

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«КРЫМСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИМЕНИ В. И. ВЕРНАДСКОГО»

## **СБОРНИК ТЕЗИСОВ УЧАСТНИКОВ**

V научно-практической конференции  
профессорско-преподавательского состава,  
аспирантов, студентов и молодых ученых

**«ДНИ НАУКИ КФУ им. В.И. ВЕРНАДСКОГО»**

**ТАВРИЧЕСКАЯ АКАДЕМИЯ**

---

(наименование структурного подразделения/филиала)

**СЕКЦИЯ: «ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ»**

г. Симферополь 2019 год

V научно-практическая конференция профессорско-преподавательского состава, аспирантов, студентов и молодых ученых «Дни науки КФУ им. В.И. Вернадского» / Сборник тезисов участников/ «Физиология растений» // Симферополь, 2019

В сборник включены доклады участников V научно-практической конференции профессорско-преподавательского состава, аспирантов, студентов и молодых ученых «Дни науки КФУ им. В.И. Вернадского», отражающие достижения научных и практических изысканий в сфере естественных, гуманитарных, технических наук и информационных технологий.

Работы публикуются в редакции авторов. Ответственность за достоверность фактов, цитат, собственных имен и других сведений несут авторы.

СЕКЦИЯ «ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ»

---

(наименование секции)

КАЛЛУСООБРАЗОВАНИЕ И МОРФОГЕНЕЗ В КУЛЬТУРЕ *HEDERA HELIX* L. *IN VITRO*

Гоц Я.И.,<sup>1</sup> Бугара И.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>обучающаяся 1 курса магистратуры кафедры ботаники и физиологии растений и биотехнологий Таврической академии КФУ

<sup>2</sup>научный руководитель, доцент кафедры ботаники и физиологии растений и биотехнологий, к.б.н., доцент  
gotsjanina@mail.ru

**Введение.** В настоящее время треть лекарственных препаратов производится на основе растительного сырья, в том числе, широко применяется растение - Плющ обыкновенный (*H. helix*). Фармацевтика является основным направлением практического использования *H. helix*, где особенно высоко ценятся сапонины плюща, которые содержатся в древесине, листьях и цветках растения. Современное состояние окружающей среды, не позволяет применять большинство растений как лекарственное сырье. Альтернативой, в данном случае, можно считать использование культуры клеток, тканей и органов растений *in vitro* как основного метода получения клеточной биомассы, являющейся источником биологически активных веществ фармакологического назначения.

**Цель работы.** Оптимизация условий получения и пассирования каллусных культур *H. helix*, а также подбор условий для индукции морфогенеза *in vitro*.

**Методика исследования.** Для экспериментальных исследований *in vitro* использовали семена *H. helix*. Экспланты помещали на поверхность модифицированных нами агаризованных питательных средах Мурасиге и Скуга (МС), содержащих в различных концентрациях 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д), 6-бензиламинопурин (6-БАП) и кинетин. В качестве культуральных сосудов использовали химические пробирки 1,5x16 см с 10 мл питательной среды. Культуральные сосуды с эксплантами размещали в инкубаторе лабораторном Climacell™ MMM Medcenter Einrichtungen GmbH при температуре 23 °С, относительной влажностью воздуха 50%, освещенности 4000 люкс. Продолжительность одного цикл выращивания каллусных культур составляла 60 суток. Цитологические исследование временных препаратов проводили с помощью микроскопа Olympus CX31RTSF, приобретенного в рамках реализации проекта программы развития ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского» «Разработка сетевой образовательной программы по направлению подготовки 06.06.01 Биологические науки, направленности 03.02.08 Экология».

**Результаты исследования.** Начальным этапом наших исследований являлся подбор условий получения каллусных культур при культивировании семян *H. helix in vitro*. С этой целью был проведен анализ влияния составов модифицированных нами питательных сред на индукцию каллусогенеза. При использовании питательной среды МС, дополненной 2,0 мг/л 2,4 – Д в качестве основного дедифференцирующего фактора, 0,5 мг/л 6 – БАП и 0,5 мг/л кинетином, отмечены наиболее высокие значения ростового индекса в цикле пассирования. В ходе эксперимента первые признаки каллусообразования наблюдались уже на 20 сутки после помещения эксплантов на питательную среду. Формирующийся каллус имел рыхлую консистенцию, бежевую или светло-коричневую окраску. Через 30-35 суток культивирования визуально обнаруживались признаки формирования побегов с последующей индукцией корнеобразования и получения растений-регенерантов плюща в каллусных культурах 0-пассажа. Изучение цитологических особенностей первичных и

пассируемых каллусных культур показало, что развитие растений-регенерантов в каллусах 0-пассажа связано с заложением морфогенных зон, которые отсутствовали в первом и последующих пассажах.

