящее время среди комплекса мероприятий, направленных на сохранение и рациональное использование растительных ресурсов Крымского полуострова особое место принадлежит биотехнологическим подходам, основанным на выращивании растительных клеток и тканей в условиях *in vitro*.

Значительная часть проблем может быть решена путем разработки биотехнологических методов ускоренного и эффективного размножения растений, создание банков клеточных культур.

Тис ягодный (*Taxus bacata*) привлекает к себе внимание благодаря способности синтезировать таксол – уникальный дитерпеновый алкалоид, который используется в химиотерапии, обладает антимитотическим механизмом действия.

Целью работы являлось получение клеточных культур тиса ягодного и изучение влияния биологически активных веществ на морфогенез в культуре *in vitro*.

В результате проведенных исследований определены оптимальные условия введения в культуру тканей и органов тиса ягодного и их культивирования *in vitro*. Для индукции каллусогенеза и длительного культивирования модифицированы варианты питательных сред Гамборга и Эвелега (В5) по концентрации регуляторов роста: ИУК (4,0 мг/л), 2,4-Д (2,0 мг/л), БАП (1,0 мг/л). Проведен цитоморфологический анализ клеток каллусной культуры и отобраны морфогенные штаммы. Показано влияние регуляторов роста на гистогенез и морфогенез культуры. Определены оптимальные стимуляторы роста, способствующие корнеобразованию мериклонов в условиях *in vitro* и *in vivo*.

INFLUENCE OF BIOLOGICALLY ACTIVE AGENTS ON OBTAINING AND CULTIVATION OF *TAXUS BACCATA* CELL CULTURES *IN VITRO*

L.M. Teplitskaya, A.I. Sidyakin

National Taurida V. I. Vernadsky University

Crimea, Simferopol, e-mail: *Lm_teplitskaya@ukr.net*

It was obtained *Taxus baccata* cell cultures and investigated the influence of biologically active substances on its morphogenesis *in vitro*. We determined optimum conditions for introduction and cultivation of *T. baccata* tissues and organs *in vitro*. The concentration of growth regulators in Gamborga-Evelega nutrient mediums (B5) is being modified for induction of callus formation and its long cultivation: IAA (4,0 mg/l), 2,4-D (2,0 mg/l), BA (1,0 mg/l). The analysis of cytomorphological characteristics of callus cultures was carried out and morphogenic strains were isolated. It was shown the influence of growth regulators on histogenesis and morphogenesis of *T. baccata* cultures. The optimal growth stimulators that facilitate rooting clones in *in vitro* and *in vivo* conditions were defined.

СТИМУЛЯЦИЯ ПРОДУКТИВНОСТИ РАСТЕНИЙ АБРИКОСА СТЕРОИДНЫМИ ГЛИКОЗИДАМИ ТРИГОНЕЛЛОЗИД И ЛИНАРОЗИД

Н.В. Титова, Н.Е. Машенко

Институт Генетики, Физиологии и Защиты Растений АН Молдовы
2002, Республика Молдова, Кишинев, ул. Пэдурий, 20,
e-mail: nvtitova1941@gmail.com

На протяжении ряда лет изучали влияние ростактивирующих соединений стероидного типа, полученных из растений *Trigonella foenum greacum* L. и *Linaria vulgaris* Mill. на растения абрикоса. Высокая отзывчивость растений, подверженных такому экзогенному воздействию, проявилась в активизации роста надземных органов и корневой системы, увеличении содержания пигментов, интенсивности фотосинтеза и метаболических процессов, связанных с активностью оксидоредуктаз, что способствует более полной реализации потенциальных возможностей в фотосинтетической продуктивности растений.

В питомнике Института Садоводства и в условиях лизиметров ИГФЗР изучали подвойные сеянцы, однолетние привитые саженцы, а также четырехлетние, плодоносящие растения абрикоса сорта Костюженский. В фазу активного роста в начале мая опытные растения опрыскивали 0,01% водными растворами тригонеллозида и линарозида и контрольные – водой. Через 7-10 суток после обработки и далее в течение вегетации определяли интенсивность фотосинтеза, состояние пигментного фонда, содержание углеводов, активность оксидоредуктаз. В конце вегетации учитывали рост и биомассу надземных органов и корней, рассчитывали параметры фотосинтетической продуктивности: листовой индекс, фотосинтетический потенциал и чистую продуктивность фотосинтеза. Учитывали урожай у плодоносящих растений.

Стимулирующее действие изучаемых препаратов наглядно выражено в увеличении ростовых характеристик у сеянцев и однолетних саженцев (высота, диаметр штамба, объём корневой системы) на 20-22% от контроля, что является определяющим для качества посадочного материала. Под влиянием стероидных гликозидов донорно-акцепторные отношения сдвигаются в сторону аттрагирующей функции корневой системы. Такие изменения коррелировали с увеличением значений листового индекса, фотосинтетического потенциала и чистой продуктивности фотосинтеза исследуемых растений абрикоса. Это подтверждают данные по урожайности растений. К примеру, масса одного плода и урожай на одном растении абрикоса, обработанном линарозидом, превышали контроль соответственно на 7% и 20%. Использование обработки растений абрикоса натуральными препаратами тригонеллозид и линарозид рекомендовано как эффективный способ стимулирования фотосинтетической деятельности, способствующей более полной реализации потенциальной продуктивности.

STIMULATION OF APRICOT PLANT PRODUCTIVITY THROUGH STEROIDAL GLYCOSIDES TRIGONELLOZID AND LINAROZID

N.V. Titova, N.E. Mashcenko

Institute of Genetics, Physiology and Plant Protection, Academy of Sciences of Moldova

2002, Moldova, Kishinev Padurea Str. 20, e-mail: nvtitova1941@gmail.com

Within a few years the influence of the activating growth steroidal compounds from plants *Trigonella foenum greacum* L. and *Linaria vulgaris* Mill. on apricot plants was studied. High responsiveness of plants, exposed to such exogenous effects, manifested in enhancing growth of the above-ground organs and root system, increasing of the pigment content, the rate of photosynthesis and metabolic processes, associated with the activity of oxidoreductases, that promotes better realization of the potential photosynthetic efficiency of plants.

In the nursery of Horticulture Institute and controlled conditions lysimeters IGPPP rootstock seedlings, grafted annuals plants, as well as four-year fruiting plants apricot varieties Kostujensky were studied. In the phase of active growth in early May the test plants were sprayed with trigonellozid and linarozid 0.01% water solutions and control – with water. 7-10 days after treatment and then during the growing season the rate of photosynthesis, the state of pigment fund, carbohydrates content, the activity of oxidoreductases were determined. At the end of the growing season the growth of above-ground organs and roots biomass were taken into account, such parameters of photosynthetic productivity as leaf index, photosynthetic potential and net photosynthetic productivity were calculated. The yield in plants was taken into account.

The stimulatory effect of the studied substances was clearly expressed in the increase of growth characteristics (height, diameter of the trunk, the volume of the root system) in seedling and grafted annuals apricot plants by 20-22% compared with the control, that is decisive for the quality of planting material. Under the influence of steroidal glycosides sink-source relations shifted towards acceptor function of the root system. These changes correlated with increasing values of leaf area index, photosynthetic potential and net photosynthetic productivity of the studied apricot plants. This is confirmed by data on the productivity of plants. For example, the weight per fruit and yield per apricot plant, treated with linarozid, exceeded the control by 7% and 20% respectively. Using the treatment of apricot plants with natural preparations trigonellozid and linarozid is recommended as an effective method to stimulate the photosynthetic activity, conducive to the full realization of potential productivity.

СИРОП МИРТА – НОВЫЙ ПРОДУКТ ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ

Н.В. Толкачева¹, В.Н. Ежов¹, Е.З. Комаровская-Порохнявец²,
В.П. Новиков²

¹Никитский ботанический сад – Национальный научный центр
Республика Крым, Ялта, e-mail: tolkacheva_n@mail.ru

²Национальный университет «Львовская политехника»
Украина, Львов, e-mail: vnovikov@polynet.lviv.ua

В настоящее время наблюдается рост воспалительных заболеваний верхних дыхательных путей, трахеи, бронхов, легких. В связи с этим поиск новых эффективных и безопасных лекарственных средств для их лечения и профилактики является актуальной задачей. Обладая сильными фитоцидными, бактерицидными, иммуностимулирующими свойствами, настои, экстракт и порошок из сухого листа мирта *Myrtus communis* L. в народной медицине применяется при бронхите, астме, туберкулезе. Одно из перспективных направлений такого поиска – разработка новых диетических добавок, выгодно отличающихся от синтетических лекарственных средств низкой токсичностью.

В НБС – ННЦ разработаны образцы сиропов мирта с массовой долей экстракта мирта в сахарном сиропе 5%, 10%, 15%, 20%, а также образец, содержащий 15% экстракта мирта с добавлением аскорбиновой кислоты из расчета 400 мг на 100 см³ сиропа. Изучена фунгицидная и бактерицидная активность данных образцов. В экспериментах использовались следующие тестовые культуры: бактерии *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* и грибы *Candida tenuis*, *Aspergillus niger*. В качестве контрольных образцов использовали чистый сахарный сироп, а также 70 %-ный спиртовой экстракт листьев мирта. В ходе биологических испытаний установлено, что большинство исследуемых образцов проявили фунгистатический эффект относительно гриба *A. niger* и бактерицидный – по отношению к бактерии *S. aureus*. В то же время *C. tenuis* и *E. coli* оказались резистентными к действию сиропа.

Таким образом, учитывая результаты биологических испытаний, а также на основе определения органолептических показателей образцов сиропа мирта, выбран оптимальный вариант – сироп с массовой долей экстракта мирта 15% и добавлением аскорбиновой кислоты.

На опытном производстве НБС – ННЦ выпущена экспериментальная партия нового продукта, полное освоение которого планируется в 2014 году.

MYRTLE SYRUP – A NEW PREVENTIVE ACTION PRODUCT

**N.V. Tolkachova¹, V.N. Ezhov¹, O.Z. Komarovska-Porokhnyavets²,
V.P. Novikov²**

¹Nikitsky Botanical Gardens – National Scientific Centre
Crimea, Yalta, e-mail: tolkacheva_n@mail.ru

²Lviv Polytechnic National University
Ukraine, Lviv, e-mail: vnovikov@polynet.lviv.ua

Currently, a number of inflammatory diseases of the upper respiratory tract, trachea, bronchi and lungs is increasing. In this regard, the search for new effective and safe drugs for its treatment and prevention is an urgent task. Having strong phytoncidal, bactericidal and immunostimulatory properties, tinctures, extracts and powder from dry leaf of myrtle *Myrtus communis* L. is used in folk medicine for bronchitis, asthma and tuberculosis treatment. One of the promising areas of the search is the development of new dietary supplements, favorably distinguishes with low toxicity from synthetic drugs.

In NBG – NSC syrups samples with a mass fraction of myrtle extract 5%, 10%, 15%, 20% in sugar syrup, and the sample containing 15% of myrtle extract with addition of 100 mg ascorbic acid per 400 cm³ of syrup were developed. The fungicidal and bactericidal activities of these samples were studied. The following test cultures – bacteria *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and fungi *Candida tenuis*, *Aspergillus niger* were used in the experiments. As a control samples, pure sugar syrup, as well as 70% alcoholic extract of myrtle leaves were used. The biological test revealed that the majority of the samples showed fungistatic effect against *A. niger* and bactericidal – against *S. aureus*. Meanwhile, *C. tenuis* and *E. coli* were resistant to the action of the syrup.

Thus, considering the biological test results, as well as determining the organoleptic characteristics of myrtle syrup samples, the best option – the syrup with 15% mass fraction of myrtle extract and the addition of ascorbic acid were selected.

At the NBG – NSC pilot plant experimental batch of a new product was released. Its complete mastery is planned for 2014.

ОСОБЕННОСТИ НАКОПЛЕНИЯ ФЛАВОНОИДОВ В ТКАНЯХ *STEVIA REBAUDIANA* BERT. В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Л.М. Шпак, О.И. Дзюба, Дж.Б. Рахметов

Национальный ботанический сад им.Н.Н.Гришко НАН Украины

Украина, Киев, e-mail: shpak_lesya_kiev@mail.ru

Стевия (*Stevia rebaudiana* Bertoni) - многолетнее травянистое растение, листья которого содержат ряд дитерпеновых стевиол-гликозидов, веществ с высокой подслащивающей способностью и обладают уникальными свойствами: они не токсичны, низкокалорийны, не имеют мутагенной активности, к ним не наблюдается привыкания, как к традиционным подсластителям - ксилиту и сорбиту. Эти свойства делают стевию чрезвычайно перспективной для использования в качестве заменителя сахара.

Кроме того, стевия содержит белки, минералы: фосфор, железо, натрий, магний, хром, кобальт, селен, танины, витамины: аскорбиновую кислоту, провитамин А, тиамин, рибофлавин. Последнее время много внимания уделяется изучению антиоксидантных свойств стевии.

Известно, что флавоноиды обнаруживаются в проростках на 2-3 сутки. Исходя из этого, целью наших исследований было изучение количественного и качественного содержания флавоноидов в тканях стевии и динамики их накопления. Особенное внимание мы уделили изучению растений в культуре *in vitro* поскольку размножение стевии *in vitro* весьма актуально в связи с трудностью образования полноценных семян, высокими затратами по их сбору, а также их низкой фертильностью и почти полной потерей всхожести при хранении. Применение этого метода значительно увеличивает коэффициент размножения по сравнению с обычным черенкованием, позволяет получать свободные от болезней растения при сохранении генетической однородности и стабильности.

Содержание флавоноидов определяли по методике разработанной Санкт-Петербургской государственной химикофармацевтической академией, а качественный состав – методом тонкослойной хроматографии.

Наибольшее количество флавоноидов было выявлено в листьях взрослых растений до периода цветения - 0,56-0,64 мг%. В листьях растений выращенных *in vitro* выявлено 0,6 – 0,63 мг%, а в калусе – около 0,14 мг% флавоноидов. Что касается качественного состава, то основным флавоноидом является рутин, обнаружены также следы кверцетина.

THE FEATURES OF FLAVONOIDS ACCUMULATION IN *STEVIA REBAUDIANA* BERT. TISSUES DEPENDING ON CULTIVATION CONDITIONS

L. Shpak, O. Dzyuba, D. Rakhmetov

M.M. Gryshko National Botanical Garden of NAS of Ukraine

Ukraine, Kiev, e-mail: shpak_lesya_kiev@mail.ru

Stevia (Stevia rebaudiana Bertoni) – the perennial grassy plant, which leaves contain a number of diterpenovy steviol-glycosides, substances with high sweetening ability. It possesses unique properties, as follows: they are non-toxic, low-calorie, have no mutagenic activity, habituation to them was not observed, as to traditional sweeteners (xylite and sorbite). These properties make stevia extremely perspective for use as sugar substitute for people.

Besides, stevia contains proteins, minerals (phosphorus, iron, sodium, magnesium, chrome, cobalt, selenium, tannins), vitamins (ascorbic acid, pro-vitamin A, thiamine, riboflavin). A lot of attention is paid recently to antioxidant properties of a stevia.

In accordance with literature data flavonoids have been found in 2-3 day old sprouts. Proceeding from this, the purpose of our researches was studying of quantitative and qualitative content of flavonoids in stevia tissues and organs together with its comparative characteristics depending on cultivation conditions.

We paid special attention to study of plants cultured *in vitro* due to actuality of stevia propagation using this method. It relates to difficulties of stevia cultivation in open ground (low percentage of high-grade seeds, rapid loss of their germination during storage, high expenses on seeds and vegetative mass harvesting). Application of this method considerably increases reproduction factor in comparison with usual rooting of shoot cuttings, allows to receive pathogen free plants along with preservation of genetic uniformity and stability.

We determined the flavonoids content by using methodology developed in St. Petersburg state chemical pharmaceutical academy. Qualitative composition was determined by thin layer chromatography method.

The greatest number of flavonoids was revealed in leaves of adult plants till the flowering period – 0.56-0.64 mg%. In leaves of plants cultivated *in vitro* – 0.6-0.63 mg%, and in callus – about 0.14 mg% of flavonoids are revealed. In regard to qualitative composition, the greatest part of flavonoids is presented by rutin, quercetin traces were also found.

СЕКЦИЯ 6.
SECTION 6.

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ РАЗВИТИЯ И
УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ

PHYSIOLOGICAL ASPECTS OF PLANTS
DEVELOPMENT AND RESISTANCE

ВЗАИМОСВЯЗЬ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ *IN VIVO* И *IN VITRO* У ИЗОГЕННЫХ ЛИНИЙ ПШЕНИЦЫ

О.А. Авксентьева, В.В. Жмурко

Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина
61022, Украина, г. Харьков, Пл. Свободы 4, e-mail: avkentyeva@rambler.ru

Основой физиолого-биохимической регуляции роста и развития растений является комплементарная система трофических, фитогормональных и энзиматических факторов. Важным компонентом этой системы является генетическая регуляция, которая у пшеницы мягкой *Triticum aestivum* L. представлена двумя основными системами генов, детерминирующими темпы ее развития - гены *VRN* (потребность в яровизации, тип развития яровой/озимый) и гены *PPD* (фотопериодическая чувствительность). У многих растений способность к каллусогенезу и темпы роста каллуса являются генетически детерминированными признаками. Клетки каллусной ткани высших растений, наряду с приобретением новых специфических свойств, способны сохранять свойства, характерные для растений в условиях *in vivo*. Целью наших исследований было изучение взаимосвязи физиолого-биохимических процессов регуляции роста и развития растений *in vivo* и в культуре *in vitro*. Материалом для исследований служили почти изогенные моно-геннодоминантные линии по генам контроля типа развития *VRN* (vernalization) и фотопериодической чувствительности *PPD* (photoperiod), а также полностью рецессивный по всем этим генам сорт Мироновская 808.

Результаты изучения физиолого-биохимических процессов, определяющих темпы развития исследуемых изолиний в условиях *in vivo*, показали, что быстроразвивающиеся линии по сравнению с медленно развивающимися характеризуются более высоким содержанием углеводов, ростстимулирующих фитогормонов, повышенной активностью оксидоредуктаз в листьях и апикальных меристемах. При исследовании данных генетических систем в условиях *in vitro* установлено, что медленно развивающиеся изолинии независимо от типа выбранного экспланта эффективнее вводятся в культуру *in vitro*, характеризуются более высоким потенциалом первичного каллусогенеза, скоростью роста каллусных тканей, оводнённостью, накоплением биомассы. Быстроразвивающиеся изолинии характеризовались более высокими показателями проявления разных форм морфогенного потенциала – геммогенеза, гемморизогенеза и соматического эмбриоидогенеза. Таким образом, полученные данные дают основание предполагать, что процессы физиолого-биохимической и генетической регуляции роста и развития растений *in vivo* и в культуре *in vitro* взаимосвязаны. Гены *VRN* и *PPD*, определяющие скорость развития растений в условиях *in vivo* участвуют в детерминации процессов морфогенеза *in vitro*.

INTERRELATION OF PHYSIOLOGO-BIOCHEMICAL PROCESSES *IN VIVO* AND *IN VITRO* AT ISOGENIC LINES OF WHEAT

O.A. Avksentyeva, V.V. Zhmurko

V.N. Karazin Kharkov National University

61022, Ukraine, Kharkov, Svoboda Sq. 4, e-mail: avkentyeva@rambler.ru

The basis of physiologo-biochemical regulation of growth and development of plants is a complementary system of trophic, phytohormonal and enzymatic factors. The important component of this system is genetic regulation, which in soft wheat *Triticum aestivum* L. is presented by two main systems of genes determining the rates of its development – *VRN* genes (necessity for vernalization, development type spring/winter) and *PPD* genes (photoperiodic sensitivity). Ability to callusogenesis of many plants and growth rates of callus are genetically determined features. Cells of callus tissues of the highest plants along with acquisition of new specific properties are capable to keep properties characteristic for plants under conditions *in vivo*. The aim of our researches was the studying of interrelation of physiologo-biochemical processes of growth regulation and development of plants *in vivo* and in culture *in vitro*. Almost isogenic monogenedominant lines by control genes of development of *VRN* (vernalization) and photoperiodic sensitivity of *PPD* (photoperiod) and also completely recessive in all these genes Mironovskaya 808 cultivar served as the material for our researches. The results of studying of physiologo-biochemical processes defining development rates of the studied isolines under conditions *in vivo* showed that rapidly-developing lines in comparison to slowly-developing are characterized by higher content of carbohydrates, the growth-stimulatory phytohormones, hyperactivity of oxidoreductases in leaves and apical meristems. At the research of genetic systems data under conditions *in vitro* it is established that slowly-developing isolines irrespectively of type of the chosen explantare more effectively entered into culture *in vitro* characterized by higher potential primary callusogenesis, growth rate of the callus tissues, water cut and biomass accumulation. Rapidly-developing isolines were characterized by higher rates of manifestation of different forms of morphogenic potential – gemmogenesis, gemmorisogenesis and somatic embryoidogenesis. Thus, the obtained data give the grounds to assume that processes of physiologo-biochemical and genetic regulation of growth and development of plants *in vivo* and culture *in vitro* are interconnected. Genes *VRN* and *PPD* determining development rates of plants under conditions *in vivo* participate in determination of processes of morphogenesis *in vitro*.

ФОТОСИНТЕТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЛИСТЬЕВ ВЕЧНОЗЕЛЕННЫХ ЖИМОЛОСТЕЙ В УСЛОВИЯХ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО СТРЕССА

В.А. Браилко

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр
298648, Республика Крым, г. Ялта, e-mail: *valentine.brailko@yandex.ua*

Вечнозеленые кустарники обеспечивают постоянную структуру в саду и вызывают круглогодичный интерес. Однако их листья могут пострадать во время суровых условий зимы. Когда температура превышает адаптационные возможности хлорофилл-белковых комплексов, происходят необратимые нарушения функционального состояния фотосинтетического аппарата, что выражается в повреждениях тканей листа, и, следовательно, сказывается на декоративных качествах растения (Ottander, 1995; Gamper et al., 2000; Будаговская, 2013). Нарушения в первичных процессах фотосинтеза непосредственно отражаются в изменении флуоресценции хлорофилла и проявляются задолго до видимых ухудшений физиологического состояния растения, что позволяет точнее определить температуры и длительность их экспозиции, приводящие к повреждениям структуры и функций тканей листа (Корнеев, 2002). Таким образом, целью работы было исследование фотосинтетической активности листьев вечнозеленых видов жимолости (*Lonicera japonica* Thunb., *L.pileata* Oliv.), и садовой пестролистной формы *L. pileata* 'Variegata' в связи с адаптацией фотосинтетического аппарата к низкотемпературному стрессу. Исследования проводились в холодный период (февраль 2014 года). Показатели индукции флуоресценции хлорофилла определяли с помощью портативного флуориметра «Флоротест». Листья исследуемых растений подвергали воздействию температур 0°C; -5°C; -7,5°C; -10°C; -2°C; -14°C (экспозиция 30 мин.). Потом адаптировали к температурам от +5 до +8°C, после чего измеряли индукционные кривые. Эффективность фотохимического преобразования энергии в фотосистеме-2 рассчитывали по формуле $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$ (Shereiber et al., 1995).

Высокой удельной фотосинтетической активностью (ФА) (F_v/F_m) характеризуются листья *L. japonica* и *L. pileata* – 0,61 и 0,74 соответственно до начала воздействия мороза, ниже данный показатель у *L. pileata* 'Variegata' – 0,54. Снижение ФА проявляется у *L. japonica* при -14°C ($F_v/F_m=0,50$), у *L. pileata* при -10°C ($F_v/F_m=0,64$), у *L. pileata* 'Variegata' при -7,5°C ($F_v/F_m=0,52$). Критерием инактивации низкой температурой тканей листа является снижение показателя $F_v/F_m \leq 0,3$ (Будаговская, 2013). Выявлено, что это состояние характерно для *L. pileata* при -14°C, *L. pileata* 'Variegata' при -12°C. Таким образом, среди исследованных вечнозеленых жимолостей фотосинтетический аппарат листьев *L. japonica* обладает высокой низкотемпературной устойчивостью, а у пестролистной формы *L. pileata* 'Variegata' наиболее подвержен повреждению морозами.

PHOTOSYNTHETIC ACTIVITY IN THE LEAVES OF SOME EVERGREEN *LONICERA* SPECIES UNDER THE LOW-TEMPERATURE STRESS

V.A. Brailko

Nikitsky Botanical Gardens – National Scientific Center

Crimea, Yalta, e-mail: valentine.brailko@yandex.ru

Evergreen shrubs form the constant structure in the gardens and are attractive all the year round. However, their leaves could be damaged under the strong winter conditions. When the air temperature indexes exceed adaptive abilities of chlorophyll-albumen complexes irreversible violations in the functional state of photosynthetic apparatus take place. It results in leaf tissues damages and so reduces the decorative qualities of plants (Ottander, 1995; Gamper e.a., 2000; Budagovskaya, 2013). Violations in the initial processes of photosynthesis appear directly in the changes of chlorophyll fluorescence long before visible worsening in physiological state of the plant and that let to determine temperatures and their exposition duration resulting in the damages of leaf tissues structure and functions more strongly. So the aim of our work was to study photosynthetic activity in the leaves of some evergreen *Lonicera* species (*Lonicera japonica* Thunb., *L.pileata* Oliv.), and one garden variety *L. pileata* 'Variegata' in the connection with photosynthetic apparatus adaptation to the low temperature stress. Those investigations have been carried out during the cold period of the year (February, 2014). Indexes of chlorophyll fluorescence induction have been measured with the handheld fluorometer "Floratest". Leaves of the studied plants were under the influence of the low temperatures 0°C; -5°C; -7,5°C; -10°C; -12°C; -14°C (30 min exposition) with further adaptation to the temperatures from +5 to +8°C and then induction curves were measured. Efficiency of photochemical transformation of the energy in photosystem-2 has been calculated by the formula $F_v/F_m=(F_m-F_0)/F_m$ (Shereiber et al., 1995).

High specific photosynthetic activity (PA) (F_v/F_m) before the frost influence is characteristic of *L. japonica* and *L. pileata* leaves – 0.61 and 0.74, correspondently and this index is low in *L. pileata* 'Variegata' - 0.54. PA decreasing has been noticed in *L. japonica* under the temperature -14°C ($F_v/F_m=0.50$), in *L. pileata* under -10°C ($F_v/F_m=0.64$), in *L. pileata* 'Variegata' under -7.5°C ($F_v/F_m=0.52$). Criterion of leaf tissues inactivation by the low temperature is the decreasing of the index $F_v/F_m \leq 0.3$ (Budagovskaya, 2013). It has been found out that this state is characteristic for *L. pileata* under -14°C, *L. pileata* 'Variegata' under -12°C. Thus, among the studied evergreen *Lonicera* species leaf photosynthetic apparatus in *L. japonica* has high resistance to the low temperatures and in *L. pileata* 'Variegata' it's the most vulnerable under the frost influence.

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ АЛЛЕЛОХИМИКАЛИЙ ЭРГАЗИОФИГОФИТА *HERACLEUM SOSNOWSKYI* MANDEN НА КУЛЬТУРНЫЕ РАСТЕНИЯ

С.Н. Бударин, Ю.С. Ларикова, М.Н. Кондратьев

РГАУ-МСХА имени К.А.Тимирязева

Россия, Москва, Тимирязевская, 49, e-mail: Phys1976@google.com

Борщевик Сосновского (*Heracleum sosnowskyi* Manden) за последние 20-25 лет, в связи с резким увеличением числа «дичающих» агроэкосистем в ряде районов Московской области, из ранга эргазиофитов всё с большей убедительностью относится к инвазивным видам. Неконтролируемое распространение борщевика Сосновского из стадии простой фиксации явления перешло в этап приближающейся экологической катастрофы. Данный вид обладает всеми признаками инвазивности, за исключением одного: до настоящего времени нет ясности в том, является ли борщевик Сосновского источником аллелопатических соединений (аллелохимикалий).

Исследования проводились на семенах и проростках культурных и лекарственных растений, соответственно, родов (*Triticum*, *Pisum*, *Solanum*, *Brassica*) и (*Calendula*, *Valeriana*, *Carum*). Семена тест-растений, в разных соотношениях с плодами борщевика, проращивали в термостате, а затем проростки росли на свету (Na - лампы высокого давления).

Вторичные метаболиты в растениях *Heracleum* содержатся, практически, во всех исследованных органах – плодах, листьях, корнях. Идентифицирован качественный состав этих метаболитов, большая часть которых является компонентами эфирных масел. Аллелопатическую активность каждого из компонентов предстоит ещё изучить. Более того, не существует единого мнения в отношении того, обладает ли аллелопатической активностью сок этого вида, выделенный из того или иного органа.

В своих исследованиях мы установили, что неразбавленный или разбавленный 1:1 и 1:4 сок борщевика однозначно ингибирует прорастание семян и рост проростков растений. Снижались как энергия прорастания семян, так и их всхожесть. Чем мельче были семена тест-растения, тем сильнее проявлялся ингибирующий эффект. Однако при разбавлении сока 1:16, проявляется видовая специфичность ответных реакций у опытных растений. Энергия прорастания, всхожесть семян, линейные параметры проростков пшеницы (*Triticum aestivum*), гороха (*Pisum sativum*), зверобоя продырявленного (*Hypericum perforatum*) существенно возрастали, тогда как у остальных исследованных видов угнетающий эффект сохранялся. На этом основании можно сделать заключение, что в соке *H. sosnowskyi* содержатся не только аллелохимикалии, но и фитогормоны-активаторы. Ингибирующий эффект сока борщевика зависит не столько от наличия аллелохимикалий, сколько от соотношения в его составе между ингибиторами и активаторами роста.

PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL EFFECTS ERGAZIOFIGOFITA *HERACLEUM SOSNOWSKYI* MANDEN ALLELOCHEMICALS ON CROP PLANTS

S.N. Budarin, J.S. Larikova, M.N. Kondratiev

Moscow Agricultural Academy of name K.A. Timiryazev

Russia, Moscow, Timiryazevskaya, 49, e-mail: *Phys1976@google.com*

Over the past 20-25 years Sosnowski hogweed (*Heracleum sosnowskyi* Manden) from the rank ergaziofigofit could be related to invasive species with increasing conviction due to a sharp increase in the number of "running wild" agroecosystems in several districts of the Moscow region. Uncontrolled spreading of hogweed Sosnowski from the stage of simple phenomenon fixation has passed to the stage of impending environmental catastrophe. This species has all the attributes of invasiveness, except for one thing: there is still unclear on whether the Sosnowski hogweed is a source of allelopathic compounds (allelochemicals).

Studies were conducted on seeds and seedlings of cultural and medicinal plants, respectively, genus (*Triticum*, *Pisum*, *Solanum lycopersicum*, *Brassica*) and (*Calendula*, *Valeriana*, *Carum*). Seeds of the test plants together with different proportions with of hogweed fruits were germinated in an incubator, and then the seedlings grown in the light (Na high-pressure lamps).

Heracleum plants contain secondary metabolites in practically all examined organs - fruit, leaves, roots. Qualitative composition of these metabolites, most of which are components of essential oils has been identified. Allelopathic activity of each of the components is still to be learned. Moreover, there is no consensus as to whether of this species` sap extracted from a particular organ has allelopathic activity.

In our studies we found out that the undiluted or diluted 1:1 and 1:4 hogweed sap uniquely inhibits seed germination and growth of seedlings. Both energy of seeds growth and their germination decreased. The smaller were plants tested seeds, the stronger was inhibitory effect. However, under the influence of diluted juice 1:16 species specificity of responses have been noticed in the experimental plants. Energy, of seed growth, germination, linear parameters of wheat seedlings (*Triticum aestivum*), pea (*Pisum sativum*), hypericum (*Hypencum perforatum*) substantially increased, while the other studied species kept depressing effect. On this basis, we can conclude that *Heracleum sosnowskyi* sap includes not only allelochemicals but also phytohormones activators. Inhibitory effect of hogweed sap depends not only on the availability of allelochemicals as on the correlation between growth inhibitors and activators in its composition.

РОЛЬ ЦИТОКИНИНОВ И ЭТИЛЕНА В РЕГУЛЯЦИИ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ ГРИБОМ *SEPTORIA NODORUM* BERK.

С.В. Веселова, Т.В. Нужная, И.В. Максимов

ФГБУН Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН
450054, Россия, г. Уфа, Проспект Октября, 71,
e-mail: veselova75@rambler.ru

Хорошо известно, что этилен участвует в регуляции защитных реакций растений при биотическом стрессе, формируя системную устойчивость против некротрофов, но при этом негативно влияя на устойчивость растений к геми- и биотрофным патогенам. Однако, в литературе много противоречивых данных о механизмах регуляции защитного ответа с участием этого гормона, возможно, потому что практически все исследования проводились на арабидопсисе, и почти нет работ по изучению этиленового сигнального пути у однодольных растений. Роль цитокининов (ЦК) в защите растений против патогенов, особенно биотрофных, стала рассматриваться совсем недавно. Предполагается, что одним из путей запуска защитных реакций, в которых участвуют ЦК, является увеличение экспрессии генов PR-белков в салицилат-зависимой манере.

В данной работе впервые было рассмотрено влияние этилена на ЦК в ответной реакции на септориоз, вызываемый гемибиотрофным грибом *Septoria nodorum* Berk. Анализ влияния этефона (химического предшественника этилена) и ингибитора рецепции этилена 1-метилциклопропена (1-МЦП) на развитие защитных реакций в растениях пшеницы показал, что образование больших зон поражения при обработке этефоном происходило за счет уменьшения окислительного взрыва, благодаря увеличению активности каталазы (КАТ), а при обработке 1-МЦП транзиторное накопление перекиси водорода и ингибирование активности КАТ приводило к повышению устойчивости, проявляющейся в значительном сокращении зон поражения.

Сравнительный анализ иммуногистохимического распределения ЦК и транскрипционной активности салицилат-индуцированного гена *PR-1* показал, что при обработке 1-МЦП ЦК локализовались в клетках мезофилла инфицированного листа, что коррелировало с высокой транскрипционной активностью гена *PR-1*, при этом не наблюдалось развития грибных структур в межклетниках листа. Напротив, в необработанных 1-МЦП инфицированных листьях, клетки были лишены ЦК, так как гормоны накапливались в развивающемся патогене, что коррелировало с низкой транскрипционной активностью гена *PR-1*.

Основываясь на наших результатах, можно предположить, что повышение устойчивости растений пшеницы к септориозу при ингибировании рецепции этилена происходило за счет накопления ЦК и их последующего влияния на развитие защитных реакций в растениях.

Работа поддержана грантом РФФИ № 14-04-97079-р_поволжье_а.

INVOLVEMENT OF CYTOKININS AND ETHYLENE IN THE CONTROL OF WHEAT PLANT RESISTANCE AGAINST INFECTION WITH FUNGUS *SEPTORIA NODORUM* BERK.

S.V. Veselova, T.V. Nujnaya, I.V. Maksimov

FSBIS Institute of biochemistry and genetics of Ufa Research Centre RAS

450054, Russia, Ufa, e-mail: veselova75@rambler.ru

Ethylene is well known to be implicated in the control of defence responses to biotic stresses inducing systemic resistance against necrotrophic pathogens, meanwhile affecting detrimentally plant resistance to hemi- and biotrophic pathogens. However, there are a lot of contradictory data in the literature concerning the mechanisms regulating defence responses, in which these hormones are implicated, which is likely to be due to the fact that most of studies have been carried out on *Arabidopsis* and to the deficiency of researches addressing ethylene signaling in monocotyledons. Implication of cytokinins (CK) in plant defence responses against pathogens, especially against biotrophic pathogens, became the object of research quite recently. It is assumed that one of the pathways triggering defence responses, in which cytokinins are implicated, is the increase in expression of genes coding for pathogen related (PR)-proteins in salicylic (SA)-dependent manner.

In the present research we consider for the first time the effect of ethylene on cytokinins in plant protection against hemibiotrophic fungus *Septoria nodorum* Berk. Analysis of the effect of ethephone (chemical precursor of ethylene) and inhibitor of ethylene reception 1-methylcyclopropene (1-MCP) on development of defence responses in wheat plants have shown that formation of great zones of damage resulting from ethephone treatment occurred due to reduced oxidative burst caused by increased activity of catalase (CAT), while under 1-MCP treatment transitory accumulation of hydrogen peroxide and inhibition of CAT resulted in increased resistance manifested in significant reduction in damaged zones.

Comparative analysis of cytokinin distribution by means of immunohistochemistry and of transcriptional activity of salicylate-inducible *PR-1* gene showed that under 1-MCP-treatment CK localized in mesophyll cells of infected leaves correlating with high transcriptional activity of *PR-1* gene, while development of fungus structures was not detected in leaf intercellular spaces. On the contrary, in leaves non-treated with 1-MCP cells were deprived of cytokinins, while hormones accumulated in developing pathogen correlating with low transcriptional activity of *PR-1* gene.

Our results let to suggest that increased resistance of wheat plants to septoria induced by inhibitor of ethylene perception is due to accumulation of cytokinins and their effect on development of defence responses.

The work was supported by grant of RFBR № 14-04-97079-r-Volga region.

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ АБСЦИЗОВОЙ КИСЛОТЫ И ЦИТОКИНИНОВ В ТКАНЯХ ЛИСТЬЕВ ПШЕНИЦЫ ИНФИЦИРОВАННЫХ *SEPTORIA NODORUM* BERK.

С.В. Веселова, И.В. Максимов

ФГБУН Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН
450054, Россия, г. Уфа, Проспект Октября, 71,
e-mail: veselova75@rambler.ru

Известно, что при атаке патогеном уровень гормонов в инфицированных тканях и в целом растении изменяется, но остается не до конца изученным вклад обоих организмов в эти изменения. В свете последних современных данных абсцизовой кислоты (АБК) и цитокининам (ЦК) наряду с основными гормонами первичного индуцированного защитного ответа салициловой кислотой (СК), жасмоновой кислотой (ЖК) и этиленом - приписывают важную роль в регуляции иммунитета растений. Однако, недавние исследования показали, что патогены способны снижать устойчивость растений, модулируя гормональный сигналинг, а растения, в свою очередь, могут ослабить эти воздействия. Отсюда противоречия в данных о положительной или отрицательной роли гормонов при патогенезе. Разрешить эти противоречия поможет знание о распределении гормонов в инфицированных тканях. Такую информацию можно получить с помощью метода иммуногистохимической локализации с использованием специфических антител к гормонам растений. В данной работе было изучено распределение АБК и ЦК в тканях листьев сортов пшеницы, различающихся по устойчивости к септориозу. Цель работы состояла в выявлении возможной связи между особенностями локализации гормонов в клетках и устойчивостью к заражению.

Сравнительный анализ иммунолокализации как ЦК, так и АБК в инфицированных листьях пшеницы показал, что у устойчивого сорта Башкирская 26 клетки отличались интенсивным иммунным окрашиванием на гормоны, что указывало на высокий уровень этих гормонов в тканях листа, в отличие от чувствительного сорта Жница, для которого было характерно слабое иммунное окрашивание клеток на АБК и ЦК и интенсивное окрашивание, развивающихся в листе грибных структур.

Судя по нашим данным, сохранение более высокого уровня АБК и ЦК в клетках устойчивого сорта сопровождалось более высоким уровнем сопротивляемости к септориозу. Низкий уровень АБК и ЦК, выявленный в клетках чувствительного сорта, который коррелировал с накоплением этих гормонов патогеном, по всей видимости, мог способствовать снижению устойчивости растения к инфицированию.

На основании полученных нами результатов можно предполагать, что характер влияния гормонов на иммунитет растения, т.е. будут ли они способствовать развитию инфекции или устойчивости к ней, зависит от того, как распределяются ЦК и АБК: накапливаются ли они в тканях паразита или растения-хозяина.

Работа поддержана грантом РФФИ № 14-04-97079-р_поволжье_a.

IMMUNOHISTOCHEMICAL LOCALIZATION OF ABSCISIC ACID AND CYTOKININS IN WHEAT LEAF TISSUES INFECTED WITH *SEPTORIA NODORUM* BERK.

S.V. Veselova, I.V. Maksimov

FSBIS Institute of biochemistry and genetics of Ufa Research Centre RAS

450054, Russia, Ufa, e-mail: veselova75@rambler.ru

Hormone level is known to change in infected tissues and the whole plant under pathogen attack, but contribution of either organisms (plant and pathogen) remains unclear. In the light of modern data important role in the control of plant immune response is attributed to abscisic acid (ABA) and cytokinins (CK) alongside with the main players of the primary induced defense response (salicylic acid (SA), jasmonic acid (JA) and ethylene). However, recent researches have shown that pathogens are able to decrease plant resistance by modulating hormonal signaling, while plants, in turn, can weaken these effects. This results make contradiction in the data on either positive or negative role of hormones in pathogenesis. Knowledge about distribution of hormones in infected tissues may help to solve this problem. Such information may be gained with the help of immunohistochemical localization with the help of specific antibodies to plant hormones. In the present work we studied distribution of ABA and cytokinins in leaf tissues of wheat cultivars differing in their resistance to septoriose. The aim of the work was in detecting possible linkage between peculiarities of cellular localization of hormones and resistance against infection.

Comparative analysis of immunolocalization of either CK or ABA in infected wheat leaves showed that cells of resistant cultivar Bashkirskaya 26 were notable for intensive immunostaining for hormones, indicating high level of these hormones in leaf tissues unlike sensitive cultivar Zhnitsa, characterized by low intensity of plant cell staining and intensive staining of developing fungus structures.

According to our data maintenance of higher level of ABA and CK in the cells of resistant cultivar was accompanied by higher level of resistance to septoriose. Low level of ABA and CK detected in the cells of susceptible cultivar correlating with accumulation of these hormones by pathogen was likely to contribute to reduced plant resistance to infection.

On the basis of obtained data we may assume that the character of hormone action on plant immunity, i.e. if they contribute to infection development or resistance against it, depends on how CK and ABA are distributed between tissues of pathogen and host-plant.

The work was supported by grant of RFBR № 14-04-97079-r-Volga region.

