

УДК 581.527.4:57.085.2:581.1

## БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ РАЗМНОЖЕНИЯ НЕКОТОРЫХ РЕДКИХ ЭНДЕМИКОВ ФЛОРЫ ГОРНОГО КРЫМА

Митрофанова О. В., Митрофанова И. В., Лесникова-Седошенко Н. П., Браилко В. А., Никифоров А. Р.,  
Челомбит С. В., Иванова Н. Н., Жданова И. В.

Национальный научный центр РАН, Ялта, Республика Крым, Россия,  
invitro\_plant@mail.ru

Проведены комплексные ботанические, биотехнологические и физиологические исследования по выявлению особенностей развития реликтовых эндемиков флоры Крыма – *Heracleum ligusticifolium* M. Bieb. (Apiaceae), *Lagoseris callicephala* Juz., *L. purpurea* L. (Asteraceae), *Lamium glaberrimum* (K. Koch) Taliev (Lamiaceae), *Scrophularia exilis* Popl. (Scrophulariaceae), *Silene jailensis* N.I. Rubtzov (Caryophyllaceae). Продемонстрированы возможности размножения реликтовых эндемиков в культуре *in vitro*, что значительно расширяет и углубляет знания о биологии их развития и морфогенетических потенциях, позволяет создавать генобанк *in vitro* для сохранения исследуемых видов. В условиях *in vitro* впервые выявлены основные пути морфогенеза 6 реликтовых эндемиков флоры Горного Крыма: прямая регенерация через адвентивное побегообразование и непрямая – через соматический эмбриогенез. Показано, что среда МС, дополненная 0,1 мг/л БАП, 0,1 мг/л ИМК и 0,1 мг/л ГК<sub>3</sub> значительно повышала эффективность регенерации изучаемых видов. Дана оценка функционального состояния фотосинтетического аппарата органов и тканей 4 видов в культуре *in vitro*.

*Ключевые слова:* редкий вид, морфогенез, питательная среда, регуляторы роста, регенерация микропобегов.

### ВВЕДЕНИЕ

Сохранение раритетного генофонда редких видов региональных флор имеет особую актуальность. В частности, реликтовые эндемики флоры Горного Крыма до настоящего времени остаются не изученными. С 2004 года растения реликтовых эндемиков наблюдаются *in situ* и выращиваются *ex situ* (лаборатория флоры и растительности ФГБУН «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН» (ФГБУН «НБС-ННЦ»), но данные исследования не позволяют получить растения для более глубоких исследований: генетических, биотехнологических, физиолого-биохимических.

Основа стратегии сохранения видов и сортов растений определяется рядом программных документов, таких как «Конвенция о биологическом разнообразии» (Convention on Biological Diversity – [www.plant-conservation-report-en.pdf](http://www.plant-conservation-report-en.pdf)), «Global Strategy Plant Conservation» ([www.botanicgardens/ie/gspc/pdfs/gspc.pdf](http://www.botanicgardens/ie/gspc/pdfs/gspc.pdf)), «Международная программа ботанических садов по охране растений» (2000). Реликтовые эндемики флоры Горного Крыма представляют собой генетически оригинальную биоэкологическую группу. К ним относятся *Lamium glaberrimum* (K. Koch) Taliev (Lamiaceae), *Lagoseris callicephala* Juz., *L. purpurea* L. (Asteraceae), *Scrophularia exilis* Popl. (Scrophulariaceae), *Silene jailensis* N. I. Rubtzov (Caryophyllaceae), *Heracleum ligusticifolium* M. Bieb. (Apiaceae). Популяции указанных видов труднодоступны и не выходят за пределы литогенных ландшафтов, что затрудняет изучение популяций и отдельных растений данных видов (Никифоров, 2016). Медленное возобновление видов реликтовых эндемиков, трудность их размножения, а также усиление антропогенного воздействия приводят к обеднению видового состава флоры и сокращению ареалов распространения.

Для сохранения растительного генофонда все большее значение приобретает использование биотехнологических подходов в размножении и сохранении ценных редких и исчезающих видов, в том числе и реликтовых эндемиков флоры Горного Крыма (Новикова, 2013; Cruz-Cruz et al., 2013; Engelmann, 2013; Молканова и др., 2015; Митрофанова, 2016; Митрофанова и др., 2016; Mitrofanova et al., 2017a).

В лаборатории биотехнологии и вирусологии растений НБС-ННЦ с 2015 года проводятся исследования по изучению морфогенетического потенциала органов и тканей и разработка эффективных методов микроразмножения 6 видов реликтовых эндемиков флоры Горного Крыма: *Lam. glaberrimum*, *L. callicephalo*, *L. purpurea*, *Scr. exilis*, *S. jailensis* и *H. ligusticifolium*.