**Выводы.** Выявлено, что на питательной Мурасиге и Скуга, дополненной 2,0 мг/л 2,4 – Д, 0,5 мг/л 6 – БАП и 0,5 мг/л кинетинном наблюдались высокая частота каллусообразования и интенсивность роста первичных и пассируемых каллусных культур. Установлено, что использование данной питательной среды способствовало образованию растений-регенерантов в каллусных культурах 0-пассажа, путем непрямого органогенеза.

*Работа выполнена в рамках реализации проекта программы развития ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского» на 2015 – 2024 годы: «Разработка новой междисциплинарной модульной магистерской программы «Биотехнология, биохимия и биоинформатика»».*

## КАЛЛУСОГЕНЕЗ В КУЛЬТУРЕ ВЕГЕТАТИВНЫХ ОРГАНОВ *TAGETES ERECTA* L. *IN VITRO*

Шведова Л.О.<sup>1</sup>, Бугара И.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> обучающаяся 1 курса магистратуры кафедры ботаники и физиологии растений и биотехнологий факультета биологии и химии Таврической академии КФУ

<sup>2</sup> научный руководитель, доцент кафедры ботаники и физиологии растений и биотехнологий, к.б.н., доцент  
shvedovalolita@yandex.ru

**Введение.** Род *Tagetes* принадлежит к семейству Asteraceae. К видам рода *Tagetes* относятся важные декоративные культуры, а также растения, имеющие медицинское и фармакологическое значение. Несмотря на многочисленные исследования представителей рода, связанные с получением вторичных метаболитов и эфирных масел, работ в области культивирования клеток, тканей и органов *in vitro* недостаточно.

Культура клеток растений широко используется в самых разнообразных фундаментальных и прикладных исследованиях. На основе культивируемых клеток и тканей высших растений в настоящее время созданы и активно развиваются перспективные, принципиально новые технологии для различных отраслей промышленности и сельского хозяйства. В этой связи актуальным является разработка способа получения каллусных культур *Tagetes erecta* L. на основе культивирования листовых и стеблевых эксплантов.

**Цель и объект исследований.** Цель исследования - определение условий получения и пассирования каллусных культур *Tagetes erecta* L. Объектом исследования служили листовые и стеблевые экспланты бархатцев прямостоячих.

**Методика исследования.** Все работы с культурой клеток и тканей в условиях *in vitro* проводились в асептических условиях. Для получения каллусной культуры побеги с молодыми листьями поверхностно стерилизовали 9 % гипохлоритом калия в течение 10 минут. Для индукции каллусообразования и пассирования каллуса использовали несколько вариантов питательной среды Мурасиге и Скуга, отличающиеся типом и концентрацией фитогормонов. Помещение эксплантов на питательную среду выполняли в ламинарном боксе MSC Advantage™ Thermo Fisher Scientific II класса биологической безопасности. Культивирование эксплантов проводили в колбах Эрленмейера с 30 мл питательной среды. Культуральные сосуды размещали в инкубаторе лабораторном Climacell™ MMM Medcenter Einrichtungen GmbH при 16-ти часовом фотопериоде, освещенности 4500 лк, влажности 30%, температуре световой фазы 26 °С, темновой – 26 °С. Один цикл культивирования (пассаж) составлял 45 суток.

Для изучения цитологических особенностей первичных и пассируемых культур использовали микроскоп OLYMPUS CX31RTSF.

**Результаты исследований.** Анализ влияния составов питательных сред на индукцию каллусогенеза в культуре листовых эксплантов показал, что высокая интенсивность каллусообразования наблюдалась на питательной среде Мурасиге и Скуга, дополненной 2,0 мг/л 2,4-Д, 0,5 мг/л 6-БАП, 0,5 мг/л кинетинном. При использовании безгормональной питательной среды каллусогенеза отмечено не было.

Наиболее значимыми физическими факторами, оказывающими воздействие на частоту каллусообразования оказались температура и интенсивность освещения. Установлено, что при повышении температуры световой и темновой фазы культивирования, а также при снижении интенсивности освещения, частота каллусообразования повышалась. При температуре световой фазы 28 °С, темновой фазы – 26 °С, влажности воздуха 30% и освещенности 4500 люкс были получены наилучшие результаты по частоте каллусообразования.

Каллусообразование в культуре листовых эксплантов наблюдалось уже на 12-15 сутки после высадки их на питательную среду. На стеблевых эксплантах была отмечена ограниченная интенсивность роста каллуса, то есть активного роста не было, и он продолжался до определенного момента культивирования. В дальнейших исследованиях стеблевые экспланты не использовали. По мере пассирования цвет каллусной культуры *T. erecta* менялся от светло-желтой до темно-коричневой, а также менялась плотность каллуса.

Ростовой индекс был вычислен для каллусных культур *T. erecta* I-, II-, III-пассажей.

Показано снижение ростового индекса от I-пассажа до II- и III-пассажей. Ростовой индекс I-пассажа составляет 40%. Во II-пассаже наблюдается снижение ростового индекса до 27,7%. Наименьший ростовой индекс наблюдался в III-пассаже – 15,3%.

Цитологические исследования каллусных культур *T. erecta* I – III пассажей, находящихся в стационарной фазе роста, показали, что они состоят из гетерогенной популяции клеток. Были обнаружены клетки меристематического типа, клетки паренхимного типа, которые различались по форме и размерам, запасные клетки, элементы сосудистой системы. В каллусной культуре I-пассажа были обнаружены морфогенные зоны.

Изучение соотношения клеток разных типов в пассируемых каллусных культурах *T. erecta* показало, что с увеличением пассажа наблюдается уменьшение количества клеток меристематического типа от 43% в I-пассаже до 35% и 25% во II- и III-пассажах соответственно. На фоне уменьшения количества клеток меристематического типа наблюдается увеличение количества клеток паренхимного типа от 43% в I- пассаже до 55% и 60% в II- и III-пассажах.

Установленное уменьшение количества клеток меристематического типа служит обоснованием данных, связанных с снижением ростового индекса в процессе пассирования каллусных культур.

**Выводы.** Установлено, что оптимальной питательной средой для получения и пассирования каллусных культур *Tagetes erecta* L. является среда Мурасиге и Скуга, дополненная 2,0 мг/л 2,4-Д, 0,5 мг/л 6-БАП, 0,5 мг/л кинетинном. Выявление, в каллусных культурах *Tagetes erecta* L. I-пассажа многочисленных морфогенных зон, может служить основанием для дальнейшего их использования в исследованиях по индукции морфогенеза и получению растений-регенерантов.

*Работа выполнена в рамках реализации проекта программы развития ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского» на 2015 – 2024 годы: «Разработка новой междисциплинарной модульной магистерской программы «Биотехнология, биохимия и биоинформатика»».*

## МОРФОЛОГО-КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ИЗОЛЯТОВ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ ИЗ КОРНЕЙ ТРЕХ ВИДОВ ОРХИДНЫХ УМЕРЕННОЙ ЗОНЫ

Романова Д.А.<sup>1</sup>, Сидякин А.И.<sup>2</sup>,

<sup>1</sup> магистр кафедры ботаники и физиологии растений и биотехнологий факультета биологии и химии Таврической академии КФУ;

<sup>2</sup> доцент кафедры ботаники и физиологии растений и биотехнологий факультета биологии и химии Таврической академии КФУ;

dasha\_romanova93@mail.ru

**Введение.** Широко известно, что Орхидные являются растениями в своем онтогенезе тесно связанными с различными микроскопическими грибами. Поэтому, несомненно важными являются исследования, направленные на изучение микромицетов ассоциированных с их корнями, и последующие работы по определению таксономической принадлежности выделенных микромицетов, выяснению их влияния на процессы роста, развития и морфогенеза этих растений как в культуре *in vitro* так и *in vivo*.