ВЛИЯНИЕ МЕДИ НА АКТИНОВЫЕ ФИЛАМЕНТЫ КЛЕТОК КОРНЕЙ *ARABIDOPSIS THALIANA*

И.И. Горюнова, А.И. Емец

ГУ «Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины»,
04123, Украина, Киев-123, ул. Осиповского 2а,
e-mail: innagoriunova@yandex.ru

Медь (Cu^{2+}) является микроэлементом, важным для функционирования ряда ферментов электрон-транспортных цепей митохондрий и хлоропластов. Нефизиологические концентрации Cu^{2+} , оказывают токсическое воздействие на компоненты растительных клеток, в том числе, и на цитоскелет. Влияние Cu^{2+} на актиновые филаменты (микрофиламенты), обеспечивающее деление, поддержание постоянной формы клеток, микрокомпартиментализацию, процессы внутриклеточного транспорта и движение органелл (Volkman et al., 1990), изучено недостаточно. В связи с этим, нами было изучено влияние CuSO_4 (5–20 мкМ) на организацию микрофиламентов в клетках главных корней *Arabidopsis thaliana* (*GFP-FABD2*), экспрессирующей химерный ген *gfp-fabd2*, позволяющий визуализировать актиновые филаменты *in vivo* (Voigt et al., 2005) при помощи лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM 5 PASCAL (Carl Zeiss, Германия). Показано, что микрофиламенты в меристематических клетках необработанных корней *A. thaliana* (*GFP-FABD2*) представляют собой тонкую и высокодинамическую сетчатую структуру, а в эпидермальных клетках и клетках кортекса зон растяжения и дифференциации – удлиненные закруженные утолщенные тяжи вокруг ядра (Voigt et al., 2005). Нами было установлено, что в эпидермальных клетках корневого апекса, переходной зоны и зоны дифференциации под действием всех исследуемых концентраций CuSO_4 происходит формирование более утонченных пучков микрофиламентов, преимущественно с продольной или поперечной ориентацией. В некоторых клетках они были частично или полностью деполимеризованы. В меристематических клетках после обработки 5–20 мкМ CuSO_4 микрофиламенты представляли собой тонкую сеть, преимущественно с неупорядоченной ориентацией, при этом во многих клетках наблюдалось их отсутствие, что свидетельствует об их полной деполимеризации. Таким образом, нами впервые показано, что актиновые филаменты являются одной из внутриклеточных мишеней Cu^{2+} при реализации клеточных механизмов его фитотоксичности.

EFFECT OF COPPER ON ORGANIZATION OF ACTIN FILAMENTS IN *ARABIDOPSIS THALIANA* ROOT CELLS

I.I. Horiunova, A.I. Yemets

Institute of Food Biotechnology and Genomics, National Academy of Sciences
of Ukraine

04123, Ukraine, Kiev-123, Osipovskogo Str., 2a,

e-mail: innagoriunova@yandex.ru

Copper (Cu^{2+}) is an essential micronutrient for all plant organisms, critical to many biochemical processes, such as the functioning of several enzymes of the electron-transport chains of mitochondria and chloroplasts. Excessive accumulation is known to be toxic for many components of the cell, including for the cytoskeleton. To date, effects of Cu^{2+} on actin filaments (microfilaments) have not been fully investigated. In eukaryotic cells, microfilaments carry out important functions as cell division and growth, microcompartmentation, maintaining a cell shape, intracellular transport processes, organelle movement, etc. (Volkman et al., 1990). An influence of CuSO_4 (5 - 20 μM) on actin filaments was investigated in this study. For this a primary roots of 4-day-old *A. thaliana* (GFP-FABD2) (expressing the chimeric gene *gfp-fabd2*, which enables visualize microfilaments in living cells) line seedlings were used. To study the effects on microfilaments, seedlings were treated with 5, 10 and 20 μM CuSO_4 for 1-2h. Actin filaments were visualized *in vivo* by a confocal laser scanning microscope LSM 5 PASCAL (Carl Zeiss, Germany). It was established, that the microfilaments in meristematic cells of control *A. thaliana* (GFP-FABD2) roots form fine and highly dynamic meshworks, while the epidermal cells and cells of the cortex and differentiation zones show F-actin thick bundles around the nucleus (Voigt et al., 2005). It was found that CuSO_4 in 5-20 μM concentrations provoked a dose-dependent formation of more subtle microfilament bundles, preferably with a longitudinal or transverse orientation, their partial or complete depolymerization in epidermal as well as in cortex cells of all *A. thaliana* primary root zones. In meristematic cells finer network of actin filaments, preferably with randomly orientation, were observed. Microfilaments are absent in many of these cells, probably, owing to their depolymerization, that leads to inhibition of *A. thaliana* seedlings primary roots. Thus, we have found that microfilaments are one of the heavy metals target in plant cell.

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ МОРОЗОСТОЙКОСТИ ЛИСТОВЫХ И СТЕБЛЕВЫХ СУККУЛЕНТОВ

Т.Б. Губанова

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр
298648, Республика Крым, г. Ялта, e-mail: gubanova-t@rambler.ru

Особенности метаболизма суккулентов определяют актуальность исследований физиологических аспектов их морозостойкости (Колоша, 1988; Шевякова, Стеценко и др., 2002). В течение ряда лет нами была проведена оценка морозостойкости некоторых стеблевых суккулентов из сем. Cactaceae, относящихся к родам *Austrocyllindropuntia*, *Cylindropuntia* (Eng.) Knuth. Emeng. Backbg., *Opuntia* Mill., и листовых суккулентов рода *Sedum* L. (Crassulaceae). Определены виды с относительно высоким (*Sedum reflexum* L., *S. album* L., *S. acre* L., *Cylindropuntia imbricata* (Haw.) Knuth., *C. molesta* (Brand.) Knuth., *Opuntia engelmannii* Eng., *O. phaeacanta* Eng., *O. Lindhimerii* SD.) и низким уровнем морозостойкости (*S. palidum* L., *S. rubrotinctum* R.T. Glausen., *S. luteovyrinde*, *Austrocyllindropuntia subulata* (Muehlhf.) Backb., *C. tunicata* (Lehm.) Knuth., *O. robusta* Wendl., *O. leucotricha* DC., *O. microdasis* (Lehm.) Pfeiff., *O. ficus-indica* (L.) Mill.). Цель дальнейших исследований заключалась в выявлении некоторых закономерностей физиолого-биохимических процессов, связанных с формированием морозостойкости у суккулентов на примере контрастных по морозостойкости видов. Установлено, что реакции стеблевых и листовых суккулентов на действие низкотемпературного фактора имеют как сходства, так и различия. У морозостойких видов сем. Cactaceae снижение оводненности зимой происходит на фоне стабильно высокой степени гидратации коллоидов. Для криорезистентных видов *Sedum* характерна другая стратегия защиты: связывание воды является следствием увеличения осмотического давления клеточного сока. Выявлена связь степени морозостойкости суккулентов с накоплением олиго-, полисахаров и фенольных соединений. В формировании морозостойкости листовых суккулентов существенная роль принадлежит моно- и олигосахаридам, а у стеблевых - полисахарам (пентозанам). Показано, что при нарастающем действии низкотемпературного фактора интенсифицируются процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ). Однако, в тканях морозостойких *O. engelmannii*, *C. molesta*, *S. reflexum*, *S. album*, *S. acre* при прохождении первой и второй стадий закаливания этот процесс замедляется что, вероятно, связано с активизацией антиоксидантных и ферментных защитных систем. Через 24 часа после снятия стресса уровень ПОЛ практически не отличается от начального, что свидетельствует о наличии репарационных процессов в клетках этих видов.

PHYSIOLOGO-BIOCHEMICAL WAYS OF FROST RESISTANCE IN STEM AND LEAF SUCCULENTS

T.B. Gubanova

Nikitsky Botanical Gardens – National Scientific Center
298648, Crimea, Yalta, e-mail: gubanova-t@rambler.ru

Specifics of metabolism in succulent plants determine the importance of the investigations of physiological aspects of their frost resistance (Kolosha, 1988; Shevyakova, Stetsenko et al., 2002). During number of years we have conducted an estimation of frost resistance for some species of stem succulents from family Cactaceae, genus *Austrocylindropuntia*, *Cylindropuntia* (Eng.) Knuth. Emeng. Backbg., *Opuntia* Mill., and leaf succulents from genus *Sedum* L. (Crassulaceae). Species with relatively high level of frost resistance (*Sedum reflexum* L., *S. album* L., *S. acre* L., *Cylindropuntia imbricata* (Haw.) Knuth., *C. molesta* (Brand.) Knuth., *Opuntia engelmannii* Eng., *O. phaeacanta* Eng., *O. lindhiomtrii* SD.) and with relatively low one (*S. palidum* L., *S. rubrotinctum* R.T.Glausen., *S. luteovyrinde*, *Austrocylindropuntia subulata* (Muehlhf.) Backb., *C. tunicata* (Lehm.) Knuth., *O. robusta* Wendl., *O. leucotricha* DC., *O. microdasis* (Lehm.) Pfeiff., *O. ficus-indica* (L.) Mminedill.) have been determined. The aim of further investigations was to find out some conformities of physiological and biochemical processes associated with frost resistance formation in succulent plants. It has been found out that reactions of stem and leaf succulents under the influence of low temperature have both similarities and distinctions. Species of Cactaceae family with high frost resistance demonstrate decreasing of the water content in winter on the background of constantly high rate of colloids hydration. Cryoresistant species of *Sedum* are characterized with other protection strategy: binding water is the result of the cell sap osmotic pressure increasing. Correlation between the rate of frost resistance in succulent plants with accumulation of oligosaccharides, polysaccharides and phenol compounds has been determined. In the formation of frost resistance in leaf succulents the role of mono- and oligosaccharides is significant and for stem succulents that is for polysaccharides (pentosans). It has been shown that under the increasing influence of the low temperature the processes of lipid peroxidation (LP) became more intensive. However in the tissues of frost resistant species *O. engelmannii*, *C. molesta*, *S. reflexum*, *S. album*, *S. acre* during the first and second stages of hardiness this process becomes slower that is probably connected with the activation of antioxidant and fermentative protective systems. In 24 hours after stress has been ceased LP level almost wasn't differed from the initial one that shows the presence of repairing processes in the cells of these species.

ВЗАИМОСВЯЗЬ АНТИРАДИКАЛЬНЫХ И АНТИСТРЕССОВЫХ СВОЙСТВ РЕГУЛЯТОРА РОСТА РАСТЕНИЙ «МЕЛАФЕН»

И.В. Жигачева¹, И.П. Генерозова², Т.А. Мишарина¹, М.Б. Тренина¹,
Н.И. Крикунова¹, И.Ф. Русина¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН

119334, Россия, г. Москва, ул. Косыгина, 4, e-mail: zhigacheva@mail.ru

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук
Россия, г. Москва, ул. Ботаническая, 35, e-mail: ag-shugaev@ippras.ru

Смещение антиоксидантно - прооксидантного равновесия в сторону увеличения генерации активных форм кислорода (АФК) митохондриями приводит к развитию окислительного стресса. Это смещение происходит под действием стрессовых факторов и лежит в основе нарушения физиологических функций растительных организмов (снижения ростовых процессов, урожайности и т.д.). Водный дефицит снижает функциональную активность, как хлоропластов, так и митохондрий (Шугаев и др., 2007). Известно, что регуляторы роста и развития растений повышают устойчивость растений, как к биотическому, так и к абиотическому стрессу, в том числе и к водному дефициту. Одним из таких регуляторов роста являются мелафен, представляющий собой меламиновую соль бис(оксиметил)-фосфиновой кислоты. В связи с этим интересно было выяснить, окажет ли мелафен защитный эффект на биоэнергетические характеристики митохондрий растений в условиях водного дефицита. Объектом исследования служили митохондрии 5-дневных этиолированных проростков гороха (*Pisum sativum* L.), сорт Альфа. Недостаточное увлажнение имело следствием активацию свободно радикального окисления в мембранах митохондрий проростков гороха, о чем свидетельствует 3-кратный рост интенсивности флуоресценции продуктов ПОЛ. Изменения физико-химических свойств мембран отразилось и на энергетике митохондрий: происходило 1,5-кратное снижение максимальных скоростей окисления НАД-зависимых субстратов и эффективности окислительного фосфорилирования. Предварительная обработка семян 2×10^{-12} М раствором мелафена снижала интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ до контрольных величин. При этом мелафен предотвращал изменения биоэнергетических характеристик митохондрий и стимулировал рост корней проростков в условиях недостаточного увлажнения, что имеет большое приспособительное значение. Вероятно, защитный эффект препарата обусловлен его антирадикальными свойствами ($k_7 = 1,64 \times 10^6 (\text{Mc})^{-1}$).

RELATIONSHIP OF ANTIRADICAL AND ANTI-STRESS PROPERTIES PLANT GROWTH REGULATOR “MELAPHEN”

I.V. Zhigacheva¹, I.P. Generozova² T.A. Misharina¹, M.B. Terenina¹,
N.I. Krikunova¹, I.F. Rusina¹

¹Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences
119334, Russia, Moscow, Kosygina Str.,4, e-mail: zhigacheva@mail.ru

²Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences,
Russia, Moscow, Botanicheskaya Str., 35, e-mail: igenerozova@mail.ru

A disturbance of the antioxidant-prooxidant balance towards the increasing in the production of active oxygen species (ROs) by mitochondria leads to the development of the oxidative stress. Such disturbance is a result of exposure to stress factors and it underlies the damage of physiological functions in plant organisms (reduction of the growth processes, productivity, etc.). Water deficit reduces functional activity both chloroplasts and mitochondria (Shugaev AG et al., 2007). As it is known from the literature, regulators of plant growth and development improve their tolerance to (a)biotic stresses, to water deficit in particular. One of such regulators is melaphen (melamine salt of bis(oximethyl)phosphonic acid). It was interesting to find out whether melaphen has protective effects on mitochondrial bioenergetics characteristics of plants under conditions of water deficit. The object of the study was mitochondria from 5-day etiolated pea seedlings (*Pisum sativum L.*), cultivar Alpha. Insufficient moisture led to the activation of free radical oxidation in mitochondria membranes of pea seedlings, as it has been evidenced by a 3-fold increase in fluorescence intensity of lipid peroxidation products. Changes in the physicochemical properties of the membranes were reflected in the mitochondrial energetics: resulted 1.5-fold reduction in the maximum rates of oxidation of NAD-dependent substrates and efficiency of oxidative phosphorylation. The treatment of seeds with a 2×10^{-12} M melaphen solution decreased the content of LPO products to the control values. In this melaphen prevented changes bioenergetic characteristics of mitochondria and stimulated the growth of seedling roots under water deficit, which is of great adaptive significance. Probably, the protective effect of the drug due to its antiradical properties ($k_7 = 1.64 \times 10^6 (\text{Mc})^{-1}$).

ИНДУЦИРОВАНИЕ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТОЙ ЗАЩИТНЫХ РЕАКЦИЙ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ ПРИ РАЗВИТИИ СЕПТОРИОЗА

Т.В. Нужная, О.В. Горбачева, С.В. Веселова

ФГБУН Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН
450054, Россия, г. Уфа, Проспект Октября, 71,
e-mail: veselova75@rambler.ru

Регуляция механизмов защиты растений при биотическом стрессе зависит от взаимодействия фитогормонов. Инфицирование стимулирует растение к синтезу одного или более гормонов, в зависимости от типа патогена. 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. Кроме того, этилен может подавлять иммунитет к биотрофным и гемибитрофным патогенам, что может быть одним из проявлений антагонизма с салицилатным сигналингом. Однако, влияние этилена на СК-путь неоднозначно и остается не до конца изученным.

На основании проведенных нами исследований можно сделать вывод, что как при обработке СК, так и при ингибировании рецепции этилена 1-метилциклопропеном (1-МЦП) в инфицированных гемибитрофным грибом *Septoria nodorum* растениях пшеницы все защитные реакции (накопление перекиси водорода (H_2O_2), повышение активности пероксидазы (ПО) и снижение активности каталазы (КАТ), накопление ФС и лигнификация клеточных стенок) шли интенсивнее, чем в необработанных растениях, что приводило к ограничению развития патогена. Транскрипционная активность гена *PR-1* в обработанных СК или 1-МЦП растениях пшеницы повышалась в 11 и 12 раз, соответственно, тогда как в необработанных растениях всего лишь в 4 раза через сутки после инфицирования, что может говорить об активации салицилатного защитного пути в обработанных 1-МЦП инфицированных растениях. Исследование контрастных по устойчивости к септориозу сортов пшеницы выявило, что обработка 1-МЦП повышала устойчивость восприимчивого сорта, так же, как обработка СК. В обоих случаях было обнаружено, что усиление отложения лигнина в клеточных стенках растений, которому предшествовало более интенсивное накопление ФС, коррелирующее с усиленной активацией ПО и генерацией перекиси водорода в местах поражения, приводило к уменьшению площади зон поражения и остановке роста патогена.

Таким образом, полученные нами результаты указывают на то, что рецепция этилена в растениях является одним из ключевых факторов, негативно влияющих на их защитный ответ при гемибитрофной инфекции, действуя, скорее всего, через подавление защитных реакций, регулирующихся СК.

Работа поддержана грантом РФФИ № 14-04-97079-р_поволжье_a.

INDUCTION OF DEFENCE RESPONSES BY SALICYLIC ACID IN WHEAT PLANTS DURING DEVELOPMENT OF SEPTORIOSE

T.V. Nujnaya, O.V. Gorbacheva, S.V. Veselova

FSBIS Institute of biochemistry and genetics of Ufa Research Centre RAS
450054, Russia, Ufa, e-mail: veselova75@rambler.ru

Regulation of mechanisms of plant protection against biotic stress depends on hormone interaction. Infection stimulates plant to synthesize one or more hormones depending on pathogen type. Salicylate (SA)- and ethylene-dependent defence responses under pathogenesis are two signal pathways manifesting antagonism. Moreover, ethylene is capable to inhibit immunity to biotrophic and hemibiotrophic pathogens that may be one of manifestations of antagonism with salicylate signaling. However, the effect of ethylene on salicylate pathway is ambiguous and unclear.

Our experiments let to suggest that all of defence responses in wheat plants infected with fungus *Septoria nodorum* (accumulation of (H₂O₂), activation of peroxidase (PO) and decline in catalase (CAT) activity, accumulation of phenolic substances (PS) and cell wall lignification) went on more intensively either under SA treatment or inhibition of ethylene reception by 1-methylcyclopropene (1-MCP). Transcript level of PR-1 in wheat plants treated with SA and 1-MCP increased 11 and 12 fold, respectively, while in untreated plants - only 4-fold one day after infection suggesting activation of salicylate pathway in infected 1-MCP-treated plants. Study of wheat cultivars with contrasting resistance to septoria showed that 1-MCP-treatment increased resistance of susceptible cultivar as well as SA-treatment. In both cases it was detected that increased lignification of plant cell walls was preceded by more intensive PS accumulation correlating with increased PO activity and with generation of hydrogen peroxide at the zone of damage led to decreased damage zones and cessation of pathogene development.

Thus the obtained data let to suggest that ethylene reception in plants is a key factor negatively affecting their defence response under hemibiotrophic infection, acting most likely by inhibiting defence responses controlled by SA.

The work was supported by grant of RFBR № 14-04-97079-r-Volga region.

ВЛИЯНИЕ ЭТИЛЕНА, САЛИЦИЛОВОЙ И ЖАСМОНОВОЙ КИСЛОТ НА МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ЗАЩИТНЫХ РЕАКЦИЙ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ ПРИ ГЕМИБИОТРОФНОЙ ИНФЕКЦИИ

Т.В. Нужная, С.В. Веселова, И.В. Максимов

ФГБУН Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН
450054, Россия, г. Уфа, Проспект Октября, 71,
e-mail: veselova75@rambler.ru

Салицилат (СК)-, жасмонат (ЖК)- и этилен-зависимые защитные ответы – это доминирующие первичные сигналы локального и системного индуцированного защитного ответа растения, между которыми существует обширная сеть взаимодействий. Известно, что СК формирует устойчивость растений к биотрофным патогенам, а ЖК/этилен – к фитофагам и некротрофам. Однако, очень мало знаний о взаимодействиях этих защитных путей, особенно, у однодольных растений. Практически нет информации о роли этих сигнальных путей в координированной регуляции защитных реакций растений при гемибіотрофной инфекции.

В данной работе было изучено влияние СК, ЖК и этилена на генерацию перекиси водорода (H_2O_2) – как первую защитную реакцию растений на проникновение патогенов, а также активность ферментов про-/антиоксидантной системы, принимающих участие в генерации и утилизации H_2O_2 – пероксидазы и каталазы.

Наши исследования показали, что предпосевная обработка СК и ЖК увеличивала устойчивость растений пшеницы к септориозу, вызванному гемибіотрофным грибом *Septoria nodorum*, за счет усиления генерации H_2O_2 , повышения активности пероксидазы (ПО) и ингибирования активности каталазы (КАТ), что проявлялось в уменьшении зон поражения. Напротив, обработка листьев растений этефоном (химическим предшественником этилена) приводила к резкому снижению устойчивости пшеницы к инфекции, что проявлялось в обширных зонах поражения с хлорозами и развивающимися пикнидами, как предполагается за счет снижения генерации H_2O_2 , увеличения активности КАТ и ингибирования активности ПО. Обработка этефоном после СК не приводила к снижению устойчивости пшеницы, так как генерация H_2O_2 не снижалась, активность КАТ ингибировалась и развитие патогена подавлялось. Интересно, что обработка этефоном после ЖК снижала устойчивость растений, скорее всего за счет подавления генерации H_2O_2 и активности ПО.