Перспективной и весьма сложной проблемой экспериментальной биологии является исследование динамики структурных перестроек ассимилирующих тканей растений *in vitro*. Особый интерес вызывают неинвазивные методы, позволяющие проводить мониторинг функционирования растений без нарушения их жизнедеятельности (Будаговская и др., 2007). На примере таких культур как лаванда, лавандин, канна садовая, роза эфиромасличная исследованы морфо-анатомические особенности и функциональное состояние растений в условиях *in vitro* и *ex situ* (Палий и др., 2016; Mitrofanova et al., 2016; Mitrofanova et al., 2016a; Mitrofanova et al., 2016b; Grebennikova et al., 2017; Mitrofanova et al., 2017b).

Целью данного исследования было изучение морфогенетических и физиологических особенностей регенерации *in vitro* некоторых видов реликтовых эндемиков флоры Горного Крыма для сохранения биоразнообразия полуострова.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследования проводили в лаборатории биотехнологии и вирусологии растений ФГБУН «НБС-ННЦ». Исходным материалом служили регенеранты, полученные *in vitro* из семян, собранных с растений *in situ* и *ex situ*, а также органы и ткани растений видов *L. glaberrimum*, *Scr. exilis*, *S. j ailensis*, *H. ligusticifolium*, *Lag. callicephalo*, *Lag. purpurea*, произрастающих *ex situ* и отобранных в мае-октябре.

*Lamium glaberrimum* и *Scr. exilis* представляют собой облигатные гляреофиты – «растения осыпей», двулетники, цветут с первого года жизни; *S. jailensis* по своей экологической природе относится к облигатным хазмофитам – «растениям трещин», многолетний полукустарничек с моноподиальными побегами. *Heracleum ligusticifolium*, *L. callicephalo* и *L. purpurea* являются видами двойной экологической природы, способными к развитию как на покрытых трещинами скальных поверхностях, так и на коллювии осыпных чехлов; *H. ligusticifolium* – трехлетник, в природных условиях имеет всего 1 верхушечную почку, *L. callicephalo* и *L. purpurea* – многолетние травянистые поликарпики (Никифоров, 2016). Изучаемые виды внесены в Красные книги РФ и Республики Крым и относятся к 3 категории редкости (Красная книга ..., 2008; Красная книга ..., 2015).

Эксперименты по культуре *in vitro* проводили согласно методикам Р. Г. Бутенко (1964), И. В. Митрофановой и др. (2014), L. Kyte и др. (2013). Режимы стерилизации семян приведены нами в ранних публикациях (Митрофанова и др., 2016). Для получения стерильной культуры отобранных *ex situ* эксплантов (органов и тканей) было испытано 4 способа последовательной обработки. Способы различались по концентрации стерилизующих агентов и экспозиции их воздействия: 1) 70 % этанол (2 мин), 1 % раствор Thimerosal (Sigma, США) (5 мин), 0,2 % раствор Dez Tab (Китай) (5 мин); 2) 70 % этанол (2 мин), 1 % раствор Thimerosal (5 мин), 0,5 % раствор Dez Tab (5 мин); 3) 70 % этанол (1 мин), 1 % раствор Thimerosal (7 мин), 0,2 % раствор Dez Tab (7 мин); 4) 60 % этанол (1,5 мин), 1 % раствор Thimerosal (7 мин), 0,5 % раствор Dez Tab (7 мин). В каждый стерилизующий раствор добавляли 1-2 капли Tween 20 (Sigma, США). После каждого реагента экспланты 3–4 раза промывали стерильной дистиллированной водой.

При введении в условия *in vitro* в качестве первичных эксплантов использовали листья, апексы и части побегов с узлом. Для изучения процессов морфогенеза и регенерации применяли питательные среды на основе базовых сред Мурасиге и Скуга (МС) (Murashige, Skoog, 1962), Гамборга (В5) (Gamborg, Eveleigh, 1968) и Woody Plant Medium (WPM) (Lloyd, McCown, 1980), дополненные регуляторами роста: 6-бензиламинопурином – БАП (Sigma,

США) в концентрации 0,05–2,0 мг/л, 3-(1,2,3-Тиадиазолин-5)-1-фенилмочевинной – ТДЗ (Duchefa Biochemie, Голландия) – 1,3 мг/л, индолил-3-масляной кислотой – ИМК (Sigma, США) – 0,01–0,5 мг/л, индолил-3-уксусной кислотой – ИУК (Sigma, США) – 1,5 мг/л; и гибберелловой кислотой – ГК<sub>3</sub> (Sigma, США) – 0,1–0,5 мг/л. Все варианты сред содержали 30 г/л сахарозы и 9 г/л агар (Panreas, Испания). Контролем была среда без регуляторов роста. pH среды доводили до 5,7–5,8 1 н. раствором NaOH или HCl. Питательные среды автоклавировали при 120°C в течение 5–12 мин в стерилизаторе LAC 5060S («DAIHAN LABTECH», Южная Корея). Регуляторы роста и витамины вводили в среды после автоклавирования в стерильных условиях бокса биологической безопасности SC2 («ESCO», Сингапур). Субкультивирование эксплантов осуществляли через каждые 3–4 недели. Сосуды с эксплантами содержали в культуральном помещении при температуре 20–22 °С, 16-часовом фотопериоде и освещенности 2–2,5 клк, а также в камере моделирования климатических условий для роста растений MLR-352-PE («Panasonic», Япония). Опыты проводили трижды в десятикратной повторности.