**Цель и задачи:** изучение таксономической принадлежности некоторых эндофитных микромицетов выделенных из корней *Orchis purpurea* (Huds.), *Orchis tridentata* (Scop.) и *Limodorum abortivum* (L.) и их биологическая активность в отношении модельного объекта – изолированных черенков *Phaseolus vulgaris*.

**Материалы и методы.** Объектом исследования служили шестнадцать изолятов эндомикоризных микроскопических грибов, выделенные из тканей корней трех видов крымских орхидей *O. purpurea*, *O. tridentata* и *L. abortivum*. Описание колоний микромицетов, а так же определение их таксономической принадлежности проводили согласно стандартной схеме морфолого-культуральных и цитоморфологических исследований на третьи и седьмые сутки их культивирования на питательных средах различного состава (Методы экспериментальной микологии, 1982 г.). Для определения биологической активности исследуемых изолятов использовали метод биотестирования с использованием в качестве модельного объекта изолированных черенков фасоли (Турецкая 1966; Большой практикум по физиологии растений, 1978) при этом определяли продукцию микромицетами стимуляторов (витаминов, ауксинов и др.) и/или веществ проявляющих фитотоксический эффект. Характер фитотоксичности регистрировали, согласно визуальной оценке степени повреждения растений модельного объекта на каждом черенке согласно общепринятой методике (Методические указания по регистрационным испытаниям фунгицидов в сельском хозяйстве, 2009).

**Результаты и обсуждение.** При изучении морфологических особенностей, исследуемых микромицетов на питательных средах различного состава, установлена родовая принадлежность всех исследуемых микромицетов. шесть изолятов *Aspergillus* sp. (*P. Micheli*); один изолят - *Penicillium* sp. (*Link*); один смешанный изолят, в составе которого при цитологических исследованиях выявлены конидиеносцы *Verticillium* sp. (*Nees*), и *Penicillium* sp.; и девять изолятов *Fusarium* sp. (*Link*) (табл. 1).

Изучение влияния микромицетов ассоциированных с корнями орхидных умеренной зоны на корнеобразование у черенков *Phaseolus vulgaris* показало, что под действием метаболитов (культуральной жидкости) исследуемых микромицетов у черенков фасоли наблюдалась различная реакция (табл. 1).

Установлено, что среди полученных нами эндомикоризных микромицетов обнаружены такие которые не проявляют ризогенной активности. По сравнению с действием ИУК в концентрациях от 1,0 до 100,0 мг/л. Такие эффекты отмечены под действием культурных жидкостей семи изолятов *Fusarium* sp. (№№ 123-5, 123-2, 157(3), 81-1, 174, 5-2, 76-3) ИУК подобное ризогенное действие оказывали так же один изолят относящийся к роду *Verticillium* sp. (№5-4) и один смешанный изолят (№180.2) изолированне из *O. purpurea* (табл. 1).

Как показали проведенные нами исследования через 7 дней после обработки черенков поражение черенков отсутствовало и фитотоксичность не наблюдалась в вариантах с использованием ИУК и витаминов во всех исследованных концентрациях.

Таблица 1.

**Влияние изолятов микромицетов ассоциированных с корнями *Orchis purpurea*, *Orchis tridentata*, *Limodorum abortivum*, и фитогормонов на процессы корнеобразования у черенков фасоли**