Полученные нами результаты говорят о том, что этиленовый сигналинг отрицательно влияет на защитный ответ растений при гемибіотрофной инфекции, который проявляется в регуляции активности ферментов про-/антиоксидантной системы. Причем, в присутствии СК этот отрицательный эффект снимается, а в присутствии ЖК не снимается.

Работа поддержана грантом РФФИ № 14-04-97079-р_поволжье_а.

EFFECTS OF ETHYLENE, SALICYLIC AND JASMONIC ACIDS ON MECHANISMS REGULATING DEFENCE PLANT REACTIONS UNDER HEMIBIOTROPHIC INFECTIONS

T.V. Nujnaya, S.V. Veselova, I.V. Maksimov

FSBIS Institute of biochemistry and genetics of Ufa Research Centre RAS

450054, Russia, Ufa, e-mail: veselova75@rambler.ru

Salicylic (SA)-, jasmonate (JA) and ethylene-dependent defence responses are dominating primary signals of locally and systemically induced defence responses, in between which there exists a vast net of interactions. SA is known to induce plant resistance to biotrophic pathogens, while JA/ethylene – to phytophaga and necrotrophic pathogens. However, the data concerning interaction of these defence pathways are scarce, which is particularly so in case of monocots. There is practically no information concerning coordinated regulation of defence plant reactions under hemibiotrophic infection.

In the present work we studied the effects of SA, JA and ethylene on the generation of hydrogen peroxide (H_2O_2) - as a primary defence plant response to penetration of pathogens, as well as on activity of enzymes of pro/antioxidant system, implicated in generation and utilization of H_2O_2 – i.e. peroxidase and catalase.

Our research showed that pre-sowing treatment with SA and JA 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. On the contrary, treating leaves with ethephone (chemical precursor of ethylene) resulted in a decline in wheat resistance to infection, manifested in vast zones of damage with chlorosis and developing picnidia which is likely to be due to decreased generation of H_2O_2 , increased CAT activity and inhibition of PO. Ethephone treatment after that with SA did not lead to decreased wheat resistance, since H_2O_2 generation did not drop and CAT was inhibited as well as pathogen development. It is of the interest that ethephone treatment after that with JA decreased plant resistance, which is likely to be due to inhibition of H_2O_2 generation and PO activity.

Our data let to suggest that ethylene signaling influences detrimentally the defence plant response to hemibiotrophic infection manifested in regulation of enzyme activity of pro/antioxidant system. Presence of SA reduces this negative effect of ethylene, while it persists in the presence of JA.

The work was supported by grant of RFBR № 14-04-97079-r-Volga region.

РОЛЬ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В ИНДУКЦИИ ПЕРЕКРЕСТНОЙ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К ГИПЕРТЕРМИИ И ОСМОТИЧЕСКОМУ ШОКУ

А.И. Обозный^{1,2}; Ю.Е. Колупаев²

¹Украинский институт лесного хозяйства и агролесомелиорации им. Г.М. Высоцкого,

Украина, Харьков, e-mail: alexhdinru2007@rambler.ru

²Харьковский национальный аграрный университет им. В.В.Докучаева 62483, Украина, Харьков, п/о Коммунист-1

Известным феноменом является эффект кросстолерантности живых организмов (повышение их устойчивости к определенному стрессовому фактору предварительным умеренным действием стрессора иной природы). Однако молекулярные механизмы перекрестной устойчивости изучены далеко не полностью. Ранние реакции на стрессоры сопровождаются увеличением содержания в клетках различных сигнальных посредников - Ca^{2+} , АФК, NO, цАМФ и др. Изменение содержания одной из стабильных АФК - пероксида водорода - зарегистрировано на начальных этапах воздействия на растения низких температур (Prasad et al., 1994; Пиотровский и др., 2011). Показано, что обработка растительных объектов скавенджером радикальных АФК ионолом препятствовала формированию теплоустойчивости после кратковременного действия высоких температур, рассматривается как свидетельство участия АФК в процессах теплового закаливания (Карпец, Колупаев, 2008). В то же время участие АФК в процессах формирования устойчивости растений к двум стресс-факторам одновременно (в эффекте так называемой кросс-толерантности) специально не исследовалось. Целью работы явилось изучение возможного участия пероксида водорода в формировании тепло- и осмоустойчивости проростков пшеницы после кратковременного действия на них гипертермии и осмотического шока. Исследования проводили на этиолированных проростках мягкой озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Элегия. Четырехсуточные проростки подвергали закаливающим воздействиям – высокотемпературному (одноминутный прогрев в водном термостате при температуре 42,0°C) и осмотическому (погружение проростков в 1 М раствор сахарозы на 10 мин с последующим переносом в дистиллированную воду на 20 мин). Кратковременные тепловое и осмотическое воздействия вызывали транзиторное увеличение содержания пероксида водорода в корнях проростков. Такой эффект, наблюдавшийся в течение 1-2 ч после указанных воздействий, совпадал во времени со снижением устойчивости проростков к нагреву и осмотическому шоку, после чего содержание H_2O_2 приближалось к уровню контроля, а устойчивость проростков к обоим стрессорам возрастала. Обработка проростков скавенджером пероксида водорода диметиотиомочевинной угнетала эффект увеличения его содержания при закаливающих воздействиях и нивелировала их положительное влияние на тепло- и осмоустойчивость проростков. Воздействие экзогенного пероксида водорода вызывало повышение тепло- и осмоустойчивости проростков пшеницы, которое наблюдалось после 4-часового лаг-периода. Сделан вывод, что пероксид водорода является одним из необходимых компонентов клеточного сигналинга, обеспечивающего формирование перекрестной устойчивости растений к гипертермии и осмотическому шоку.

ROLE OF REACTIVE OXYGEN SPECIES IN THE INDUCTION CROSS-TOLERANCE OF PLANTS TO THE HYPERTHERMIA AND OSMOTIC SHOCK

A.I. Oboznyj^{1,2}; Yu.E. Kolupaev²

¹Ukrainian Research Institute of Forestry and Forest Melioration named after G.M. Vysotskij (URIFFM),

Ukraine, Kharkiv, e-mail: alexndinru2007@rambler.ru

²Kharkov National Agrarian University of V.V.Dokuchayev
62483, Ukraine, Kharkov, п/о Kommunist-1

The effect of crosstolerance of living organisms (increasing their resistance to particular stress factor preliminary moderate stressor action of a different nature). However molecular mechanisms crosstolerances are investigated far not completely. Early reactions to stressors are accompanied by increase of various signal messengers - Ca^{2+} , ROS, NO, cAMP in cells. The change of a content of one of stable ROS - a hydrogen peroxide - is registered at the initial stages of low temperatures influence on plants (Prasad et al., 1994; Piotrovsky et al., 2011). It is shown that treatment of plant objects by a scavenger of radical ROS – ionol interfered with formation of temperature constancy after short-term act of high temperatures, is considered as the testimony of participation of a ROS in heat hardening processes (the Karpets, Kolupaev, 2008). At the same time participation ROS in processes of resistance formation in plants to two stress-factors simultaneously (effect of cross-tolerance) was not specially investigated. The proposed work reported studying of possible participation of a hydrogen peroxide in formation heat resistance – and osmotolerances of plants of wheat after short-term influence of hyperthermia and osmotic shock. Investigations conducted on etiolated plantlets of soft winter wheat (*Triticum aestivum* L.) variety Elegy. Four-days plantlets subjected to hardening influences – high-temperature (one-minute heating in a water thermostat at temperature 42,0°C) and osmotic (immersing of plantlets in 1 M sucrose solution for 10 min with the subsequent carrying over to the distilled water on 20 min). Short-term heat and osmotic influences caused transitional increase of hydrogen peroxide content of in the roots of plantlets. Such effect observed during 1-2 hours after specified influences, synchronised lowering of plants resistance to heating and osmotic shock then H_2O_2 content came nearer to control level, and resistance of plantlets to both stressors increased. Treatment of plantlets by hydrogen peroxide scavenger dimethylthiourea suppressed effect of increase of its content at hardening influences and levelled their positive influence on heat resistance and an osmotolerance of plantlets. Influence of an exogenous hydrogen peroxide affected increase heat resistance and osmotolerances of plantlets of wheat which was observed after 4-hours lag period. The conclusion is drawn that hydrogen peroxide is one of necessary components of the cellular signalling ensuring formation cross resistance hyperthermia and osmotic shock in plants.

ВЛИЯНИЕ НАНОСЕРЕБРА НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ

А.В. Омельченко, И.Н. Юркова, И.А. Бугара, М.Н. Жижина

Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского
295007, Республика Крым, Симферополь, пр. Ак. Вернадского, 4,

e-mail: *omelav@ukr.net*

Одним из перспективных направлений исследований в настоящее время является применение нанотехнологий в растениеводстве. В повышении урожайности и качества сельскохозяйственных культур большое значение приобретают биогенные металлы в коллоидном состоянии (наночастицы). К наиболее широко используемым коммерческим наноматериалам можно отнести наночастицы серебра. В отличие от ионного серебра наночастицы менее токсичны, обладают пролонгированным действием и не требуют применения больших доз для достижения необходимого биологического эффекта. Однако влияние наночастиц серебра на сосудистые растения исследуют, главным образом, в связи с токсическим действием их высоких концентраций. Существуют лишь отдельные данные, указывающие на роль наночастиц серебра в физиологических процессах, протекающие в растениях.

В связи с этим, целью настоящей работы явилось изучение влияния наночастиц серебра на физиологические процессы пшеницы на ранних этапах онтогенеза.

Объектами исследования служили семена озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Одесская 267 и водорастворимая нанобиокомпозиция серебра. При синтезе наносеребра в качестве восстановителя-стабилизатора использовали альгинат натрия, который не только позволяет получать высокостабильную водорастворимую композицию наночастиц серебра с узким распределением по размерам, но и обладает широким спектром биологической активности. Поэтому такой метод получения наночастиц можно отнести к «зеленой нанохимии».

Семена пшеницы замачивали в водных растворах наночастиц серебра с концентрацией 0,02; 0,05; 0,1; 1,0 и 5,0 мг/дм³ в течение 20 часов, а затем помещали в песок, обогащенный средой Кнопа с микроэлементами, и проращивали 10 дней при температуре 24 °С.

Полученные результаты показали, что обработка семян пшеницы наночастицами серебра увеличивало накопление биомассы как корней, так и надземной части растений по сравнению с контролем при всех исследуемых концентрациях. При этом, более высокое стимулирующее действие наносеребро оказывало на прирост биомассы корней. Максимальное увеличение массы сухого вещества корней наблюдалось при концентрации наносеребра 0,02-0,1 мг/л и составило от 20,9 до 39,8%, а надземной части – от 12,1 до 18,2% по сравнению с контролем.

Таким образом, наночастицы серебра могут быть перспективным компонентом при создании новых экологически безопасных биопрепаратов для повышения биологической продуктивности растений.

INFLUENCE OF NANOSILVER ON THE PHYSIOLOGICAL PROCESSES OF WHEAT PLANTS

A.V. Omelchenko, I.N. Yurkova, I.A. Bugara, M.N. Zhizhina

Taurida National V.I. Vernadsky University

95007, Crimea, Simferopol, Academician Vernadsky Ave., 4,

e-mail: *omelav@ukr.net*

Currently the promising area of research is the application of nanotechnology in plant cultivation. Biogenic metals in colloidal state (nanoparticles) play an important role in improvement of the yield and quality of the cultivated plants. The most widely used commercial nanomaterials include silver nanoparticles. In contrast to ionic silver nanoparticles are less toxic, have prolonged action and do not require large doses to achieve the desired biological effect. However, the effects of silver nanoparticles on vascular plants are investigated due to the toxic effect of their high concentrations. In scientific literatures there are poor data about the role of silver nanoparticles in physiological processes in plants.

In this regard, the aim of this work was to study the effect of silver nanoparticles on the physiological processes of wheat in the early stages of ontogenesis.

Objects of the study were the seeds of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) variety Odesskaya 267 and a water-soluble silver nanobiocomposition. The creation of nanosilver sodium alginate was used as a reducing stabilizer. It does not only produce a highly stable water-soluble composition of the silver nanoparticles with a narrow size distribution but also has a broad spectrum of biological activity. Therefore, this method of nanoparticles production can be attributed to the «green nanochemistry».

Seeds of wheat were treated with aqueous solutions of silver nanoparticles with concentration 0.02; 0.05; 0.1; 1.0 and 5.0 mg/l for 20 hours and then placed in a sand containing Knop medium rich with trace elements and germinated for 10 days at a temperature of 24 °C.

The results showed that treatment of wheat seeds with silver nanoparticles increased the accumulation of biomass of the roots and the aboveground parts of plants compared to the control in all tested concentrations. The highest stimulating effect of nanosilver particles was exerted on root biomass.

The maximal dry weight of the plants was observed with a concentration of nanosilver 0.02-0.1 mg/l and ranged from 20.9 to 39.8% for roots, and the aboveground parts ranged from 12.1 to 18.2% in comparison with control.

Thus, silver nanoparticles could be a promising component in the creation of new environmentally safe biological products to increase biological productivity of plants.

МОРОЗОСТОЙКОСТЬ ХЕНОМЕЛЕСА В КРЫМУ

Р.А. Пилькевич

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр
98648, Республика Крым, г. Ялта, пгт Никита, e-mail: nbs1812@ukr.net

В исследованиях 2013 года принимали участие 20 селекционных форм хеномелеса, принадлежащих к трём видам: *Chaenomeles japonica*, *Ch. spesiosa*, *Ch. cathayensis* и одной гибридной группе *Ch. x superba*.

Относительно морозоустойчивыми можно считать сеянцы, характеризующиеся более поздним выходом из биологического покоя, в период приблизительно с II декады января по II декаду февраля, и сравнительно меньшим содержанием воды в тканях почек. У более морозостойких форм вида *Ch. superba* уровень оводнённости почек в январе-феврале находится в диапазоне 60,0-68,8% (по отношению к сырой массе) и 69,2-75,0% в марте. У образцов вида *Ch. japonica* – 71,4-72,0% в январе-феврале и 77,8-78,3% в марте; у *Ch. spesiosa* 72,2-88,1% – январь-февраль и 58,3-60,2% в марте; у *Ch. cathayensis* – 65,2-68,6% в январе-феврале, и не более 70% в марте.

Во второй декаде марта в климатической камере с понижением температуры до -10°C была проведена имитация повреждений побегов возвратными весенними заморозками. Эксперимент показал, что листовые почки практически всех растений вида *Ch. superba* сохранились живыми, местами наблюдался незначительный краевой некроз, и лишь у отдельных образцов гибель листьев достигла 60%. На листовой поверхности имелись некротические пятна, занимающие от 10 до 45% площади листа. В отдельных случаях отмечена гибель молодых листьев. Выживаемость цветочных почек варьировала в пределах 26,3-100%.

У образцов вида *Ch. japonica* максимальная гибель листовых почек составила 9,5%. У всех растений отмечены некротические пятна (от 13,8% до 50% площади листа), гибель наружных (до 18,2%) или внутренних листьев (8-12%), некроз краёв и верхушки листовых пластинок (10-27,3%), частичный некроз листовой жилки (до 20%), реже – точечный некроз. Потеря декоративных качеств у отдельных форм достигала 80%. У растений *Ch. spesiosa* гибель листовых почек произошла в пределах 20-29,4%, уцелевшие имели частичный некроз края листовых пластинок, также наблюдались некротические пятна различной величины. Цветочные почки пострадали серьёзнее – без повреждений оставалось от 4,1 до 69,0% на побеге. В целом, декоративность данного вида существенно снизилась.

Наиболее сильно последствия низкотемпературного воздействия проявились у образцов вида *Ch. cathayensis*, что выразилось в гибели 90% генеративной сферы и 36% вегетативных почек, расположенных в различных частях побегов. Повреждения такой высокой степени образовались, очевидно, вследствие более раннего, чем обычно, завершения периода покоя на фоне относительно высоких среднесуточных температур в течение зимних месяцев 2013 года.

FROST RESISTANCE OF CHAENOMELES IN CRIMEA

R.A. Pilkevitch

Nikita Botanical Gardens – National Scientific Center
98648, Crimea, Yalta, Nikita, e-mail: *nbs1812@ukr.net*

There were allocated 20 selective forms of *Chaenomeles* of three species: *Chaenomeles japonica*, *Ch. spesiosa*, *Ch. cathayensis* and one hybrid group *Ch. x superba* were researched in 2013.

Plantlets could be considered relatively frost resistant are characterized by later awakening after biological rest during the period approximately from II decade of January to II decade of February and by comparatively low water maintenance in bud tissues. More frost resistant forms of *Ch. superba* represent saturation level within 60.0-68.8% (relatively to the wet weight) and 69.2-75.0% in March. Samples of *Ch. japonica* showed – 71.4-72.0% in January-February and 77.8-78.3% in March; *Ch. spesiosa* 72.2-88.1% – January-February and 58.3-60.2% in March; y *Ch. cathayensis* – 65.2-68.6% January-February, and not more than 70% in March.

In second decade of March in a climate chamber with temperature decrease up to -10°C an imitation of shoot damage from recurrent early spring frosts took place. This experiment demonstrated that leaf buds of almost all *Ch. superba* plants survived, somewhere insignificant marginal necrosis could be noticed and only some samples lost 60% of their leaves. There were necrosis spots on the leaf surface that occupied from 10 to 45% of the leaf area. In particular cases we have noticed the inner leaves loss. Flower buds survive level was within 26.3-100%.

Samples of *Ch. japonica* got maximum leaf bud loss in amount of 9.5%. All the plants got necrosis spots (from 13.8% to 50% of leaf area), loss of outer (up to 18.2%) or inner leaves (8-12%), necrosis of margin or the top of the leaf blade (10-27.3%), partial necrosis of the leaf nerve (up to 20%), less common – focal necrosis. Some forms lost their decorative features up to 80%. Plant of *Ch. spesiosa* got leaf buds loss in amount within 20-29.4%, survived buds got partial necrosis of the leaf blade margin, besides necrosis spots of various size have been noticed. Flower buds were damaged heavier – only from 4.1 to 69.0% evaded damages. Generally decorative features of this species essentially decreased.

Samples of *Ch. Cathayensis* demonstrated the most significant consequences of low temperature influence that was expressed in loss of 90% of generative sphere and 36% of vegetative buds situated in various parts of shoots. Apparently damages of such high degree were formed in consequence of earlier finish of the rest period on the background of relatively warm daily average temperature during winter months of 2013.

ВЫЯСНЕНИЯ РОЛИ АКТИНОВЫХ ФИЛАМЕНТОВ В МЕХАНИЗМАХ ХОЛОДОУСТОЙЧИВОСТИ *ARABIDOPSIS THALIANA*

С.Г. Плоховская, А.И. Емец

ГУ «Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины»

04123, Украина, Киев-123, ул. Осиповского 2а,

e-mail: sveta_plohovska@mail.ru

На сегодняшний день большое внимание уделяется изучению влияния различных стрессовых факторов, среди которых холод, на цитоскелет растительной клетки. Большой интерес к компонентам цитоскелета (микротрубочкам и актиновым филаментам) связан с огромным его значением в жизнедеятельности организма, поскольку он играет ключевую роль в процессах роста и морфогенеза клеток, тканей и органов растений, определяет субклеточную организацию, распределение, полярность, дифференциацию клеток, влияет на движение органелл, внутри- и межклеточный транспорт веществ, процессы эндо- и экзоцитоза. В ряде работ показано, что низкие температуры приводят к изменениям в организации микротрубочек, вызывая их деполимеризацию (Wallin & Stromberg, 1995; Sheremet et al., 2011). Обнаружено, что в зависимости от типа клеток и зоны корня растительные микротрубочки имеют разную чувствительность к действию холода (Baluska et al., 1993; Sheremet et al., 2011).

В данной работе было исследовано изменения параметров роста и морфологии главных корней линии *A. thaliana*, экспрессирующей химерный ген *GFP* (Green Fluorescent Protein) - *fabD2* (fibrin actin-binding domain 2), который позволяет визуализировать актиновые филаменты в клетках данной линии *in vivo* с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 510 META (Carl Zeiss, Германия). Нами было установлено, что обработка холодом (4°C; 0,5°C) в течение 24, 48 и 72 ч оказывает ингибирующее влияние на рост главных корней *A. thaliana* (GFP - FABD2). Так, через 24 часа прирост главных корней уменьшался примерно в 2,5-2,6 раза, через 48 ч в 2,9-3,0 раза, через 72 часа в 3,2-3,3 раза. Так же установлено, что обработка 0,5°C приводит к анизотропному увеличению диаметра эпидермальных клеток зоны растяжения, а также обработка 4°C инициирует формирование эктопических корневых волосков и увеличение их количества в зоне дифференциации. Одновременно изменяется и исходная организация актиновых филаментов в эпидермальных клетках различных зон главных корней *A. thaliana*. Так, в большинстве клеток переходной зоны они дезориентируются и частично деполимеризуются, а в отдельных клетках обнаруживаются лишь единичные тяжи длинных актиновых филаментов.