Функциональное состояние фотосинтетического аппарата регенерантов, выращенных в условиях *in vitro*, тестировали по параметрам флуоресценции хлорофилла на приборе LPT-1/CFU (Россия). Флуоресценция возбуждалась в синей области спектра (470 нм), регистрировалась кривая индукции флуоресценции хлорофилла (ИФХ) – кривая Каутского, и на ее базе определяли параметры фотосинтетического преобразования световой энергии в растительной клетке. Темновая адаптация измеряемых объектов длилась 30 мин, после чего их помещали в условия низкой освещенности (менее 100 лк). Время измерений и экстраполяции кривой МИФХ для расчета ее параметров составляло 300 сек. Опыты проводили в пятикратной повторности.

Статистическую обработку полученных данных выполняли с использованием программы STATISTICA for Windows 10.0 (StatSoft, Inc.) и многогранного теста Дункана (P<0,05).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из испытанных нами способов поверхностной стерилизации более эффективной для разных типов эксплантов исследуемых видов была последовательная стерилизация 1,5 мин в 60 % этаноле, 7 мин в 1 % растворе Thimerosal и 7 мин в растворе Dez Tab. При этом уровень контаминации не превышал 10–15 %.

Через 12–28 суток от начала введения происходило развитие адвентивных почек, формирование микророзеток и микропобегов у всех исследуемых видов.

В экспериментах использовали разные варианты сред МС, В5 и WPM, отличающихся по составу и количеству макро- и микросолей, а также регуляторов роста. Испытание этих сред показало, что концентрации макро- и микроэлементов значительно влияли на рост и развитие реликтовых эндемиков в условиях *in vitro*. Исследование влияния трофических факторов показало, что более обедненные по содержанию нитратов и фосфата калия среды, такие, как В5 и WPM, ингибировали регенерационные процессы. При этом отмечали замедление роста микропобегов и хлороз листовых пластинок. В результате проведенных экспериментов среда МС была определена как оптимальная для субкультивирования и последующей регенерации.

Наши исследования показали, что реализация морфогенетического потенциала видов реликтовых эндемиков в условиях *in vitro* проходила двумя путями: прямая регенерация через адвентивное побегообразование – у всех изучаемых видов, и из листа – у *L. glaberrimum*; непрямую регенерацию через соматический эмбриогенез наблюдали у вида *H. ligusticifolium*. Известно, что индукция и пути реализации морфогенеза зависят от происхождения, типа исходного экспланта и условий культивирования (Plant Propagation by Tissue Culture, 2008; Митрофанова, 2011).

Как видно из таблицы 1, регенерационный потенциал микророзеток и микропобегов зависел от вида реликтового эндемика, концентраций регуляторов роста в питательной среде МС и числа субкультивирований.

Инициацию развития пазушных почек и микророзеток наблюдали на всех трех вариантах среды, но оптимальным был вариант с минимальным содержанием регуляторов роста: 0,1 мг/л БАП, 0,1 мг/л ИМК совместно с 0,1 мг/л ГК<sub>3</sub>. После 1 субкультивирования на этой среде высокий регенерационный потенциал был отмечен у видов *S. jailensis* (66,7 %), *Scr. exilis* (50 %), *L. callicephala* (46,7 %) и *L. purpurea* (43,3 %). Однако через 85–90 суток (после 3 субкультивирования) частота регенерации у всех исследуемых видов достигала 90–100 % (рис. 1).

Таблица 1

Регенерационный потенциал 6 видов реликтовых эндемиков флоры Горного Крыма при различных сроках культивирования под воздействием трофических и гормональных факторов

Вид	Частота регенерации, %					
	после 1 субкультивирования			после 3 субкультивирования		
	1	2	3	1	2	3
<i>Lamium glaberrimum</i>	10,0 e	26,7 cd	20,0 d	60,0 b	63,3 ab	90,0 a
<i>Scrophularia exilis</i>	16,7 e	26,7 de	50,0 c	63,3 ab	66,7 ab	96,7 a
<i>Silene jailensis</i>	50,0 de	50,0 de	66,7 bc	83,3 ab	90,0 ab	100,0 a
<i>Heracleum ligusticifolium</i>	3,3 ns	6,7 ns	10,0 ns	70,0 bc	73,3 ab	100,0 a
<i>Lagoseris callicephala</i>	13,3 ns	43,3 e	46,7 cd	83,3 ab	76,7 bc	93,3 a
<i>Lagoseris purpurea</i>	16,7 f	33,3 e	43,3 cd	76,7 ab	76,7 ab	96,7 a

Примечание к таблице. 1 – среда МС + 0,1 мг/л БАП; 2 – среда МС + 0,5 мг/л БАП; 3 – среда МС + 0,1 мг/л БАП + 0,1 мг/л ИМК + 0,1 мг/л ГК<sub>3</sub>.