| Вариант опыта   | Количество корней, шт | Высота стебля, мм |
|---|-----------------------|-------------------|
| Вода  | 8                     | 11,6              |
| ИУК 1,0   | 15,8                  | 16,6              |
| ИУК 10,0  | 19,2                  | 36,2              |
| ИУК 100,0   | 33,2                  | 57,8              |
| Изолят №33, <i>L. abortivum</i> , <i>Aspergillus</i> sp.                            | 2,4                   | 11,4              |
| Изолят №97(1), <i>L. abortivum</i> , <i>Aspergillus</i> sp.                         | 0                     | 0                 |
| Изолят №173(2), <i>O. purpurea</i> , <i>Penicillium</i> sp.                         | 0                     | 0                 |
| Изолят №123-5, <i>O. tridentata</i> , <i>Fusarium</i> sp.                           | 21,4                  | 42,8              |
| Изолят №123-2, <i>O. tridentata</i> , <i>Fusarium</i> sp.                           | 17,8                  | 51,8              |
| Изолят №4-1, <i>O. purpurea</i> , <i>Aspergillus</i> sp.                            | 0                     | 0                 |
| Изолят №157(3), <i>O. tridentata</i> , <i>Fusarium</i> sp.                          | 23,2                  | 57,4              |
| Изолят №81-1, <i>O. tridentata</i> , <i>Fusarium</i> sp.                            | 20,8                  | 40,8              |
| Изолят №123-3, <i>O. tridentata</i> , <i>Fusarium</i> sp.                           | 15,6                  | 27                |
| Изолят №180.2, <i>O. purpurea</i> , <i>Verticillium</i> sp.+ <i>Penicillium</i> sp. | 18,6                  | 54,8              |
| Изолят №76-3, <i>L. abortivum</i> , <i>Fusarium</i> sp.                             | 30                    | 59,2              |
| Изолят №5-4, <i>O. purpurea</i> , <i>Verticillium</i> sp.                           | 26,8                  | 43,2              |
| Изолят №59-(2), <i>L. abortivum</i> , <i>Fusarium</i> sp.                           | 0                     | 0                 |
| Изолят №84(2), <i>L. abortivum</i> , <i>Fusarium</i> sp.                            | 8,6                   | 13                |
| Изолят №174, <i>O. purpurea</i> , <i>Fusarium</i> sp.                               | 16,2                  | 54,8              |
| Изолят 5-2, <i>O. purpurea</i> , <i>Fusarium</i> sp.                                | 27,6                  | 44,8              |

Слабое, едва заметное поражение черенков (1 балл) со следами хлороза листьев вызывала культуральная жидкость изолята № 180.2, состоящая из микромицетов *Penicillium* sp. и *Verticillium* sp. Небольшое поражение (2 балла) занимающее до 10% листьев, стеблей растений наблюдалось под действием изолятов №№ 174; 5-2 (*Fusarium* sp.) и № 5-4 (род *Verticillium* sp.). Повреждение от 11 до 25% листьев (3 балла) возникло под влиянием изолятов №№ 81-1; 76-3; 123-5; 123-3 отнесенных к *Fusarium* sp. Высокая степень фитотоксичности (4 балла) отмечена при действии изоляты № 59 (2) (*Aspergillus* sp.) и №№ 84 (2), 157 (3), 123-2 (*Fusarium* sp.). Нежизнеспособными растениями с поражением свыше 50% общей массы черенков (5 баллов), что привело их к гибели оказались обработанные культуральной жидкостью изолятов *Aspergillus* sp. № 4-1, 33 и 97(1); а также изолята *Penicillium* sp. №173 (2).

**Выводы:** 1. Исследована морфологических и культуральных особенностей эндофитных микроскопических грибов, выделенных из корней *Orchis purpurea* (Huds.), *Orchis tridentata* (Scop.), *Limodorum abortivum* (L.), а также их родовая принадлежность.

2. Из шестнадцати изолятов эндомикоризных микромицетов Крымских видов орхидей шесть изолятов не проявляли ризогенной активности; девять изолятов стимулировали ризогенез так же как раствор фитогормона ИУК в концентрациях от 1,0 до 10,0 мг/л.

3. Среди изолятов не проявивших ризогенной активности присутствуют изоляты с различной степенью фитотоксичности по отношению к изолированным черенкам фасоли.

# ИССЛЕДОВАНИЕ ЦЕЛЛЮЛОЗОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS* ИЗ КОЛЛЕКЦИИ «НПО БИОТЕХСОЮЗ»

Арободжиева М.Р.<sup>1</sup>, Сидякин А.И.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> кафедра ботаники и физиологии растений и биотехнологий Таврической академии КФУ, обучающаяся 1М курса гр. ботаники и физиологии растений и биотехнологий

<sup>2</sup>Заведующий лабораторией биотехнологий НПО Биотехсоюз, к.б.н.

научный руководитель: к.б.н., доцент Сидякин А.И.

*info@biotechsouz.ru; abduveli98@mail.ru*

**Введение.** Явление целлюлазной активности бацилл – сложный многофакторный процесс обуславливается комплексом их биологических свойств и основывается на совместном действии различных групп вторичных метаболитов.