EFFECTS OF LOW TEMPERATURE ON THE ORGANIZATION OF ACTIN FILAMENTS IN *ARABIDOPSIS THALIANA* ROOT CELLS

S.H. Plohovska, A.I. Yemets

Institute of Food Biotechnology and Genomics, NAS of Ukraine

04123, Ukraine, Kyiv-123, Osipovskogo Str. 2a,

e-mail: sveta_plohovska@mail.ru

Cytoskeleton is a highly dynamic structure that takes part in nuclear and cell division, signalling, determination of cell shape and polarity, and cell motility. Two main components of cytoskeleton, tubulin polymerizing into microtubules (MTs) and actin polymerizing into actin filaments (AFs), are found in all eukaryotic cells (Wiese and Zheng, 1999). Low temperature is a major limitation of plant growth. Although many studies have been carried out to understand how very low, but still positive temperatures affect plant growth, much less is known about the influence of cold on the main cytoskeleton components (MTs and AFs). Temperatures approaching 4°C are known to depolymerize microtubules in many cell types, including plant cells (Wallin and Stromberg, 1995). It was found recently, that a low temperature (0.5°C) treatment of *Arabidopsis thaliana* seedlings during 4 hour leads to depolymerization of cortical microtubules in cells of transition, elongation and differentiation root zones (Sheremet, 2011).

In this work we studied the effect of temperature 4°C on growth, morphology and organization of actin filaments in the root cells of 4-day-old *A. thaliana* seedlings, expressing chimeric gene *gfp* (Green Fluorescent Protein) - *fabD2* (Fibrin actin-binding domain 2), which enables to visualize actin filaments in the cells of this line using confocal laser scanning microscope LSM 510 META (Carl Zeiss, Germany). Our studies have shown that cold is an important factor that affects on the growth, morphology and organization of actin filaments in plant cells. It has been revealed that the low temperature has an inhibitory effect on the growth of the main roots of *A. thaliana* (GFP - FABD2) and causes anisotropic increase in the diameter of epidermal cell in elongation zone, and initiates the formation of ectopic root hairs and increase their number in the differentiation zone. Also, it has been observed the changes in organization of actin filaments in epidermal cells of different zones of the main roots. Observed disorientation and partially depolymerization actin filaments in most cells of the transition zone and individual cells only a few strands of long actin filaments are found.

ОСОБЕННОСТИ CO₂/H₂O ОБМЕНА *BETULA PENDULA* (BETULACEAE) В ПРИРОДЕ И ЭКСПЕРИМЕНТЕ

В.Б. Придача, Т.А. Сазонова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт леса Карельского научного центра РАН

Россия, г. Петрозаводск, e-mail: pridacha@krc.karelia.ru

Виды *Betula* L. имеют широкий ареал, различные природные условия которого обуславливают высокий полиморфизм фенотипических признаков представителей рода *Betula*. Особый интерес для исследователей представляет карельская береза в связи с выявлением механизмов формирования структурных аномалий. Целью работы было комплексное изучение показателей CO₂ и H₂O обмена обычной березы повислой (*Betula pendula* var. *pendula*) и карельской березы (*Betula pendula* var. *carelica*) в естественных и экспериментальных условиях при разной обеспеченности среды азотом. Исследование проводили в средней тайге на экспериментальных участках Института леса КарНЦ РАН (южная Карелия, N 61°45', E 34°20'). Объектами исследований были деревья обычной березы повислой и карельской березы, произрастающие в фоновых условиях и выращиваемые в эксперименте с внесением азотнокислого аммония (NH₄NO₃). Измерения показателей CO₂/H₂O обмена листа берез проводили с помощью портативной фотосинтетической системы LI-COR 6400XT (LI-COR Inc., США) и камеры давления Plant Moisture Vessel SKPM 1400 (Skye Instruments Ltd., Великобритания).

Проведенные в фоновых условиях исследования CO₂/H₂O обмена листа обычной березы повислой и карельской березы показали сходство суточной и вегетационной динамик показателей обмена двух форм березы. Следует отметить более высокие значения устьичной проводимости (g_s), интенсивности фотосинтеза (A) и транспирации (E) листа березы повислой по сравнению с карельской березой. При этом с усилением выраженности узорчатой текстуры древесины ствола в онтогенезе для исследуемых форм берез было установлено увеличение степени различий водного дефицита (WSD) и насыщающего содержания воды (WC_s) в листе. В экспериментальных условиях с внесением удобрения (NH₄NO₃) как у березы повислой, так и у карельской березы было установлено увеличение g_s , интенсивности A и E листа. При этом рост интенсивности E листа сопровождался увеличением водного потенциала (ψ) облиственного побега березы повислой, тогда как у карельской березы отмечена стабилизация этого показателя. Факт более высоких значений содержания воды (WC_f) в листе карельской березы по сравнению с березой повислой может свидетельствовать о большей засухоустойчивости карельской березы.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 13-04-00827-а)

FEATURES OF CO₂/H₂O EXCHANGE IN *BETULA PENDULA* (BETULACEAE) IN NATURE AND IN THE EXPERIMENT

V.B. Pridacha, T.A. Sazonova

Forest Research Institute KarRC RAS,

Russia, Petrozavodsk, e-mail: pridacha@krc.karelia.ru

Betula L. species have a wide distribution range with a varied natural environment which causes high polymorphism of phenotypic traits in genus *Betula*. Of particular interest to researchers is Karelian (curly) birch (*Betula pendula* Roth var. *carelica* (Merclin) Hämet Ahti) and identification of the mechanisms for the formation of structural anomalies in it. The purpose of this study was to analyze the indexes of CO₂/H₂O exchange in common silver birch (*Betula pendula* var. *pendula*) and Karelian birch (*Betula pendula* var. *carelica*) under natural and experimental conditions at different nitrogen availability. The study was carried out in the sample plots of the Forest Research Institute of the Karelian Research Center of RAS (south Karelia, N 61°45', E 34°20') in the middle taiga subzone. Silver birch and Karelian birch were studied under background and experimental conditions at different NH₄NO₃ availability. The indexes of CO₂/H₂O exchange in the birches were measured using the portable photosynthesis system LI-COR 6400XT (LI-COR Inc., USA) and the pressure chamber Plant Moisture Vessel SKPM 1400 (Skye Instruments Ltd., UK).

The studies under natural background conditions showed that daily and seasonal patterns of the variables of CO₂/H₂O exchange were similar in the two birch forms. The values of the stomatal conductance (g_s), rates of photosynthesis (A) and transpiration (E) in the leaf were higher in silver birch. The differences between silver birch and Karelian birch in terms of the water deficit (WSD) and the saturating leaf water content (WC_s) increased with tree age and growing expression of structural abnormalities of trunk tissues. When treated with nitrogen (NH₄NO₃) both birch forms demonstrated a rise in g_s , rates of A and E in the leaf. In silver birch the rise in the leaf E rate came along with a rise in the water potential (Ψ) of the foliated shoot. The change accompanying the rise in leaf E rate in Karelian birch was stabilization in Ψ of the foliated shoot. The fact that the available water content (WC_f) in the leaf of Karelian birch is higher than in silver birch can testify to greater drought resistances of Karelian birch.

The study was supported by grant (13-04-00827-a) of the Russian Foundation of Basic Research (RFBR).

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ W7 – ИНГИБИТОРА СЕРИН-ТРЕОНИНОВЫХ ПРОТЕИНКИНАЗ ПРИ АГРОБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ РАСТЕНИЙ

В.В Федорчук, А.И. Емец

ГУ «Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины»

04123, Украина, Киев, ул. Осиповського, 2а,

e-mail: nikafedorchuk@gmail.com

Недавно было показано, что использование ингибиторов протеинкиназ и протеинфосфатаз во время агробактериальной трансформации значительно повышает эффективность трансформации сосны белой (*Pinus parviflora*). В частности, было установлено, что использование трифлюоперазина увеличивает эффективность трансформации эксплантов в 2,5 раза по сравнению с контролем (Tang et al., 2007). Было сделано предположение, что трифлюоперазин ингибирует Ca^{2+} -кальмодулин-зависимую стимуляцию 3'-5' фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов, которая, в свою очередь, играет важную роль в защитных механизмах растений во время бактериальной инфекции. На сегодняшний день актуальным вопросом остается изучение влияния ингибиторов разных типов протеинкиназ на эффективность трансформации цветковых растений.

В данной работе нами было изучено влияние ингибитора серин-треониновых протеинкиназ, в частности Ca^{2+} -кальмодулин зависимых протеинкиназ - W7, на эффективность *Agrobacterium* – опосредовательной трансформации двудольных растений. Для этого использовали листовые диски размером 1,5-2,5 см² в качестве эксплантов *N. tabacum*. Действие W7 (Sigma, США) изучали в диапазоне его концентраций от 5 до 100 мкМ путем добавления в среду для ко-культивирования с агробактерией. Также тестировали влияние продолжительности обработки ингибитором от 10 мин до 48 ч. Трансформацию проводили с использованием штамма AGL1 *A. tumefaciens*, несущего плазмиду рGH217 с селективным маркерным геном *hpt*, обеспечивающим устойчивость к гигромицину у трансформантов, и геном *gus*. В результате проведенных исследований было установлено, что эффективность трансформации, при использовании W7 в концентрациях 25, 50, и 100 мкМ составляла 70, 50 и 20%, соответственно, по сравнению с контролем (73%). Однако, несмотря на то, что эффективность трансформации не превышала контроль, использование данных концентраций W7 приводило к значительному повышению эффективности регенерации и скорости роста растений-регенерантов по сравнению с контролем. В частности, через 10 дней наблюдали регенерацию побегов, а через месяц после агробактериальной трансформации получали полноценные растения, которые достигали 13 см в высоту, в то время как в контроле они не превышали 0,5-1 см. Таким образом, нами было установлено, что использование W7 при *Agrobacterium*–опосредовательной трансформации эффективно стимулирует регенерацию растений *N. tabacum*, трансгенная природа которых была подтверждена нами с помощью молекулярно-генетического и гистохимического методов анализа.

IMPROVEMENT OF *AGROBACTERIUM*-MEDIATED PLANTS TRANSFORMATION USING W7, AN INHIBITOR OF CALMODULIN-DEPENDENT PROTEIN KINASES

V.V. Fedorchuk, A.I. Yemets

Institute of Food Biotechnology and Genomics NAS of Ukraine

Ukraine, Kyiv, 2a Osipovskogo Str., e-mail: nikafedorchuk@gmail.com

It was recently shown that the use of inhibitors of serine-threonine protein kinases and protein phosphatases during *Agrobacterium*-mediated transformation increases the efficiency of white pine embryos transformation significantly. For instance, trifluoperazine (150 μ M), an inhibitor of Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinases, promoted 2.5-fold increase of the transformation frequency after embryos treatment as compared to control samples (Tang et al., 2007). It was suggested that trifluoperazine inhibits Ca^{2+} -calmodulin-dependent stimulation of 3'-5' cyclic nucleotide phosphodiesterase that plays an important role in the protective reactions of plants during agrobacterial infection.

In this study we have investigated the effects of W7 on the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of dicotyledons. We transformed aseptic young leaf explants of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.), which size varies from 1.5 to 2.5 cm^2 . The effect of W7 (in concentrations from 5 to 100 μ M) was studied by adding inhibitor to the medium for *Agrobacterium* co-cultivation with explants. Also the effect of inhibitor treatment duration from 10 min to 48 h was tested. Transformation was performed using a *Agrobacterium* strain AGL1 bearing the pGH217 vector construction with a selective marker gene *hpt* (hygromycin resistance). All experiments were performed in three replicates.

It was found that explants treatment with W7 in concentrations 25, 50 and 100 μ M resulted in transformation frequency of 70, 50 and 20%, respectively, compared to control (73%). Despite the fact that the transformation efficiency did not exceed control, significant increase of regeneration efficiency and growth rate of regenerated plants was observed after W7 treatment. Notably, we obtained full regenerated tobacco shoots of 13 cm in height after one month of cultivation with W7, while the control samples did not exceed 0.5-1 cm.

Thus, we have found that the use of W7 in *Agrobacterium*-mediated transformation efficiently stimulates the regeneration of *Nicotiana tabacum* plants, transgenic nature of which we have confirmed using molecular-genetic and histochemical methods of analysis.

ВЛИЯНИЕ НОВЫХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НА ХРАНЕНИЕ РОЗЕТОК *FRAGARIA ANANASSA* ВНЕ СЕЗОНА

С.А. Хапова

ФГБОУ ВПО «Ярославская ГСХА»,

Россия, Ярославль, e-mail: *khapovas@mail.ru*

Для решения существующих в садоводстве и питомниководстве проблем и обеспечения населения страны свежей плодово-ягодной продукцией отечественного производства необходимо применять интенсивные элементы технологии, как для получения высоких урожаев, так и выращивания качественного посадочного материала. В исследованиях последних лет, ученые отмечают высокую эффективность регуляторов роста при культивировании сельскохозяйственных культур.

Целью нашей работы было изучить новые препараты, полученные на основе тозилметакриловой кислоты.

Исследования проводили в 2011-2013 г. Опыт заложен на территории фермерского хозяйства «Бурмасово» Ярославской области, а биохимические анализы проводили на кафедре экологии ФГБОУ ВПО «Ярославская государственной сельскохозяйственной академии».

В осенний период обрабатывали розетки растений земляники трех сортов: Хоней, Эльсанта, Мармелада регуляторами роста, полученным в Ярославском государственном техническом университете (ФГБОУ ВПО «ЯГТУ») - патент Российской Федерации № 2448088, сокращенно в тексте - (PPP № 88) и PPP № 105 на основе триэтиламмониевой соли. 1. Контроль (вода) 2. Экогель (контроль); 3. PPP № 105; 4. PPP № 88.

Розетки обрабатывали регуляторами роста, укладывали в полиэтиленовые мешки по 500 штук. Хранили при температуре 2⁰С до марта и высаживали в теплицу для получения стандартной рассады вне сезона и раннего урожая. Новые препараты способствовали лучшему хранению розеток всех изучаемых сортов: Мармелада – 99%, Хоней – 97%, Эльсанта – 95%, что на 7% выше, чем при обработке Экогелем и на 22%, чем контрольный вариант. Обработка растений в начале вегетации и в период выдвижения цветоносов препаратом PPP № 105 ведет к увеличению числа завязавшихся ягод, что существенно сказывается на продуктивности насаждений. Можно предположить, что действие препарата на основе тозилметокриловой кислоты проявляется в составе рецепторного комплекса, который активизирует РНК- полимеразу, способствует накоплению РНК. При этом инициируется процесс биосинтеза белка.

Таким образом, обработка розеток влияет на активацию физиологических процессов растений. Препарат PPP № 88 оказывает положительно воздействие на фотосинтез в листьях земляники, повышает устойчивость к болезням в период хранения, а в период укоренения рассады способствует увеличению всасывающих корешков в 2,5 раза.

THE IMPACT OF NEW PHYSIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCE ON STORAGE OF *FRAGARIA ANANASSA*'S CROWNS DURING THE OFF-SEASON

S.A. Khapova

YSAA

Russia, Yaroslavl, e-mail: *khapovas@mail.ru*

We should use intensive technology elements for high productivity and growing of quality seeding production. It also gives the solution of such a problem, as providing population of our country with fresh domestic products (fruits and berries) and it solves problems, existing in Russian gardening and plant nurseries. In the latest researches scientists point out the high efficiency of plant growth substances on cultivated crops.

The aim of our research was to study new preparations, based on tozilmethylacril acid. Studies were hold in 2011-2013. The experience was conducted on the territory of the farm "Burmasovo" (Yaroslavl region), but biochemical measures analyzes were taken on ecology department of Yaroslavl State Agricultural Academy.

The crowns of strawberries of 3 cultivars (Honey, Elesanta, Marmolada) were processed with plant growth substances in autumn. These substances were worked out in Yaroslavl State Technical University (patent of Russia Federation № 2448088, abbreviation PPP № 88 and PPP № 105, based on triethylammonium salt). 1. Control (water) 2. Ecogel (control) 3. PPP № 105 4. PPP № 88

Crowns were processed with plant growth substances, than 500 crowns laid in plastic bags. These bags were stored in the temperature 2°C until March. Crowns were planted in the greenhouse for seedling production in off-season and early crop of strawberry.

New preparations promote the storage of crowns of all cultivars: Marmolada - 95%, Honey – 97%, Elsanta – 95%. It's 7 per cents more, than processing with Ecogel and on 22 per cent more than in control group variant.

Processing plants with PPP № 105 at the beginning of vegetation and nomination period of peduncle flower-bearing stem leads to increasing the number of ovaries. It affects on productivity. We can suggest, that preparation based on tozilmethylacril acid can be seen in receptor complex, which activates RNA polymerase and helps RNA accumulation.

Wherein the protein biosynthesis is initiated. In conclusion, crown's processing influences on activation of physiological processes of plants. PPP № 88 has positive impact photosynthesis of strawberry's leaves, it also increases resistance to fungal diseases during the storage, and at the time of seedlings' rooting it leads to increasing number of absorption suction roots at 2.5.

СЕКЦИЯ 7.
SECTION 7.

РЕПРОДУКТИВНАЯ БИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ В
СОХРАНЕНИИ БИОРАЗНООБРАЗИЯ

PLANT REPRODUCTIVE BIOLOGY IN BIODIVERSITY
CONSERVATION

ОПТИМИЗАЦИЯ СЕМЕННОГО РАЗМНОЖЕНИЯ У ВИДОВ РОДА *PAEONIA* В СВЯЗИ С ПРОБЛЕМОЙ ПОКОЯ СЕМЯН

О.Г. Бутузова, Н.А. Жинкина

Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, 2,
e-mail: tb_batygina@mail.ru

Проблема семенной репродукции видов рода *Paeonia* связана с наличием в семенах морфо-физиологического эпикотильного покоя, который определяется недоразвитостью зародыша и физиологическим механизмом торможения (ФМТ) прорастания корня и эпикотиля.

В природе у разных видов пиона часть семян прорастают весной следующего года, другие через год или два, что способствует формированию почвенного банка семян. Это является следствием генетической и физиологической гетерогенности зародыша. В ходе эмбриогенеза половой, не дифференцированный на органы зародыш уступает место соматическому, дифференцированному на органы (Batygina, Bruchin, 1994). Развитие апексов побега и зародышевого корня, очевидно, также происходит по разным морфогенетическим программам.

В данной работе проводился эксперимент по проращиванию двух видов *Paeonia* – *P. anomala* и *P. veitchii*, отличающихся степенью дифференциации зародыша в семени на момент диссеминации, глубиной покоя и сроками прорастания. Семена, собранные с растений, интродуцированных в Ботаническом саду БИН РАН, проращивались при 0-3 и 20-22°C, а также при переменных температурах.

Зрелые семена *P. anomala* гетерогенны по степени дифференциации зародыша, который может находиться на глобулярной, сердечковидной или ранне торпедовидной стадии. Переход к органогенезу осуществляется при 20-22°C. Снятие ФМТ прорастания происходит при низких температурах, что приводит к росту и выходу зародышевого корня в тепле. После этого эпикотильный покой также снимается действием низких температур (0-3°C). Максимальный процент прорастания зародышевого корня наблюдался у семян, собранных с недозрелых плодолистиков – 75% в течение 4 мес. при переменной температуре (переносе с 20-22 на 0-3°C) и 42% при постоянной температуре 20-22°C. Эпикотильный покой снимается низкими температурами (0-3°C) в течение месяца.

Семена *P. veitchii*, зародыш которых на момент диссеминации дифференцирован на органы, проращивались при постоянной температуре 23°C. Выход корешка наблюдался уже через 3.5 месяца. Для снятия ФМТ прорастания эпикотиля проростки выдерживались при 0-3°C, а затем высаживались в грунт и давали полноценные всходы.

Таким образом, в ходе эксперимента удалось сократить срок прорастания семян с одного года до 5 мес. *P. anomala* и до 3,5 мес. у *P. veitchii*. Результаты в дальнейшем послужат для практических целей массового тиражирования ценных лекарственных видов этого рода.

OPTIMIZATION OF SEED PROPAGATION IN SPECIES OF *PAEONIA* IN RELATED TO PROBLEM OF SEED DORMANCY

O.G. Butuzova, N.A. Zhinkina

Komarov Botanical Institute of RAS

197376, Russia, St-Petersburg, Prof. Popov Str., 2, e-mail: tb_batygina@mail.ru

The problem of seed reproduction in *Paeonia* species is related with the presence of morpho-physiological epicotyl seed dormancy, which is conditioned by underdeveloped embryo and physiological mechanism of inhibition (PMI) of root and epicotyl germination.

In nature a part of the seeds of different peony species germinate in the following spring, the others - a year or two later, that contributes to the formation of the soil seed bank. This is a consequence of physiological and genetic heterogeneity of embryos. During embryogenesis the sexual not differentiated on organs embryo replaces by somatic one, differentiated on organs (Batygina, Brukhin, 1994). Development of embryo shoot and root apexes is obviously realized according various morphogenetic programs.

In this work the experiment on the germination of two *Paeonia* species – *P. anomala* and *P. veitchii*, differ in the degree of embryo differentiation at the time of dissemination, the depth of dormancy and periods of germination, was carried out. Seeds collected from plants introduced in the Botanical garden of BIN RAS, germinated at 0-3 and 20-22°C, and also at changing temperatures.