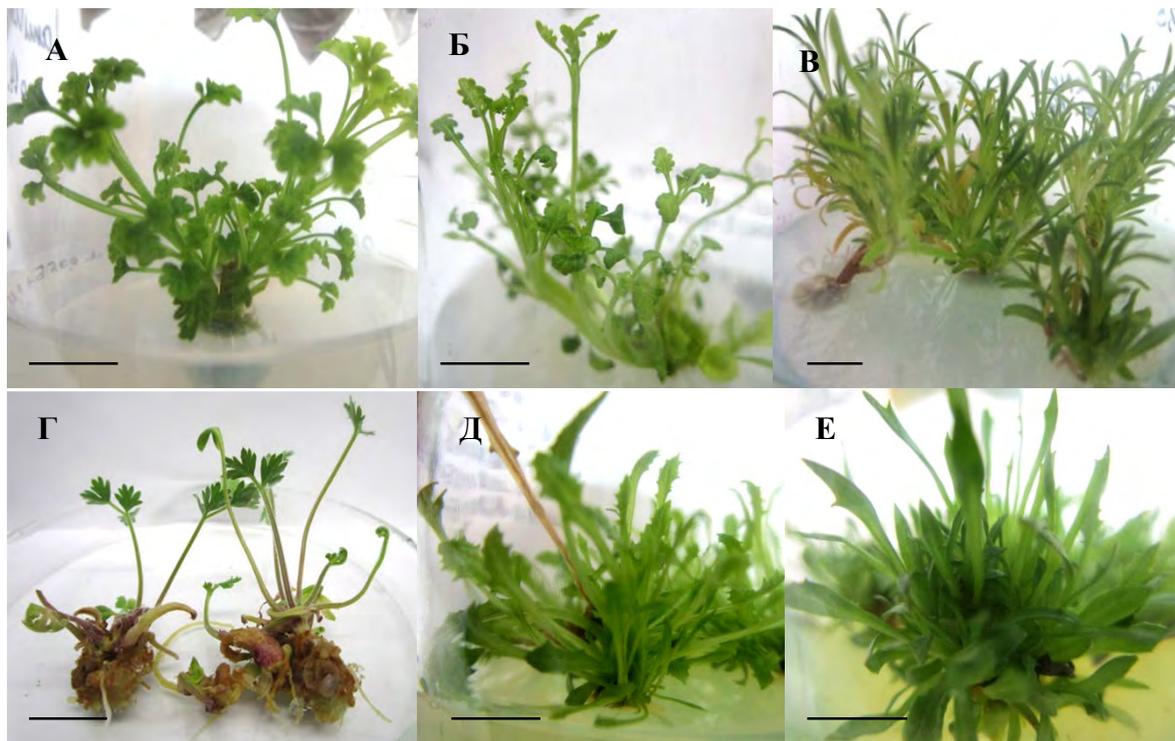


Рис. 1. Множественное адвентивное побегообразование реликтовых эндемиков в условиях *in vitro* на питательной среде МС с 0,1 мг/л БАП, 0,1 мг/л ИМК и 0,1 мг/л ГК<sub>3</sub> (масштабная линейка 1 см)

А – *Lamium glaberrimum*; Б – *Scrophularia exilis*; В – *Silene jailensis*; Г – *Heracleum ligusticifolium*; Д – *Lagoseris callicephala*; Е – *Lagoseris purpurea*.

Несмотря на самый низкий регенерационный потенциал у вида *H. ligusticifolium* в естественных условиях произрастания, по сравнению с другими видами, в условиях *in vitro* этот показатель значительно возрастал после третьего субкультивирования и достигал 100 %.

Оценивая влияние регуляторов роста и их концентраций на морфогенез и регенерацию адвентивных микропобегов, выявлен высокий регенерационный потенциал видов *H. ligusticifolium*, *S. jailensis* и *Scr. exilis* (табл. 2).