Mature seeds of *P. anomala* are heterogeneous in the degree of differentiation of the embryo, which could be at the globular, heart-shaped or early torpedo stages. Transition to organogenesis occurs at 20-22°C. Breaking down of PMI germination occurs at low temperatures, that follows by the growth and yield of embryo roots in warm. After this epicotyl dormancy is also breaking down by the influence of low temperatures (0-3°C). Maximal percentage of embryo root germination was observed in the seeds collected from immature carpels – 75% within 4 months at variable temperature (transferring from 20-22 to 0-3°C) and 42% at constant temperature 20-22°C. Epicotyl dormancy is removing by low temperatures (0-3°C) for a month.

The seeds of *P. veitchii*, which embryo at the moment of dissemination is differentiated on organs, were germinated at constant temperature 23°C. Root exit was observed already after 3.5 months. In order to breaking down PMI of epicotyl germination seedlings were kept at 0-3°C and then planted in the ground where they gave full germination.

Thus in the course of experiment we managed to reduce seed germination period from one year to 5 months in *P. anomala* and 3.5 months – in *P. veitchii*. In future these results could be used for practical purposes in mass replication of medicinal species of this genus.

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННОГО АУКСИНА НА РАЗВИТИЕ ЖЕНСКИХ РЕПРОДУКТИВНЫХ СТРУКТУР *ALLIUM TUBEROSIM* ROXB. В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Г.Ю. Виноградова

Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН

Россия, Санкт-Петербург, e-mail: galinavin@mail.ru

Зародышевый мешок - высокоорганизованная упорядоченная система, в которой происходят ключевые процессы половой репродукции: дифференциация гамет, оплодотворение и развитие зародыша. Зародышевый мешок развивается внутри материнских тканей семязачатка, формирующих систему транспорта веществ, обеспечивающую физиологический баланс, полярность и морфогенетический градиент (позиционную информацию) в зародышевом мешке, которые являются важным фактором в процессах дифференциации и специализации его элементов (Герасимова-Навашина, 1958; Reiser, Fisher, 1993; Еналеева, 2002; Yadegari, Drews, 2004; Punwani, Drews, 2008). Источником позиционной информации может выступать ауксин, локализующийся в определенных участках зародышевого мешка по градиенту оси микропиле-халаза (Pagnussat et al., 2009).

С целью изучения характера действия ауксина на развитие женского гаметофита и дифференциацию его элементов проведен анализ результатов культивирования бутонов *Allium tuberosum* Roxb. (*Alliaceae*) в период прохождения процессов мегаспорогенеза и развития зародышевого мешка на основной среде BDS с различными концентрациями ауксина (НУК – 0,5 мг/л, 1,0 мг/л и 1,5 мг/л). Выявлены наиболее чувствительные стадии к экзогенному ауксину: созревание мегаспороцита и мегаспорогенез; а также 2-4-ядерные стадии формирования зародышевого мешка. В первом случае отмечено два варианта развития: 1) мейоз происходит нормально с образованием после первого деления диады клеток, сохраняющих длительное время свою жизнеспособность, а в некоторых случаях вступление во второе деление микропилярной клетки, а не халазальной (что не типично для биспорического типа); 2) формирование диплоспорического зародышевого мешка посредством митотического деления мегаспороцита. Кроме того, действие экзогенного ауксина на семязачатки на стадии археспориальной клетки стимулировало рост соседних нуцеллярных клеток и их пролиферацию с образованием дополнительных зародышевых мешков. Увеличение концентрации гормона в некоторых случаях приводило к нарушению синхронности делений на полюсах и в результате к различному числу ядер и клеток. Также отмечена ранняя специализация элементов на микропилярном полюсе (особенно синергид), и задержка - на халазальном полюсе. В некоторых случаях при длительном культивировании отмечено деление синергид, в единичных - развитие зародыша на халазальном полюсе.

INFLUENCE OF EXOGENOUS AUXIN ON THE DEVELOPMENT OF *ALLIUM TUBEROSIM* ROXB. FEMALE REPRODUCTIVE STRUCTURES *IN VITRO*

G.Yu. Vinogradova

Komarov Botanical Institute of Russian Academy of Sciences

Russia, St. Petersburg, e-mail: galinavin@mail.ru

Embryo sac is a high organized and ordered system in which the key processes of sexual reproduction: gamete differentiation, fertilization and embryo development. Embryo sac develops within the maternal tissues of ovule, forming a transport system of substances allowing physiological balance, polarity and morphogenetic gradient (positional information) in embryo sac, which are an important factor in the processes of its elements differentiation and specialization (Gerassimova-Navashina, 1958; Reiser, Fisher, 1993; Enaleeva, 2002; Yadegari, Drews, 2004; Punwani, Drews, 2008). Source of positional information can be auxin located in certain areas of the embryo sac across the gradient micropyle-chalaza axis (Pagnussat et al., 2009).

To examine the nature of the auxin action on the female gametophyte development and its elements differentiation, we carried out analysis of the flower buds *Allium tuberosum* Roxb. (*Alliaceae*) cultivation during the processes of megasporogenesis and embryo sac development on the BDS medium, containing various concentrations of auxin (NAA - 0.5 mg/l, 1.0 mg/l and 1.5 mg/l). We revealed stages the most sensitive to exogenous auxin: megasporocyte maturation and megasporogenesis, and stages of 2-4-nucleate embryo sac formation. In the first case, it has been pointed out two variants: 1) meiosis occurs normally with the formation of the dyad cell after first division, which retain their viability for a long time, and in some cases, micropilar cell entry in the second division, and not halazal cell (which is not typical for bisporic type); 2) formation the diplosporic embryo sac through mitotic division of megasporocyte. In addition, the effect of exogenous auxin on ovules with archesporial cells stimulated the growth of neighbouring nucellar cells and their proliferation with additional embryo sacs formation. An increase in concentration of the hormone in some cases resulted in disturbance of the synchrony in divisions at the poles and in the result to a different number of nuclei and cells. It has also been noted early elements specialization on micropilar pole (especially synergids) and delay - on halazal pole. In some cases, with long time culturing division in synergid and embryo development on halazal pole was noted.

СЕМЕННАЯ ПРОДУКТИВНОСТЬ СОРТОВ КАННЫ САДОВОЙ (*CANNA* × *GENERALIS BAILEY*) В УСЛОВИЯХ ЛЕВОБЕРЕЖНОЙ ЛЕСОСТЕПИ УКРАИНЫ

Л.П. Колб¹, Г.С. Захаренко²

Прилуцкая опытная станция,

Украина, г. Прилуки, e-mail: lyubenik@mail.ru

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр

298648, Республика Крым, г. Ялта, e-mail: cupressus@inbox.ru

Коллекция канны садовой на Прилуцкой опытной станции Национальной академии аграрных наук Украины создана при активной помощи Никитского ботанического сада, откуда поступило большинство сортов. Объектом исследования, проведенного в 2012-2013 гг., были сорта группы Крози: 'А. Wendgausen', 'Clara Vuisson', 'Весёлые Нотки', 'Восток-2', 'Маэстро', 'Салют Победы', 'Солнечная Красавица', отличающиеся в районе исследования высокими декоративными качествами и пользующиеся спросом в озеленении. Каждый сорт был представлен 20 растениями

Потенциальную семенную продуктивность (ПСП) определяли по количеству семенных зачатков в цветках растения; фактическую семенную продуктивность (ФСП) – по количеству семян, завязавшихся на растении; коэффициент плодоношения (КП) как отношение числа плодов к числу цветов в соцветиях растения, а коэффициент семенной продуктивности (КСП) как отношение ФСП к показателю ПСП.

Исследование показало, что сорта существенно отличаются по количеству цветков в соцветии, количеству завязавшихся плодов и семян в плодах. Наименьшее среднее число цветков в соцветии отмечено у сорта 'Салют Победы' ($20,0 \pm 2,2$ шт.), а наибольшее у 'Восток-2' ($25,0 \pm 2,1$ шт.). При этом наибольшее число завязавшихся плодов из цветков соцветия отмечено у сорта 'Салют Победы' ($6,5 \pm 0,9$ шт.), а наименьшее у зарубежного сорта 'А. Wendgausen' ($1,6 \pm 0,4$ шт.). Среднее число семян в плоде одного соцветия у изучаемых сортов варьировало от $1,5 \pm 0,04$ шт. ('А. Wendgausen') до $3,4 \pm 0,2$ шт. ('Восток-2'). Близкие к максимальному среднему значению показатели числа семян в плоде имели отечественные сорта 'Салют Победы' и 'Солнечная Красавица', соответственно $3,3 \pm 0,4$ и $3,0 \pm 0,1$ семени. В связи с различным числом цветков в соцветии и цветоносных побегов на растении сорта значительно различаются по потенциальной семенной продуктивности, которая варьирует от $676,8 \pm 1,6$ ('Солнечная Красавица') до $2887,2 \pm 12,2$ ('Маэстро') семязачатков на одном растении. В связи с различием сортов по завязываемости плодов и числу полноценных семян в плоде они значительно варьируют по фактической семенной продуктивности отдельных растений – от $7,1 \pm 0,5$ семян у 'А. Wendgausen' (КСП 0,76%) до $128,5 \pm 6,1$ шт. у 'Восток-2' (КСП 7,22%).

Полученные результаты показывают, что в условиях Левобережной Лесостепи Украины у большинства изученных сортов канны садовой успешно проходят все этапы репродуктивного процесса и возможно ведение селекции с использованием в качестве родительских форм как отечественных, так и зарубежных сортов.

SEED PRODUCTIVITY OF CANNA (*CANNA X GENERALIS* BAILEYS) CULTIVARS IN THE CONDITION OF LEFT-BANK FOREST STEPPE OF UKRAINE.

L.P. Kolb, G.S. Zakharenko

Prilutskaya experimental station

Ukraine, Priluki, e-mail: *lyubenik@mail.ru*

Nikitsky Botanical Gardens – National Scientific Center

Crimea, Yalta, e-mail: *cupressus@inbox.ru*

Canna collection in Prilutskaya experimental station of National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine has been formed with an active help of Nikitsky Botanical Gardens. The largest quantity of varieties was sent there from NBG-NSC. The subjects of the investigations in 2012-2013 were varieties from Krozy group 'A. Wendgausen', 'Clara Buisson', 'Vesyelye Notki', 'Vostok-2'. 'Maestro', 'Salut Pobely', 'Solnechnaya Krasavitsa' differed by highly ornamental quality in the region of the investigation and had a success in landscape gardening were the objects of researches done. Each variety was presented with 20 plants.

Potential seed productivity (PSP) was determined according to the number of ovules in plant flowers; real seed productivity (RSP) – according to the number of seed-setting rate on the plants; fruiting coefficient (FC) – as the ratio of fruits number to the number of flowers in the inflorescence of plant and coefficient of seed productivity (CSP) – as the ratio of RSP to the index of PSP.

The investigation showed that varieties had intrinsic differences in number of flowers in the inflorescence, number of capsules-setting and seeds in capsule. The least average number of flowers in the inflorescence is in variety 'Salut Pobedy' (20.0 ± 2.2) and the largest – in variety 'Vostok-2' (25.0 ± 2.1). Though the largest number of capsule-setting per inflorescence was noticed in variety 'Salut Pobedy' (6.5 ± 0.9), the least – in foreign variety 'A. Wendgausen' (1.6 ± 0.4). Average number of seeds per capsule from one inflorescence in studied varieties varied from 1.5 ± 0.04 ('A. Wendgausen') up to 3.4 ± 0.2 ('Vostok-2'). Varieties 'Salut Pobedy' and 'Solnechnaya Krasavitsa' have the closest to maximal average index of seeds number in capsule (from 3.3 ± 0.4 and 3.0 ± 0.1 seeds). Varieties much differ on their potential seed productivity which varies from 676.8 ± 1.6 ('Solnechnaya Krasavitsa') up to 2887.2 ± 12.2 ('Maestro') ovules per plant due to the different number of flowers in an inflorescence and peduncles on a plant. Because of the differences in fruit-setting and number of valuable seeds per capsule varieties considerably vary in real seed productivity of separate plant - from 7.1 ± 0.5 seeds in 'A. Wendgausen' (CSP 0.76%) up to 128.5 ± 6.1 in 'Vostok-2' (CSP 7.22%).

Obtained results show that in the conditions of Left-bank Forest Steppe of Ukraine most of studied Canna varieties successfully pass through all stages of reproductive process and breeding work is possible with the use of both native and foreign varieties selection as the parents' forms.

РОЛЬ КЛЕТОЧНОГО ОТБОРА В УСТОЙЧИВОСТИ ГЕНЕРАТИВНОЙ СФЕРЫ РАСТЕНИЙ К ВОЗДЕЙСТВИЮ МУТАГЕННЫХ ФАКТОРОВ

Е.А. Кравец

ГУ «Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины»

Украина, г. Киев, e-mail: *kravetshelen@gmail.com*

Полученные данные свидетельствуют о том, что клеточный отбор, происходящий в генеративных тканях растений, включая гаметофит, играет ключевую роль в устойчивости растений к мутагенному действию радиации, обеспечивая «генетическую чистоту» в потомстве. Цитопатология генеративной сферы растений озимой пшеницы, ржи и ячменя определяется спектром и уровнем спонтанного мутагенеза этих генотипов и характеризуется неспецифичностью. В мужской генеративной сфере активизируется цитомиксис, нарушаются поляризация и синтез цитоплазмы в пыльцевом зерне (ПЗ), возрастает полиморфизм и стерильность пыльцы, а в случае гамма-облучения появляются хромосомные aberrации при делении генеративной клетки и гибель спермиев. Согласно морфологическим критериям, клеточный отбор в тканях микроспорангия представлен разными типами ПКГ: некрозом в ходе мейотического отбора и утилизации пыльцы, аутофагией и апоптозом при развитии ПЗ с нарушенным синтезом цитоплазмы.

На эффективность клеточного отбора влияет уровень пloidности, геномной нестабильности, гетерозиготности генотипов, а также половой диморфизм. У полиплоидов гаплонтный отбор действует не всегда эффективно, что приводит к сохранению потенциально летальных повреждений. Полиплоидия у аллогамного вида (ржи) индуцирует повышение геномной нестабильности и снижение устойчивости к действию стресса. Напротив, у автогамного вида (пшеницы), она способствует повышению радиоустойчивости. У пшеницы обнаружена высокая активность пред- и мейотического отбора, а у ржи – гаплонтного отбора. У диплоидных генотипов наблюдаются последовательное снижение уровня хромосомных aberrаций в микроспорогенезе к стадии тетрад или микроспоры и улучшение качества пыльцы к завершению гаплофазы. Мужская генеративная система пшеницы, в сравнении с женской, подвержена более интенсивному мутагенезу и менее эффективно освобождается от мутационного груза, сохраняя скрытые повреждения в ряде поколений.

Активизация механизмов клеточного отбора носит пороговый характер. В диапазоне малых доз УФ-индуцированные повреждения сохраняются во многих клеточных генерациях, но с увеличением дозы облучения «генетический груз» ликвидируется. Так, через активизацию цитомиксиса удаляются генетически несбалансированные и нерепарируемые инициалы половых клеток, регулируется численность и трофика микроспороцитов и поддерживается, таким образом, тканевый гомеостаз пыльника.

ROLE OF CELL SELECTION IN THE STABILITY OF PLANTS' GENERATIVE SPHERE AT CONDITIONS OF IMPACT OF MUTAGENIC FACTORS

E.A. Kravets

Institute of Food Biotechnology and Genomics NAS of Ukraine

Ukraine, Kiev, e-mail: *kravetshelen@gmail.com*

The data being received shows that cell selection in generative tissues of plants plays a key role in the plant resistance to the mutagenic effects of radiation, providing a "genetic purity" in its progeny. Cytopathology of the generative sphere of winter wheat, rye and barley plants is connected with genotype spectrum and level of spontaneous mutagenesis and is characterized by nonspecificity. Cytomixis is activated in the male generative sphere, polarization and synthesis of cytoplasm in the pollen grain (PG) is violated. Polymorphism and pollen sterility rises and in the case of gamma- irradiation appearance of the chromosomal aberrations in generative cell division and death of sperm are observed. According to morphological criteria the cell selection in cellular tissue of microsporangium is presented by different types of PCD: necrosis during meiotic selection and utilization of pollen, autophagy and apoptosis in the development of the PG. The ploidy level, genomic instability, heterozygous, as well as sexual dimorphism has influence on effectiveness of cell selection. Haplontic selection does not always acts efficiently for polyploidy genotypes leading to the preservation of potentially lethal damage. Polyploidy for cross-pollinated species (rye) induces an increase of genomic instability and decrease of resistance to stress. In contrary, for self-pollinated species (wheat) it promotes to increase of radioresistance. For wheat we found a high activity of pre-meiotic and meiotic selection, but for rye – haplontic selection. In diploidy genotypes we have observed a steady decline of chromosomal aberrations in microsporogenesis when approaching stage of tetrads or microspores and improvement of the quality of pollen at the finale of haplophase. Male generative system of wheat, compared with female one is exposed to more intensive mutagenesis and less effectively exempt from the mutational load, keeping hidden damage in a number of generations.

Activation of cell selection mechanisms has a threshold specific. Damages induced by low levels of UV-B radiation are not eliminated by cell selection and are preserved in many cell generations. High UV-B level has led to the activation of cell selection due to which the "genetic load" is eliminated. We presumed that by the activation of cytomixis the population of microsporocytes regulates its excess, and simultaneously eliminates the mutational load and solves the problems of nutritional character and so the tissue homeostasis in anther is maintained.

РЕПРОДУКТИВНАЯ СТРАТЕГИЯ *PINUS SYLVESTRIS* L., КАК СПОСОБ СОХРАНЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ И АДАПТАЦИИ ВИДА К ЗАСУХЕ

Н.Ф. Кузнецова

Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии
Россия, Воронеж, e-mail: *ekogenlab@mail.ru*

Известно, что под воздействием погодного стресса в системе «генотип-среда» и «популяция-среда» происходит перераспределение энергетических затрат между вегетативной и генеративной сферой растений. В одном случае, они тратят больше энергетических ресурсов для защиты онтогенеза. Во втором, поддерживают репродуктивное усилие растения в онтогенезе. Обе адаптивные реакции, как две жизненные стратегии, одинаково важны для выживания вида в экстремальных условиях. Целью исследований является изучение адаптивных перестроек, которые претерпевает генеративная сфера сосны на популяционном уровне по трем экологически зависимым признакам (самофертильность, процент и число семян на шишку) в длительной динамике. Анализ систем семенного размножения проводился при самоопылении (1987-1999 гг.) и свободном опылении (1987-2013 гг.) на одной и той же популяционной выборке. Выявлены ключевые механизмы, которые участвуют в формировании генотипического состава семян в оптимальные годы и в стрессовом градиенте 5-ти засух в Воронежской области (от слабой к сильной – 2001, 1995, 2007, 1991, 2012 гг.). Прослежены процессы, развитие которых индуцирует засуха. Это: подвижность систем семенного размножения (самоопыление - перекрестное опыление, уровень самофертильности, инбредное – аутбредное потомство) при свободном опылении; расширение генотипической изменчивости в рамках адаптивной нормы реакции признаков; дифференциальная реакция деревьев на погодный стресс (модальная, чувствительная и засухоустойчивая группа генотипов); селективная выживаемость семян определенной генетической конструкции (инбредных потомств и потомств от засухоустойчивых форм) и др.

Показано, что устойчивость семян к засухе вырабатывается с участием двух реакций – неспецифической и специфической. Неспецифическая реакция увеличивает в семенном генофонде долю инбредных потомств, а специфическая реакция – долю потомств от засухоустойчивых форм. Сопряженное действие обеих реакций адаптирует генофонд выживших семян к неблагоприятным условиям своего года и сохраняет их генетическое разнообразие. Но когда погодный стресс превышает адаптивную норму реакции (2012 г.) популяционная система утрачивает способность к адаптации и урожай полностью погибает. При долговременном селекционном давлении, как это имело место на юге лесостепной зоны, неспецифическая и специфическая реакции вели к формированию локальных лесных экосистем способных не только выживать, но и успешно воспроизводиться в экстремальных условиях.

REPRODUCTIVE STRATEGY OF *PINUS SYLVESTRIS* L., AS THE PRESERVATION WAY OF GENETIC DIVERSITY AND SPECIES ADAPTATION TO THE DROUGHT

N.F. Kuznetsova

All-Russian Research Institute of Forest Genetic, Breeding and Biotechnology
Russia, Voronezh, e-mail: *ekogenlab@mail.ru*

It is known, that during weather stress, a redistribution of energy expenditures expenses between the vegetative and generative sphere of plants in the system of "genotype-environment" and "population-environment" take place. In the 1st case, they use more energy resources for ontogeny protection. In the 2nd, they support the plant's reproductive effort in ontogeny. Both adaptive reactions, as two strategies of species survival in extreme conditions, are equally important for the species viability. The research aim is to study the adaptive reconstructions, which take place for a pine generative sphere by 3 ecologically dependent traits (self-fertility, percentage and number of seeds per cone) on the population level in prolonged dynamics. The analysis of the systems of seed reproduction was carried out by self-pollination (1987-1999) and open (1987-2013) pollination on the same population sample. The main mechanisms that participate in the formation of genotypic structure of seeds in optimal years and in stress gradient of 5 droughts in the Voronezh area (from weak to strong – 2001, 1995, 2007, 1991, 2012) are revealed. The adaptive processes, development of which is induced by a drought are tracked. These are: mobility of seed reproduction systems (self-pollination - cross-pollination, self-fertility level, inbred – outbred progeny) during open pollination; expansion of genotypic variability within the adaptive norm reaction of traits; differential response of individual trees to weather stress (modal, sensitive and drought-resistant group of genotypes); selective survival of seeds of the certain genetic structure (inbred progeny and progeny from the drought-resistant forms); etc.