Таблица 2

Характеристика регенерационной способности 6 видов реликтовых эндемиков флоры Горного Крыма в условиях *in vitro* после третьего субкультивирования на питательной среде МС с 0,1 мг/л БАП, 0,1 мг/л ИМК и 0,1 мг/л ГК<sub>3</sub>

Вид	К-во микропобегов/эксплант, шт.	Длина микропобега, см	Количество листьев/микропобег, шт.
<i>Lamium glaberrimum</i>	10,10 f	2,71 b	5,19 bc
<i>Scrophularia exilis</i>	12,58 b	3,14 a	7,50 ab
<i>Silene jailensis</i>	13,42 ab	3,04 ab	13,37 a
<i>Heracleum ligusticifolium</i>	15,08 a	1,54 cd	3,15 d
<i>Lagoseris callicephala</i>	10,46 de	0,46 g	6,15 bc
<i>Lagoseris purpurea</i>	11,48 c	0,59 ef	4,44 c

Количество сформировавшихся микропобегов/эксплант достигало 15,08, 13,42 12,58; длина микропобега составила 1,54, 3,04 и 3,14 см; количество листьев/микропобег – 3,15, 13,37 и 7,52 у видов *H. ligusticifolium*, *S. jailensis* и *Scr. exilis*, соответственно.

При культивировании листовых эксплантов *Lam. glaberrimum* нами было отмечено, что у этого вида существуют преддетерминированные зоны меристематической активности, из которых на питательной среде МС с цитокинином ТДЗ в концентрации 1,3 мг/л в результате прямого органогенеза формируются адвентивные почки, развивающиеся в микропобеги (рис. 2). Регенерация микропобегов из листовых эксплантов происходила на 25–30 сутки культивирования, и в этом случае было получено 2–3 микропобега/эксплант. Субкультивирование отделенных микропобегов на среде того же состава индуцировало формирование розетки микропобегов в количестве 7–10 штук.



Рис. 2. Прямая регенерация микропобегов из листовых эксплантов *Lamium glaberrimum* на питательной среде МС с 1,3 мг/л ТДЗ (масштабная линейка 1 см)

Наряду с этим, часть микропобегов была помещена на питательную среду МС с 1,5 мг/л БАП и 1,5 мг/л ИУК. При этом регенерация проходила по пути непрямого органогенеза и формировались единичные микропобеги.

Регенерация через непрямо соматический эмбриогенез отмечена у вида *H. ligusticifolium* на питательной среде МС, дополненной 1,5 мг/л БАП и 1,5 мг/л ИУК (рис. 3а). Из базальной части микропобега формировался морфогенный каллус, внутри и по периферии которого развивались соматические зародыши, проходившие все стадии от глобулы до торпеды (рис. 3б). 25–30 % эксплантов отмечали на семядольной стадии развития, из них формировались полноценные регенеранты (рис. 3в).

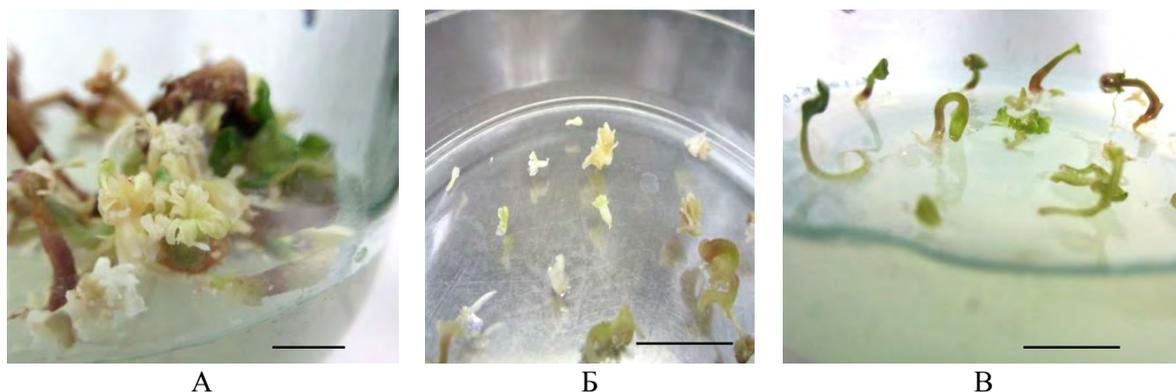


Рис. 3. Непрямой соматический эмбриогенез *Heracleum ligusticifolium* в условиях *in vitro* на питательной среде МС с 1,5 мг/л БАП и 1,5 мг/л ИУК (масштабная линейка 1 см)

А – формирование соматических зародышей из каллуса в базальной части микропобега; Б – соматические зародыши; В – прорастание соматических зародышей *in vitro*.

Таким образом, показаны два пути реализации морфогенетического потенциала видов реликтовых эндемиков в культуре *in vitro*: прямая регенерация через адвентивное побегообразование и непрямая регенерация через соматический эмбриогенез.