It has been shown that drought-resistance of seed gene pool develops due to the participation of two reactions – nonspecific and specific. Nonspecific reaction increases a part of the inbred progeny in gene pool, and specific reaction increase a part of the progeny from the drought-resistant forms. The conjoint action of both reactions adapts the gene pool of the survived seeds to unfavorable conditions of the year and preserves them genetic diversity. But when the weather stress exceeds the adaptive reaction norm (2012) a population system loses ability for adaptation and its yield completely perishes. During lasting selection pressure, as it took place in the south of the forest-steppe zone, the nonspecific and specific reactions led to the formation of local forest ecosystems, which are capable not only to survive, but also to be reproduced successfully in extreme climatic conditions.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ЭМБРИОЛОГИЯ *PINUS SIBIRICA* DU TOUR С ОДНОЛЕТНИМ И ДВУХЛЕТНИМ ГЕНЕРАТИВНЫМ ЦИКЛОМ.

А.В. Лукина¹. И.Н. Третьякова²

¹Красноярская краевая станция юных натуралистов
Россия, Красноярск, e-mail: yunnatu@gmail.com

²Институт Леса им. Н. В. Сукачева
Россия, Красноярск, e-mail: _culture@ksk.krasn.ru

В естественном древостое Западного Саяна встречаются уникальные особи *P. sibirica*, завершающие формирование семян в течение одного года, вместо двух лет, как это свойственно другим представителям рода *Pinus*. В результате проведенных исследований были установлены особенности эмбриогенеза у особей с акселерацией развития мегастробилов, выявлены сходства и различия с типичными представителями *P. sibirica*.

Показано, что начальные этапы эмбриогенеза (заложение генеративных структур, рост и развитие семяпочек, опыление) у аномальных особей *P. sibirica* протекают так же как у типичных деревьев. Различия заключаются в уменьшении продолжительности свободноядерной (ценоцитной) стадии при формировании женского гаметофита. Оплодотворение яйцеклеток деревьев-акселератов не происходит. Обнаружено партеногенетическое деление гаплоидной яйцеклетки. Развитие зародышей останавливается на глобулярной стадии, гаметофит деградирует. Установлено, что коррозионная полость формируется независимо от развития зародыша.

По-видимому, особи с ускоренным генеративным циклом не способны к естественному семенному воспроизводству.

COMPARATIVE EMBRYOLOGICAL STUDY OF *PINUS SIBIRICA* DU TOUR WITH ONE AND TWO YEAR REPRODUCTIVE CYCLE

A.V. Lukina¹, I.N. Tretyakova²

¹Regional Centre for Young Naturalists

Russia, Krasnoyarsk, e-mail: *yunnatu@gmail.com*

²V.N. Sukachev Institute of Forest,

Russia, Krasnoyarsk, e-mail: *culture@ksk.krasn.ru*

Unique individuals of *Pinus sibirica* Du Tour are found in natural forests of the West Sayan mountainous region, which complete the forming of the seeds during one year instead of two years as it is characteristic for the other representatives of *Pinus* species.

In the result of our research we determined the features of embryogenesis of the individuals with acceleration of megastrobili development. We also revealed the similarities and differences with standard representatives of *P. sibirica*.

It is revealed, that the trees – accelerators of *P. sibirica* have the same early stages of embryogenesis (the origin of reproductive structure, the growth and the forming of ovule, pollination) as the standard trees do. The difference is that the free-nuclear stage in forming of female gametophyte phases shorter. There is no fertilization of ovules of the trees – accelerators. It was found that the haploid ovule has parthenogenetic division. Embryo formation ends at a globular phase, gametophyte destroys for 2 months. The corrosion cavity is forming independently of the embryo development.

Presumably, the individuals with accelerating reproductive phase are unable for natural seed reproduction.

ОСОБЕННОСТИ РАЗМНОЖЕНИЯ *CAMPANULA SIBIRICA* L., *C. TAURICA* JUZ. И *C. TALIEVII* JUZ. В КРЫМУ (CAMPANULACEAE)

Н.Н. Мирошниченко

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр

298648, Республика Крым, г. Ялта, пгт. Никита,

e-mail: Nataha.ru88@mail.ru

Семейство Campanulaceae представлено довольно большим числом видов и жизненных форм. Изучаемые нами *Campanula sibirica* L. и *C. taurica* Juz. представляют собой травянистые растения до 70 см и 50 см высотой, соответственно, а *C. talievii* Juz., по данным Н.Г. Дремлюга и С.Н. Зиман (2000) и по нашим наблюдениям – полукустарничек 25–50 см высотой. У всех трех видов формируется довольно большое число цветков. Цветки достигают 2-3 см. Практически все цветки завязывают плоды. Плод у изучаемых видов – нижняя, трехгнездная, многосемянная, покрытая жесткими волосками, поникающая коробочка (Колаковский, 1985; Мирошниченко, 2014). После созревания семена высыпаются через 3 поры, расположенные в основании коробочки. Поры прикрыты крышечками. Вспомогательной структурой для формирования и вскрывания поры служит аксикорн, который представляет собой прикрепленное к осевой колонке плода образование с небольшими месяцеподобными выростами. Семена легкие и мелкие (до 1мм длиной), обладают высокой всхожестью. На одной особи у *C. sibirica* формируется до 4000 штук семян, у *C. taurica* – до 11000 штук семян, у *C. talievii* – до 13500 штук семян. Всхожесть семян, собранных в 2011 году, после хранения при комнатной температуре в течение двух лет у *C. sibirica* составила более 50%, у *C. taurica* – 65%, у *C. talievii* – 35%. А всхожесть семян, собранных в 2012 году, при проращивании в декабре 2013 года составила у *C. sibirica* около 90%, у *C. taurica* – более 85%, у *C. talievii* – 65%.

Диссеминация у данных видов представлена баллистохорией, в частности, баллистоанемохорией (при помощи ветра) и баллистозоохорией (с помощью животных, приводящих растение в движение), а также эпизоохорией (при непосредственном участии животных, когда коробочки прикрепляются к проходящим мимо животным).

Помимо семенного размножения, для *C. taurica* и *C. talievii* характерно вегетативное размножение, в отличие от *C. sibirica*, у которого в первый год образуется розетка листьев, а во второй – одинарный генеративный побег. У *C. taurica* и *C. talievii* на корневище формируются новые розетки листьев, дающие генеративные побеги, образуются корни. Все это усиливает их репродуктивный успех. Изучаемые виды в условиях произрастания в горном Крыму образуют левосторонние ценопопуляции с преобладающим числом виргинильных особей.

Таким образом, большое число образующихся семян, их высокая всхожесть, способность *C. taurica* и *C. talievii* не только к семенному, но и к вегетативному размножению, а также левосторонность ценопопуляций свидетельствуют о потенциальных возможностях изученных видов к возобновлению и размножению в условиях их природного ареала в горном Крыму.

BREEDING FEATURES OF *CAMPANULA SIBIRICA* L., *C. TAURICA* JUZ. AND *C. TALIEVII* JUZ. CRIMEA (CAMPANULACEAE)

N.N. Miroshnichenko

Nikitsky Botanical Gardens - National Scientific Centre,
298648, Republic of Crimea, Yalta, Nikita, e-mail: *Nataha.ru88@mail.ru*

Family Campanulaceae is presented by quite a large number of species and life forms. Studied species *Campanula sibirica* L. and *C. taurica* Juz. are herbaceous plants up to 70 cm and 50 cm in height, respectively, and *C. talievii* Juz., according to N.G. Dremlyuga and S.N. Ziman (2000) and according to our observations - half-shrub 25-50 cm tall. All three types form a fairly large number of flowers. Flowers are 2-3 cm. Practically, all the flowers set fruits. Fruit in the species is inferior, tri-locular, polyspermous hairy, drooping capsule (Kolakovsky, 1985; Miroshnichenko, 2014). After ripening seeds are released by three pores at the base of the capsule. Pores covered with lids. Supporting structure for pores formation and opening is aksikorn, which is the structure with small moon-like outgrowths hailed to the centre column of capsule. Seeds are light and small (up to 1mm length) with high germination ability. One plant *C. sibirica* formed up to 4000 seeds; *C. taurica* – up to 11000 seeds; *C. talievii* – up to 13500 seeds. Germination of seeds collected in 2011, after storage at room temperature for two years for *C. sibirica* was over 50%; for *C. taurica* – 65%; for *C. talievii* – 35%. Germination of seeds collected in 2012, while germination in December 2013 for *C. sibirica* about 90%; for *C. taurica* – more than 85%; for *C. talievii* – 65%.

Dissemination in these species is presented by ballistohoriya, in particular, ballistoanemohoriya (by wind) and ballistozoochoriya (with the help of animals), and epizoochoriya (with direct participation of the animals when capsules are attached to a passing animal).

Besides, seed propagation for *C. taurica* and *C. talievii* vegetative one is typical contrary to *C. sibirica*, which forms a rosette of leaves in the first year and single generative shoot in the second. In *C. taurica* and *C. talievii* new rosettes of leaves given generative shoots and roots are formed on rhizome. All these features increase their reproductive success. Studied species form left-coenopopulations with a predominant number of virginal individuals in growth conditions in the mountainous Crimea.

Thus, a large number of seeds, their high germination, and the ability of *C. taurica* and *C. talievii* not only to seed propagation, but also to the vegetative one, as well as left-hand coenopopulations show to the potential opportunities of the studied species to renewal and reproduction in the conditions of their natural habitat in the mountainous Crimea.

РАЗВИТИЕ ЭНДОСПЕРМА У ДИХОГАМНЫХ СОРТОВ ГРЕЦКОГО ОРЕХА (*JUGLANS REGIA* L.)

М.А. Пынтя

НИИ Садоводства и Пищевых Технологий

Республика Молдова, MD19 Кишинэу, ул. Костюжень 14,

e-mail: *mariapintea@yandex.ru*

Наиболее важной частью плода грецкого ореха является зародыш. Поэтому проблемы, связанные с его развитием, представляют особый интерес. В наших опытах, посвященных опылению и завязыванию плодов грецкого ореха, установлено, что нормальное формирование зародыша у разных дихогамных сортов зависит от протекания эндоспермогенеза. С целью выявления морфофизиологических особенностей развития эндосперма проводили прямые и обратные скрещивания 12 молдавских дихогамных сортов. Используя цитоэмбриологические и гистохимические методы, тестировали локализацию и содержание ферментов, полисахаридов, белков, нуклеиновых кислот в соответствующих структурах. Выявлено, что на первых стадиях эндосперм характеризуется негативной ШИК реакцией и максимальным содержанием белков, слабым выявлением аскорбиновой кислоты и ферментов. Наиболее выравненное развитие ядерного эндосперма установлено при свободном опылении всех дихогамных генотипов. Одновременные деления первых крупных ядер приводят к формированию ценоцита в виде единого пласта или гаусториально. Переход ядерного эндосперма в клеточный (ценоцитные структуры) происходит при образовании около одной тысячи ядер как в прямых, так и обратных скрещиваниях. Протогиничные генотипы обладают более ускоренным темпом деления эндоспермальных ядер чем протандричные. Независимо от типа дихогамии формируются гипертрофированные ядра, которые могут быть объединены в конгломераты. При отсутствии опыления, а также в некоторых межсортовых опылениях обнаружены аномальные деления, а также полная остановка прохождения делений. Существенное ослабление метаболизма эндоспермальных ядер сменяется увеличением полисахаридных гранул перед переходом в клеточное состояние. Переход ядерного эндосперма в клеточный происходит при достижении шаровидного зародыша максимальных размеров, почти одновременно у протогиничных и протандричных генотипов. Возникновение клеточных мембран происходит первоначально в отдельных очагах и ярко выделяется некоторыми ферментами (особенно сукцинатдегидрогеназа и пероксидаза).

Проведенные исследования показывают, что трансформирование эндосперма взаимосвязано с некоторыми стадиями развития зародыша. Интенсивная резорбция клеточного эндосперма наблюдается в период возникновения билатеральной сегментации зародыша.

ENDOSPERM DEVELOPMENT OF DICHOGAMOUS WALNUT (*JUGLANS REGIA* L.) VARIETIES

M.A. Pinte

Research Institute for Horticulture,
MD19, Republic Moldova, Kishinau, Costiujeni Str. 14,
e-mail: *mariapinte*@yandex.ru

Walnut embryos represent the main part of the fruit. Therefore the problems of its development are very important. In our experiments concerning pollination and fruit set it was established that a normal formation of the embryo within different dichogamous varieties depends of the processes of endospermogenesis. Researches have been effectuated for evaluation of the morphophysiological peculiarities of processes of endosperm development in different dichogamous types of intraspecific pollination. 12 moldavian dichogamous varieties and perspective selection were experimented in direct and indirect hybridisation. On the basis of cytoembryological and histochemical methodology localization and contents of enzymes, polysaccharides, proteins and nucleic acids within respective structures were tested.

Development of the walnut endosperm at the first stages is characterized by a negative PAS and maximal intensity of protein reactions, a weak detection of ascorbic acid and enzymes. The most homogenous nuclear endosperm was established for the open pollination of all dichogamous genotypes. Synchronic divisions of the first large endosperm nuclei lead to cenocyt formation, which is either a whole even layer, or haustorial bands. Transformation of endosperm nuclei in cellular structures (cenocyt structures) occur for all dichogamous types when around one thousand of nuclei are developed in open as well as direct and indirect hybridisation. Protoginous genotypes have a more accelerated rhythm of endosperm nuclei division compared to protandrous ones. Irrespective of dichogamy formation hypertrophical nuclei, as well as theirs fusion and conglomerated are detected. In the absence of pollination and in same controlled pollination anomalous divisions or a full stop in endospermogenesis processes are established. Gradual decreasing of the endosperm nuclei metabolism is changed by increasing of enzymes activity and the appearance of the polysaccharides granules in the approach of cellular state. The transition of endosperm nuclei to cellular stage happens when the globular embryo reaches the maximal dimensions almost simultaneously in protoginous and protandrous genotypes. Initiation of cell membranes, first in separate seats, is brightly marked by some enzymes (especially succinatdehidrogenaza and peroxidaza) and disappearance of PAS reaction. This study shows that transformations of the endosperm of walnut are inseparably linked with certain stages of embryo development. An intensive resorbtion of cellular endosperm is observed in the period of the appearance of embryos bilateral segmentation.

ЭМБРИОКУЛЬТУРА КАК СПОСОБ МАССОВОГО ТИРАЖИРОВАНИЯ РЕДКИХ РАСТЕНИЙ НА ПРИМЕРЕ *CARDIOCRINUM GLEHNII* И *DIOSCOREA CAUCASICA*

А.А Торшилова, О.Г. Бутузова

Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН,
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, 2,
e-mail: altorsh62@mail.ru

Применение метода эмбриокультуры наиболее эффективно для видов, характеризующихся затрудненным прорастанием семян, обусловленным наличием сложного типа покоя. Самой трудной группой в этом отношении являются семена с морфо-физиологическим типом покоя, который определяется сочетанием недоразвития зародыша на момент диссеминации с физиологическим механизмом торможения (ФМТ) прорастания (Николаева, 1967, 1993). Процесс доразвития зародыша и снятия ФМТ прорастания семени являются температурозависимыми и требуют длительной предпосевной подготовки, специфичной для каждого вида.

Цель данной работы состояла в оптимизации прорастания подобных семян путем проращивания изолированных зародышей в культуре *in vitro*. Виды *Cardiocrinum glehnii* и *Dioscorea caucasica*, выбранные в качестве объектов исследования, относятся к редким и исчезающим, их семена характеризуются наличием морфо-физиологического типа покоя.

Прорастание семян *C. glehnii* и *D. caucasica* в природе происходит на второй и последующие (3-4) годы, в лабораторных условиях требуется длительная стратификация в два этапа с переносом на разные температуры (Kondo T. et al, 2006; Титова, Торшилова, 2014). Зародыш в семенах трогался в рост при положительных температурах (18-25°C), однако для завершения развития ему требовался холод (0-3°C). Прорастание также происходило при повышенных температурах с предварительным выдерживанием на холоде. Весь процесс проращивания семян занимал 11 - 12 месяцев.

Для того, чтобы избежать влияния окружающих структур семени на зародыш, нами были предприняты удачные попытки культивирования изолированных зародышей этих видов на среде в культуре *in vitro*. Использовалась модифицированная среда Мурасиге и Скуга с половинными концентрациями макро- и микросолей, что оказалось оптимальным для роста зародышей. В результате экспериментов были получены проростки растений размером от 2 до 5 см уже за 2,5 месяца культивирования. Дальнейшее развитие проростков на среде с последующей высадкой в грунт позволило получить нормальные растения.

Работа поддержана грантом РФФИ (проект № 13-04-96605р юг а) и администрацией Краснодарского края.

EMBRYOCULTURE AS A METHOD OF MASS REPLICATION OF RARE PLANTS ON THE EXAMPLE OF *CARDIOCRINUM GLEHNII* AND *DIOSCOREA CAUCASICA*

A.A. Torshilova, O.G. Butuzova

Komarov Botanical Institute of RAS

197376, Russia, St-Petersburg, Prof. Popov Str., 2,

e-mail: *altorsh62@mail.ru*

Application of embryoculture method is the most effective for species characterized by shortness seed germination, conditioned by the presence of a complex type of dormancy. The most difficult group in this respect is the seeds with morpho-physiological dormancy type, which is determined by the combination of underdeveloped embryo at the time of dissemination with physiological mechanism of inhibition (PhMI) germination (Nikolaeva, 1967, 1993). The process of embryo postdevelopment and breaking of PhMI of seed germination occurs to be temperature dependent and requires long seedbed preparation specific for each species.

The aim of this work was to optimize the germination of such seeds by germination of isolated embryos in culture *in vitro*. The species *Cardiocrinum glehnii* and *Dioscorea caucasica*, selected as research objects are rare and endangered; their seeds are characterized by the presence of morpho-physiological type of dormancy.

Seed germination *C. glehnii* and *D. caucasica* occurs in nature on the second and subsequent (3-4) years, whereas in laboratory conditions a long stratification in two stages at different temperature regimes is required (Kondo et al., 2006; Titova, Torshilova, 2014). Embryo in the seeds start to grow at positive temperatures (18-25°C), but it needs a cold (0-3°C) to complete the postdevelopment. Germination also occurred at higher temperatures with preliminary storage in the cold. The whole process of seed germination held 11-12 months.

In order to avoid the influence on the embryo of surrounding seed structures, we have made successful attempts of cultivating isolated embryos of these species on the medium in culture *in vitro*. The modified Murashige and Skoog medium with half concentration of macro-and micro salts was used that proved to be optimal for embryo growing. As a result of the experiment plant seedlings of 2 to 5 cm long were obtained in already 2.5 months of cultivating. Further development of the seedlings on the medium followed by planting in soil yielded normal plants.

The work was supported by RFBR grant (project № 13-04-96605p юз а) and administration of Krasnodar region.