В ходе структурно-функциональных исследований реликтовых эндемиков, культивируемых в условиях *in vitro*, получены экспериментальные данные, представленные в таблице 3. Известно, что максимальные значения роста флуоресцентного сигнала от  $F_0$  до уровня  $F_m$  – переменная флуоресценция ( $F_v$ ) присущи фотосинтетическим аппаратам с наилучшим функциональным состоянием (Budagovsky et al., 2002; Романов и др., 2010). Исходя из этого, при размножении в условиях *in vitro* нормальное функциональное состояние было присуще видам *L. callicephala* и *L. purpurea* (табл. 3).

Таблица 3

Параметры фотосинтетической активности листьев и микропобегов некоторых реликтовых эндемиков флоры Горного Крыма при их культивировании *in vitro*

Вид	$F_v$	$(F_m - F_{st})/F_m$	$F_m/F_{st}$
	относительная единица флуоресценции, М		
<i>Heracleum ligusticifolium</i>	259 cd	0,43 bc	2,44 bc
<i>Lagoseris callicephala</i>	515 ab	0,56 b	3,18 b
<i>Lagoseris purpurea</i>	542 a	0,71 a	3,59 a
<i>Silene jailensis</i>	298 bc	0,44 bc	2,48 bc

Примечание к таблице.  $F_v$  – переменная флуоресценция;  $(F_m - F_{st})/F_m$  – фотосинтетическая активность;  $F_m/F_{st}$  – индекс жизнеспособности.

Процесс спада флуоресценции обусловлен развитием и поддержанием разности протонного градиента рН поперек тилакоидной мембраны, а также отражает светорегулируемое перераспределение энергии возбуждения хлорофилла, что возможно при высокой степени структурной целостности элементов фотосистем. О. Н. Будаговская с соавторами (2007), а также Стебет и Говаджи (Stirbet, Govindjee, 2011) указывают на связь между кинетикой МИФХ и фотосинтетической ассимиляцией углекислоты, благодаря чему фотосинтетическая активность может быть оценена при помощи выражения:  $Kf=(F_m-F_{st})/F_m$ . Данный параметр отражает эффективность утилизации света при фотосинтезе, он не имеет размерности и не зависит от видовой и сортовой принадлежности. В норме ее величина составляет 0,6 и выше, при патологиях различного происхождения снижается пропорционально ослаблению фотосинтетической функции (Stirbet and Govindjee, 2011). Фотоингибирование отмечено у видов *H. ligusticifolium* и *S. jailensis*. Активная работа ассимиляционного аппарата позволяет выделить вид *L. purpurea*.

Индекс жизнеспособности рассчитан как отношение максимума флуоресценции к стационарному уровню и обозначается как  $F_m/F_{st}$ . Также как и параметр  $Kf$ , не имеет размерности и видовой или сортовой специфики. В норме величина  $F_m/F_{st}$  редко превышает 4 ед. (Романов и др., 2010; Stirbet and Govindjee, 2011). Тенденция анализа данного параметра сходна с предыдущими: максимум жизнеспособности проявляют виды *L. purpurea* и *L. callicephala*, минимум определен для *S. jailensis*, *H. ligusticifolium*.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, наши исследования продемонстрировали, что в качестве эксплантов могут быть использованы сегменты побега, листья и другие органы, полученные из микропобегов, культивируемых в условиях *in vitro*. Впервые показано, что морфогенетический потенциал реализуется путем прямой и непрямой регенерации и обеспечивает высокую эффективность микроразмножения 6 видов реликтовых эндемиков: *Lam. glaberrimum*, *L. callicephala*, *L. purpurea*, *Scr. exilis*, *S. jailensis*, *H. ligusticifolium*.

Оптимальной питательной средой для регенерации микропобегов и размножения изучаемых видов *in vitro* является среда Мурасиге и Скуга, дополненная 0,1 мг/л БАП и 0,1 мг/л ИМК совместно с 0,1 мг/л ГКз. В базальной части микропобегов *H. ligusticifolium* на питательной среде МС с 1,5 мг/л БАП и 1,5 мг/л ИУК формируется морфогенный каллус, из которого развиваются соматические зародыши, проходящие стадии от глобулы до торпеды. Полноценные регенеранты получены из зародышей на семядольной стадии развития.

Дана оценка функциональному состоянию фотосинтезирующих тканей и в целом регенерантам 4 видов реликтовых эндемиков. Выявлено активное функциональное состояние *L. purpurea*, нормальное – *L. callicephala*, и некоторое фотоингибирование у *S. jailensis* и *H. ligusticifolium* (критические пределы витального состояния не достигнуты).

## Список литературы

- Будаговская О. Н., Будаговский А. В., Будаговский И. А. Автоматизированная система контроля структурных перестроек растительных тканей // Приборы и техника эксперимента. – 2007. – № 1. – С. 161–162.
- Бутенко Р. Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М.: Наука, 1964. – 272 с.
- Красная книга Республики Крым. Растения, водоросли и грибы / Отв. ред. А.В. Ена и А.В. Фатерыга. – Симферополь: ООО «ИТ «АРИАЛ», 2015. – 480 с.
- Красная книга Российской Федерации (растения и грибы) / Министерство природных ресурсов и экологии РФ; Федеральная служба по надзору в сфере природопользования; РАН; Российское ботаническое общество; МГУ им. М.В. Ломоносова; Гл. редкол.: Ю.П. Трутнев и др.; Сост. Р.В. Камелин и др. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2008. – 885 с.
- Международная программа ботанических садов по охране растений / Пер. с англ. Ю.Лисиной. Под ред. И. Смирнова, В. Тихоновой. – М., 2000. – 57 с.
- Митрофанова И. В. Соматический эмбриогенез и органогенез как основа биотехнологии получения и сохранения многолетних садовых культур. – К.: Аграрна наука, 2011. – 344 с.

Митрофанова И. В. Биотехнологии оздоровления, размножения и сохранения садовых культур // Материалы VII Международной научно-практической конференции «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира (физиолого-биохимические, эмбриологические, генетические и правовые аспекты)», посвященной 30-летию отдела биотехнологии растений Никитского ботанического сада г. Ялта, Республика Крым, Россия. 25 сентября – 1 октября 2016 г. – Симферополь: ИТ «АРИАЛ», 2016. – С. 10.

Митрофанова И. В., Митрофанова О. В., Корзина Н. В., Лесникова-Седошенко Н. П., Иванова Н. Н., Тевфик А. Ш., Пилипчук Т. И., Заяц А. Ю., Челомбит С. В., Мелихова Г. И. Методические аспекты в исследовании органогенеза и соматического эмбриогенеза *in vitro* представителей семейств Ranunculaceae, Cannaceae, Moraceae, Rosaceae, Mugiaceae, Oleaceae, Actinidiaceae // Методология биотехнологических и вирусологических исследований ценных многолетних культур: Сборник научных трудов ГНБС. – 2014. – Т. 138. – С. 102–136.

Митрофанова И. В., Митрофанова О. В., Никифоров А. Р., Лесникова-Седошенко Н. П., Иванова Н. Н., Челомбит С. В., Жданова И. В. Особенности введения в условия *in vitro* некоторых реликтовых эндемиков флоры горного Крыма // Бюллетень ГНБС. – 2016. – Вып. 121. – С. 62–69.

Молканова О. И., Васильева О. Г., Коновалова Л. Н. Научные основы сохранения и устойчивого воспроизводства генофонда растений в культуре *in vitro* // Вестник Удмуртского университета. – 2015. – Т. 25, вып. 2. – С. 95–100.

Никифоров А. Р. Реликтовые эндемики флоры Горного Крыма в составе петрофитона и гляреофитона // Ботан. журн. – 2016. – Т. 101, № 9. – С. 1008–1024.

Новикова Т. И. Использование биотехнологических подходов для сохранения биоразнообразия растений // Растительный мир Азиатской России. – 2013. – № 2 (12). – С. 119–128.

Палий А. Е., Митрофанова И. В., Браилко В. А., Гребенникова О. А., Зубкова Н. В., Челомбит С. В. Морфологические изменения и метаболические процессы, происходящие в вегетативных органах *Canna × hybrida* hort. ex Basque при поражении вирусными патогенами // Бюллетень ГНБС. – 2016. – Вып. 120. – С. 61–68.

Романов В. А., Галелюка И. Б., Сарахан Е. В. Портативный флуориметр Флоратест и особенности его применения // Сенсорна електроніка і мікросистемні технології. – 2010. – Т. 1(7), № 3. – С. 39–44.

Budagovsky A., Budagovskaya O., Lenz F., Keutgen A., Alkayed K. Analysis of functional state of cultivated plants by means of interference of scattered light and chlorophyll fluorescence // Journal of Applied Botany. – 2002. – Vol. 76. – P. 115–120.

Convention on Biological Diversity. – [www.plant-conservation-report-en.pdf](http://www.plant-conservation-report-en.pdf)

Cruz-Cruz C. A., González-Arno M. T., Engelmann F. Biotechnology and Conservation of Plant Biodiversity // Resources. – 2013. – Vol. 2. – P. 73–95. doi:10.3390/resources2020073

Engelmann F. Biotechnology and Conservation of Plant Biodiversity // Resources. 2013. – Vol. 2. – P. 73–95. doi:10.3390/resources2020073

Gamborg O. L., Eveleigh D. E. Culture methods and detection of glucanases in cultures of wheat and barley // Can. J. Biochem. – 1968. – 46, N 5. – P. 417–421.