СОДЕРЖАНИЕ

ПЛЕНАРНЫЕ ДОКЛАДЫ.....	5
СЕКЦИЯ 1. ИЗУЧЕНИЕ БИОРАЗНООБРАЗИЯ РАСТЕНИЙ <i>IN VITRO, IN SITU</i> И <i>EX SITU</i>	21
СЕКЦИЯ 2. КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ РАСТЕНИЙ: ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ.....	75
СЕКЦИЯ 3. СОЗДАНИЕ КОЛЛЕКЦИЙ РАСТЕНИЙ <i>IN VITRO</i> , МЕТОДЫ СОХРАНЕНИЯ ГЕНОФОНДА.....	115
СЕКЦИЯ 4. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ИЗУЧЕНИИ БИОРАЗНООБРАЗИЯ РАСТЕНИЙ.....	155
СЕКЦИЯ 5. БИОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ РАСТИТЕЛЬНОГО ГЕНОФОНДА, ПОЛУЧЕНИЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ.....	187
СЕКЦИЯ 6. ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ РАЗВИТИЯ И УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ.....	225
СЕКЦИЯ 7. РЕПРОДУКТИВНАЯ БИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ В СОХРАНЕНИИ БИОРАЗНООБРАЗИЯ.....	261
СОДЕРЖАНИЕ.....	280
АЛФАВИТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ АВТОРОВ.....	264

CONTENT

PLENARY REPORTS.....	5
SECTION 1. INVESTIGATIONS OF PLANT BIODIVERSITY <i>IN VITRO, IN SITU AND EX SITU</i>	21
SECTION 2. CLONAL MICROPROPAGATION OF PLANTS: THEORETICAL AND APPLIED ASPECTS.....	75
SECTION 3. CREATION OF <i>IN VITRO</i> PLANT COLLECTIONS, METHODS FOR GERMPLASM CONSERVATION.....	115
SECTION 4. MOLECULAR GENETICS TECHNIQUES FOR PLANT BIODIVERSITY STUDIES.....	155
SECTION 5. BIOCHEMICAL STUDIES OF PLANT GERMPLASM; SYNTHESIS AND USAGE OF BIOLOGICAL ACTIVE SUBSTANCES.....	187
SECTION 6. PHYSIOLOGICAL ASPECTS OF PLANTS DEVELOPMENT AND RESISTANCE.....	225
SECTION 7. PLANT REPRODUCTIVE BIOLOGY IN BIODIVERSITY CONSERVATION.....	261
CONTENT.....	280
AUTHORS ALPHABET LIST.....	264

АЛФАВИТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ АВТОРОВ

AUTHORS ALPHABET LIST

Абраимова О.Е., 44
 Авксентьева О.А., 226
 Агафонов А.Ф., 162
 Азарова А.Б., 96
 Азизбекян С.Г., 196
 Аксенов Ю.В., 212
 Алиева З.М. - 100
 Алтанцэцэг Э., 116
 Антонова О.Ю., 22, 122, 156
 Ахатова А.Р., 72
 Ахметова А.Ш., 76
 Баер Г.Я., 54, 158
 Бажина Е.В., 78
 Баранова О.Г., 80, 82
 Батманова А.А., 96
 Бердичевец Л.Г., 152
 Блюднева Е.А., 88
 Блюм Я.Б., 108, 188
 Богинская Л.А., 118, 170
 Боднарчук О.П., 34
 Бойчук Ю.Н., 158, 188
 Болтенков Е.В., 90
 Бондарева Л.Л., 164
 Боровков А.Б., 190
 Бородай В.В., 30
 Браилко В.А., 228
 Брель Н.Г., 148
 Бугара И.А., 248
 Будаговский А.В., 102
 Бударин С.Н., 230
 Бутузова О.Г., 262, 278
 Вайновская И.Ф., 152
 Васильева О.Г., 120
 Веселова С.В., 232, 234, 242, 244
 Виноградова Г.Ю., 264
 Власова А.Б., 148, 160
 Волкова Н.Н., 122, 150
 Володько И.К., 160
 Воронова О.Н., 84
 Ворошилова Е.В., 14
 Вржосек Э.В., 90
 Высоцкая О.Н., 146
 Габленко М.В., 52
 Гавриленко Т.А., 22, 122, 124, 150, 156
 Гайщун В.В., 160
 Генерозова И.П., 240
 Гончарова О.И., 40
 Гончарук Е.А., 192
 Горбачева О.В., 242
 Горчакова Ю.А., 192
 Горюнова И.И., 236
 Горюнова С.В., 172
 Гребенникова О.А., 194, 208
 Гриси Р.Е., 160
 Губанова Т.Б., 238
 Гудвиллович И.Н., 190
 Гузенко Е.В., 178
 Гулько Р.М., 34, 214
 Дзюба О.И., 66, 222
 Доброва А.А., 24
 Долгов С.В., 180
 Домблидес А.С., 162, 164
 Домблидес Е.А., 162, 164
 Дорогина О.В., 166
 Дробот К.А., 202
 Дробык Н.М., 26
 Думыч И.И., 214
 Дунаева С.Е., 122, 124
 Егорова Н.А., 126
 Ежов В.Н., 208, 220
 Емец А.И., 54, 108, 158, 176, 188, 236, 252, 256
 Жигачева И.В., 240
 Жижина М.Н., 248
 Жинкина Н.А., 84, 262
 Жмурко В.В., 226
 Журова П.Т., 210
 Загоскина Н.В., 198, 206
 Загричук О.М., 26
 Замбрибоц И.С., 24
 Зарипова А.А., 86
 Захаренко Г.С., 266
 Заяц А.Ю., 28
 Заячковская Т.В., 164
 Зубарев А.В., 148
 Ибрагимов Р.И., 72
 Иваницкая А.С., 14
 Иванова Н.Н., 128
 Игнатова С.А., 62
 Калашникова Е.А., 116
 Каменек Л.И., 126
 Кан Л.Ю., 162
 Касимова Р.И., 72
 Кашин А.С., 88, 174
 Кваско Е.Ю., 202
 Кляченко О.Л., 30, 142
 Козерецкая И.А., 26
 Козуб Н.А., 168
 Колб Л.П., 266
 Колдомова Е.А., 80.
 Колупаев Ю.Е., 246
 Комаровская-Порохнявец Е.З., 220
 Кондратьев М.Н., 230
 Конечная Р.Т., 34

Коновалова Л.Н., 134, 138
 Константинов А.В., 170
 Копач О.В., 196
 Корженевский В.В., 32
 Корнильев Г.В., 208
 Коротков О.И., 12, 52, 172
 Корхойвой В.И., 158
 Костина Л.И., 156
 Кочиева Е.З., 6
 Кочкин Д.В., 10
 Кочумова А.А., 172
 Кравец Е.А., 268
 Крвавыч А.С., 34
 Кривоухатко А.Г., 126
 Крикунова Н.И., 240
 Крицкая Т.А., 174
 Крицкий А.А., 88, 174
 Крылова Е.А., 22, 122
 Кудрявцев А.М., 172
 Кузнецова Е.Н., 82
 Кузнецова Н.Ф., 270
 Кузовкова А.А., 196
 Кузьмина Т.Н., 110
 Кунах В.А., 26
 Курило В.В., 176
 Курицкая Е.В., 90
 Лапшин П.В., 198
 Ларикова Ю.С., 230
 Лебедев В.Г., 96
 Левчик Н.Я., 200
 Лемеш В.А., 178
 Ленивко С.М., 98
 Лесникова-Седошенко Н.П., 40, 92
 Лозинский М., 94
 Лось С.А., 130
 Лукина А.В., 272
 Лукиных Е.Ю., 82
 Любимова Е.И., 138
 Любинская А.В., 132
 Мазур Т.В., 152
 Максимов И.В., 72, 232, 234, 244
 Малаева Е.В., 134
 Марко Н.В., 208
 Мартемьянова В.К., 100
 Матвеева Н.А., 202, 204
 Матушкин С.А., 36
 Матушкина О.В., 38
 Машенко Н.Е., 218
 Машкина О.С., 136
 Миронова Л.Н., 90
 Мирошниченко Н.Н., 274
 Митрофанова И.В. 8, 12, 28, 40, 60, 92,
 104, 110, 128, 212
 Митрофанова О.В. 8, 40, 60, 64
 Митюшкина Т.Ю., 180
 Миченер Д.С., 160
 Мишарина Т.А., 240
 Молканова О.И. 12, 138
 Моргун Б.В., 44
 Муратова С.А., 46, 56, 102
 Мухаметвафина А.А., 140
 Мырзахметов М., 42
 Назарбекова С.Т., 42
 Назаренко Л.В., 192
 Назаров В.В., 84
 Науменко Т.С., 162
 Нечаева Т.Л., 206
 Никифоров А.Р., 32
 Никифорова Н.В., 142
 Нитовская И.А., 44
 Новиков В.П., 34, 156, 214, 220
 Новикова Л.Ю., 156
 Носов А.М. 10, 12
 Нужная Т.В., 232, 242, 244
 Обозный А.И., 246
 Овчинникова А.Б., 122
 Ожередов С.П., 54
 Омельченко А.В., 248
 Павлюк И.В., 214
 Пак М.Э, 14
 Палий А.Е., 194, 208
 Палий И.Н., 208
 Пантелеев С.В., 170
 Папихин Р.В., 46, 56, 102
 Парникова И.Ю., 26
 Пендинен Г.И., 122
 Пилипчук Т.И., 104
 Пилькевич Р.А., 250
 Пирко Я.В., 158
 Плоховская С.Г., 252
 Полякова Л.В., 210
 Потрохов А.А., 202
 Потрохов А.С., 202
 Придача В.Б., 254
 Пронина И.Н., 48
 Пугачева Г.М., 50
 Пынтя М.А., 106, 276
 Пэтрина Р.О., 34
 Работягов В.Д., 208, 212
 Рахметов Д.Б., 66, 132, 188, 200, 222
 Решетников В.Н., 12, 196
 Романов В.С., 162
 Русина И.Ф., 240
 Сажина Н.Н., 198

Сазонова Т.А., 254
Сатарова Т.Н., 44
Сафронова Г.Н., 52
Седченко М.А., 144
Секан А.С., 54
Сидякин А.И., 216
Скрябин К.Г., 180
Созинов А.А., 168
Созинов И.А., 168
Соловьева А.И., 146
Солопов В.А., 46, 56
Спиридович Е.В., 12, 148, 152, 160
Ставцева И.В., 126
Стадницкая Н.Е., 214
Стахеева Т.С., 120
Табацкая Т.М., 136
Танасиенко И.В., 108
Тевфик А.Ш., 110
Теплицкая Л.М., 216
Терещенко Л.И., 130
Тимин Н.И., 162
Тимофеенко К.С., 178
Титова Н.В., 218
Титок В.В., 160
Тихомирова Л.И., 58
Толкачева Н.В., 34, 214, 220
Торшилова А.А., 278
Тренина М.Б., 240
Третьякова И.Н., 14, 272
Ухатова Ю.В., 124
Федорчук В.В., 256
Фещенко В.В., 200
Фоменко Т.И., 12, 148, 152
Хадеева Н.В., 172
Хапова С.А., 258
Христова Ю.П., 194
Черепко М.М., 122
Чернец А.М., 112
Чирков С.Н., 60
Чоркинэ Н. Г., 94, 144
Шаргородская К.А., 62
Швачко Н.А., 122, 150, 156
Шевченко С.В., 16
Шепотько Ю.В., 64
Шестибратов К.А., 96
Шестопал О.Л., 24
Шиша Е.Н., 54
Шпак Д.В., 62
Шпак Л.М., 66, 132, 222
Шувалов О.Ю., 22, 156
Шувалова А.Р., 22, 122
Шувалова Л.Е., 122, 124

Шульга О.А., 180
Щенникова А.В., 180
Юркова И.Н., 248
Юхимук А.Н., 148, 160, 182
Якимова О.В., 126
Ярмоленко Л.В., 68
Ярославцева Е.Г., 70
Яруллина Л.Г., 72

Abraimova O.Ye., 45
 Agafonov A.F., 163
 Akhatova A.R., 73
 Akhmetova A.Sh., 77
 Aksenov Yu.V., 213
 Aliyeva Z.M., 101
 Altantsetseg E., 117
 Antonova O.Y., 23, 123, 157
 Avksentyeva O.A., 227
 Azarova A.B., 97
 Azizbekian S.G., 197
 Bayer G.Ya., 55, 159
 Baranova O.G., 81, 83
 Batmanova A.A., 97
 Bazhina E.V., 79
 Berdichevets L.G., 153
 Blume Ya.B., 109, 189
 Blyudneva E.A., 89
 Bodnarchuk O.P., 35
 Boginskaya L.A., 119, 171
 Boltenev E.V., 91
 Bondareva L.L., 165
 Borodai V.V., 31
 Borovkov A.B., 191
 Boychuk Y.N., 159, 189
 Brailko V.A., 229
 Brel N., 149
 Budagovsky A.B., 103
 Budarin S.N., 231
 Budeanu O., 185
 Bugara I.A., 249
 Butuzova O.G., 263, 279
 Cherepko M.M., 123
 Chernets A.M., 113
 Chirkov S.N., 61
 Ciorchina N.G., 95, 145
 Demku T., 114
 Dobrova H.A., 25
 Dolgov S.V., 181
 Domblides A.S., 163, 165
 Domblides E.A., 163, 165
 Dorogina O.V., 167
 Drobot K.O., 203
 Drobyk N.M., 27
 Duca M., 185
 Dumych I.I., 215
 Dunaeva S.E., 123, 125
 Dzyuba O., 67, 223
 Fedorchuk V.V., 257
 Feschenko V.V., 201
 Fomenko T.I., 13, 149, 153
 Gablenko M.V., 53
 Gaishun V.V., 161
 Garcés Pabón G. J., 205
 Gavrilenko T.A., 23, 123, 125, 151, 157
 Generozova I.P., 241
 Gille E., 185
 Goncharova O.I., 41
 Goncharuk E.A., 193
 Gorbacheva O.V., 243
 Gorchakov Yu.A., 193
 Goryunova S.V., 173
 Grebennikova O.A., 195, 209
 Grese R.E., 161
 Gubanova T.B., 239
 Gudvilovich I.N., 191
 Gulko R.M., 35
 Gulko R.N., 215
 Guzenko E.V., 179
 Gyulai G., 114
 Horiunova I.I., 237
 Ibragimov R.I., 73
 Ignatova S.A., 63
 Ivanitskaya A.S., 15
 Ivanova N.N., 129
 Jain S.M., 19, 184
 Jurova P.T., 210
 Kalashnikova E.A., 117
 Kamenyok L.I., 127
 Kan L.Yu., 163
 Kashin A.S., 89, 175
 Kasimova R.I., 73
 Kaya Y., 18
 Khadeeva N.V., 173
 Khapova S.A., 259
 Khristova J.P., 195
 Klyachenko O.L., 31, 143
 Kochieva E.Z., 7
 Kochkin D.V., 11
 Kochumova A.A., 173
 Kolb L.P., 267
 Koldomova E.A., 81
 Kolupaev Yu.E., 247
 Komarovska-Porokhnyavets O.Z., 221
 Kondratiev M.N., 231
 Konechna R.T., 35
 Konovalova L.N., 135, 139
 Konstantinov A.V., 171
 Kopach O.V., 197
 Korkhovoy V.I., 159
 Kornil'yev G.V., 209
 Korotkov O.I., 13, 53, 173
 Korzhenevsky V.V., 33
 Kostina L.I., 157

Kozeretska I.A., 27
 Kozub N.A., 169
 Kravets E.A., 269
 Krikunova N.I., 241
 Kritckii A.A., 175
 Kritckaia T.A., 89, 175
 Krivochatko A.G., 127
 Krvavych A.S., 35
 Krylova E.A., 23, 123
 Kudryavtsev A.M., 173
 Kunakh V.A., 27
 Kuritskaya E.V., 91
 Kurylo V.V., 177
 Kuzmina T.N., 111
 Kuznetsova E.N., 83
 Kuznetsova N.F., 271
 Kuzovkova A.A., 197
 Kvasko E.Y., 203
 Láposi R., 114
 Lapshin P.V., 199
 Larikova J.S., 231
 Lebedev V.G., 97
 Lemesh V.A., 179
 Lenivko S.M., 99
 Lesnikova-Sedoshenko N.P., 41, 93
 Levchyk N.Y., 201
 Los S.A., 131
 Lozinschii M., 95
 Lukina A.V., 273
 Lukinyh E. Yu., 83
 Lyubimova E.I., 139
 Lyubinskaya A., 133
 Maksimov I.V., 73, 233, 235, 245
 Malaeva E.V., 135
 Marco N.V., 209
 Martea R., 185
 Martemyanova V.K., 101
 Mashcenko N.E., 219
 Mashkina O.S., 137
 Masur T.W., 153
 Matushkin S.A., 37
 Matushkina O.V., 39
 Matvieieva N.A., 203, 205
 Melnychuk O., 114
 Michener D.C., 74, 161
 Mironova L.N., 91
 Miroshnichenko N.N., 275
 Misharina T.A., 241
 Mitiouchkina T. Yu., 181
 Mitrofanova I.V., 9, 13, 29, 41, 61, 93,
 105, 111, 129, 213
 Mitrofanova O.V., 9, 41, 61, 65
 Molkanova O.I., 13, 139
 Morgun B.V., 45
 Mukhametvafina A.A., 141
 Muratova S.A., 47, 57, 103
 Mutu A., 185
 Myrzahmetov M., 43
 Naumenko T.S., 163
 Nazarbekova S.T., 43
 Nazarenko L.V., 193
 Nazarov V.V., 85
 Nechaeva T.L., 207
 Nikiforov A.R., 33
 Nitovska I.A., 45
 Nosov A.M., 11, 13
 Novikov V.P., 35, 157, 215, 221
 Novikova L.Y., 157
 Nujnaya T.V., 233, 243, 245
 Nykyforova N.V., 143
 Oboznyj A.I., 247
 Omelchenko A.V., 249
 Ovchinnikova A.B., 123
 Ozheredov S.P., 55
 Pak M.E., 15
 Paliy A.E., 195, 209
 Paliy I.N., 209
 Panteleev S.V., 171
 Papikhin R.V., 47, 57, 103
 Parnikoza I. Yu., 27
 Pavlyuk I.V., 215
 Pendinen G.I., 123
 Petrina R.O., 35
 Pilipchuk T.I., 105
 Pilkevitch R.A., 251
 Pintea M. A., 107, 277
 Pirko Ya.V., 159
 Plohovska S.H., 253
 Polyakova L.V., 211
 Port A., 185
 Potrochov A.A., 203
 Potrochov A.S., 203
 Pridacha V.B., 255
 Pronina I.N., 49
 Pugacheva G.M., 51
 Rabotyagov V.D., 209, 213
 Rahmetov D.B., 67, 133, 189, 201, 223
 Reshetnikov V.N., 13, 197
 Romanov V.S., 163
 Rusina I.F., 241
 Safronova G.N., 53
 Satarova T.H., 45
 Sazhina N.N., 199
 Sazonova T.A., 255

Schestibratov K.A., 97
 Sedcenco M.A., 145
 Sekan A.S., 55
 Shargorodskaya K.A., 63
 Shchennikova A.V., 181
 Shepotko Yu.V., 65
 Shestopal O.L., 25
 Shevchenko S.V., 17
 Shpak D.V., 63
 Shpak L., 67, 133, 223
 Shulga O.A., 181
 Shuvalov O.Y., 23, 157
 Shuvalova A.R., 23, 123
 Shuvalova L.E., 123, 125
 Shvachko N.A., 123, 151, 157
 Shysha E.N., 55
 Sidiyakin A.I., 217
 Skryabin K.G., 181
 Solopov V.A., 47, 57
 Solov'yova A.I., 147
 Sozinov A.A., 169
 Sozinov I.A., 169
 Spiridovich E.V., 13, 149, 153, 161
 Stadnytska N.E., 215
 Stakheyeva T.S., 121
 Starodub Sauliak L., 205
 Stavtzeva I.V., 127
 Tabatskaya T.M., 137
 Tanasienko I.V., 109
 Teplitskaya L.M., 217
 Tereschenko L.I., 131
 Tefvik A.Sh., 111
 Tikhomirova L.I., 59
 Timin N.I., 163
 Timofeyenko K.S., 179
 Titok V.V., 161
 Titova N.V., 219
 Toldi O., 114
 Tolkacheva N.V., 35, 215, 221
 Torshilova A.A., 279
 Tretyakova I.N., 15, 273
 Uchimuk A., 149, 161, 183
 Ukhatova V., 125
 Vasilyeva O.G., 121
 Vaynovskaya I.F., 153
 Veres A., 114
 Veselova S.V., 233, 235, 243, 245
 Vinogradova G.Yu., 265
 Vlasava A., 149, 161
 Volkova N.N., 123, 151
 Volodko I.K., 161
 Voronova O.N., 85
 Voroshilova E.V., 15
 Vysotskaya O.N., 147
 Wrzhosek E.V., 91
 Yakimova O.V., 127
 Yarmolenko L.V., 69
 Yaroslavtseva E.G., 71
 Yarullina L.G., 73
 Yegorova N.A., 127
 Yemets A.I., 55, 109, 159, 177, 189, 237,
 253, 257
 Yezhov V.N., 209, 221
 Yukhimuk A.N., 149, 161, 183
 Yurkova I.N., 249
 Zagoskina N.V., 199, 207
 Zagrychuk O. M., 27
 Zaiats O., 29
 Zakharenko G.S., 267
 Zambriborsh I.S., 25
 Zaripova A.A., 87
 Zayachkovckaya T.V., 165
 Zhigacheva I.V., 241
 Zhinkina N.A., 85, 263
 Zhizhina M.N., 249
 Zhmurko V.V., 227
 Zubarev A., 149

Материалы
VI Международной научно-практической конференции
«Биотехнология как инструмент сохранения
биоразнообразия растительного мира
(физиолого-биохимические, эмбриологические,
генетические и правовые аспекты)»
г. Ялта, Республика Крым, Россия
12 – 17 октября 2014 г.

Ответственные за выпуск *Митрофанова И.В., Ругузова А.И.*

Формат 60x84/8. Усл. печ. л. 5,8. Тираж 300 экз. Зак. № .

ИЗДАТЕЛЬСТВО ТИПОГРАФИЯ «АРИАЛ».
95034, Республика Крым, г. Симферополь, ул. Декабристов, 21, оф. 216,
Свидетельство субъекта издательского дела ДК № 3562 от 28.08.2009 г.
E-mail: it.arial@yandex.ru

Отпечатано с оригинал-макета в типографии ФЛП Бражниковой Н.А.
95034, Республика Крым, Симферопольский р-н, пгт Гвардейское, ул. Н-Садовая, 22
тел. (0652) 70-63-31, +7 978 71 72 901,+38 050 648 89 34.
E-mail: braznikov@mail.ru