Global Strategy Plant Conservation – [www.botanicgardens/ie/gspc/pdfs/gspc.pdf](http://www.botanicgardens/ie/gspc/pdfs/gspc.pdf)

Grebennikova O., Paliy A., Brailko V., Mitrofanova O., Rabotyagov V., Zhdanova I., Mitrofanova I. Adaptive capacity of some lavender and lavandin cultivars *in vitro* and *in situ* // AGROFOR International Journal. – 2017. – Vol. 2, N 1. – P. 91–98. DOI: 10.7251/AGRENG1701091G

Kyte L., Kleyn J., Scoggins H., Bridgen M. Plants from test tubes: An introduction of micropropagation. 4th ed. – Timber Press, Portland, Oregon, 2013. – 274 p.

Lloyd G., and McCown B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture // Proc. Int. Plant Prop. Soc. – 1980 – Vol. 30. – P. 420–427.

Mitrofanova I., Brailko V., Lesnikova-Sedoshenko N., Mitrofanova O. Clonal micropropagation and some physiology aspects of essential oil roses valuable cultivars regeneration *in vitro* // Agriculture & Forestry (Poljoprivreda i sumarstvo). – 2016a. – Vol. 62, Issue 4. – P. 73–81. DOI: 10.17707/AgricForest.62.4.09

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

Mitrofanova I., Nikiforov A., Lesnikova-Sedoshenko N., Mitrofanova O. Biotechnological Approaches to Cultivation of Some Relict Endemics // In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal. – 2017a. – Vol. 53, Suppl. 1. – P. 38. DOI: 10.1007/s11626-017-0162-1

Mitrofanova I. V., Kuzmina T. N., Brailko V. A. Some histological and physiological features of meristemoids formation in canna lily (*Canna × hybrida* hort.) // Acta Horticulturae. – 2017b. – N 1167. – P. 63–68. DOI: 10.17660/ActaHortic.2017.1167.9

Mitrofanova I. V., Tefvik A. Sh., Mitrofanova O. V., Brailko V. A., Lesnikova-Sedoshenko N. P. Features of canna regeneration *in vitro* and plantlets adaptation *in vivo* // Acta Horticulturae. – 2017c. – N 1155. – P. 447–454. DOI: 10.17660/ActaHortic.2017.1155.66

Mitrofanova O. V., Grebennikova O. A., Paliy A. E., Brailko V. A., Mitrofanova I. V. Biochemical and physiological features of regenerants in some lavender and lavandin cultivars *in vitro* // Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology. – 2016. – Vol. 17, Issue 7–8. – P. 335–341.

Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiologia Plantarum. – 1962. – Vol. 15 (3). – 473–497. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

Plant Propagation by Tissue Culture. 3rd Edition / Eds. E. F. George, M. A. Hall, G.-J. De Klerk. – Dordrecht, The Netherlands: Springer. – 2008. – Vol. 1. – 501 p.

Stirbet A., Govindjee On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll *a* fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 2011. – Vol. 104, N 1–2. – P. 236–257. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2010.12.010

**Mitrofanova O. V., Mitrofanova I. V., Lesnikova-Sedoshenko N. P., Brailko V. A., Nikiforov A. R., Chelombit S. V., Ivanova N. N., Zhdanova I. V. Biotechnological and physiological features in the propagation of some rare endemic species of the Mountain Crimea flora // Ekosystemy. 2017. Iss. 11 (41). P. 44–52.**

Complex botanical, biotechnological and physiological studies have been carried out in order to identify special features in the development of relict endemic species of the Crimean flora – *Heracleum ligusticifolium* M. Bieb. (Apiaceae), *Lagoseris callicephala* Juz., *L. purpurea* L. (Asteraceae), *Lamium glaberrimum* (K. Koch) Taliev (Lamiaceae), *Scrophularia exilis* Popl. (Scrophulariaceae), *Silene jailensis* N. I. Rubtzov (Caryophyllaceae). Opportunities for those species *in vitro* propagation have been demonstrated. The presented results significantly expand and deepen knowledge about their developmental biology and morphological capacities, enable to form *in vitro* genebank for the long term conservation of the studied species. For the first time under *in vitro* conditions, the main ways of morphogenesis in 6 relict endemic species of the Mountain Crimea flora have been revealed: direct regeneration via adventitious bud formation and indirect regeneration via somatic embryogenesis. It was demonstrated that MS medium supplemented with 0.1 mg/l BAP, 0.1 mg/l IBA and 0.1 mg/l GK<sub>3</sub> significantly increased the efficiency of regeneration in the studied species. Functional state of organs and tissues photosynthetic apparatus in four species under *in vitro* culture was assessed.

*Key words:* rare species, morphogenesis, culture medium, plant growth regulators, microshoot regeneration.

Поступила в редакцию 07.11.2017