Способность бактерий рода *Bacillus* быть активными целлюлозолитиками, их способность формировать эндоспоры, и продуцировать экзоферменты позволяет рассматривать этих микроорганизмов как перспективного агента в отношении ускорения и усиления эмиссии, труднорастворимого органического вещества.

**Целью работы** является исследование целлюлозолитической активности штаммов бактерий рода *Bacillus* по способности к гидролизу растворимого (карбоксиметилцеллюлоза) и нерастворимого (не модифицированная целлюлоза) субстрата.

**Материалы и методы.** Материал – 31 штамм бактерий рода *Bacillus* из коллекции «НПО Биотехсоюз».

Гидролиз КМЦ исследовали методом пластинок на питательной среде МПА содержащей 0,1% КМЦ. После посева на поверхность среды наносили раствор конго красного, который образует окрашенный комплекс с негидролизованной КМЦ, и легко вымывается из агарового слоя при отмывании 1М раствором поваренной соли.

Истинная целлюлозолитическая активность оценивалась по убыванию массы хроматографической бумаги после 45 суток культивирования исследуемых штаммов в колбах с МПБ и точной навеской целлюлозы.

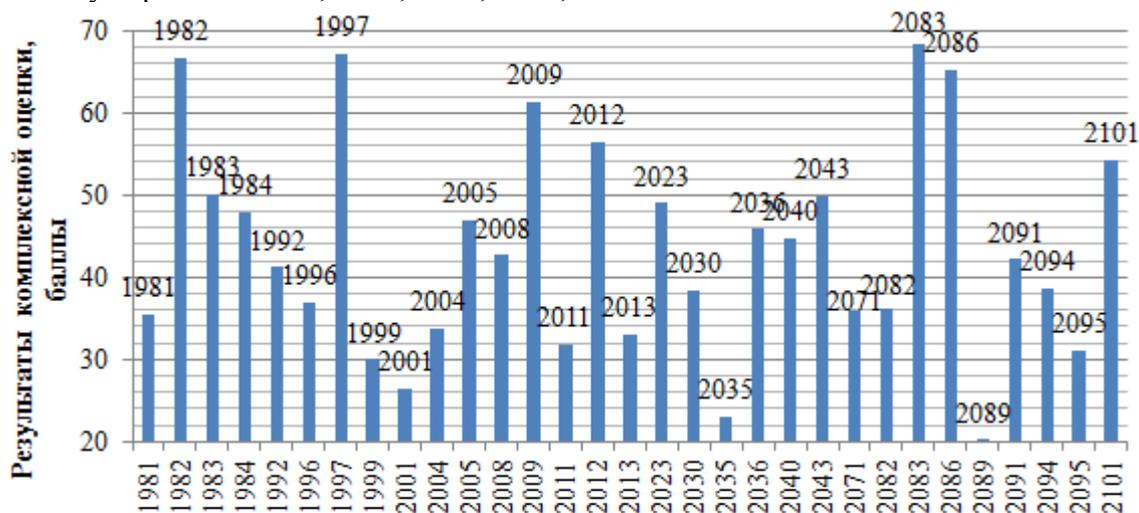
**Результаты исследований.** Исходя из данных, полученных в результате исследования гидролиза карбоксиметилцеллюлозы установлено, что абсолютно все исследуемые штаммы утилизируют карбоксиметилцеллюлозу. Наиболее активными оказались штаммы № 1992 (87,0 отн.ед.), 2005 (84,0 отн.ед.), 2030 (71,0 отн.ед.), 2082 (63,0 отн.ед.), 2043 (54,0 отн.ед.), 2094 (53,0 отн.ед.), 2013 (53,0 отн.ед.), 2071 (52,0 отн.ед.). Минимальную активность проявили штаммы № 1981 (10 отн.ед.), 2083 (12,0 отн.ед.), 2086 (14,0 отн.ед.), 2101 (16,0 отн.ед.), 2001 (52,0 отн.ед.). Оставшиеся культуры активность проявляют в пределах 20-50 относительных единиц.

Определение истинной целлюлазной активности на среде с хроматографической бумагой показало, что низкой активностью (0,1 – 1,1 отн. ед) обладали штаммы № 1992, 1996, 2004, 2005, 2008, 2082, 2086, 2091, 2094, 2101. Средняя активность (1,2-2,0 отн.ед) наблюдалась у штаммов № 1983, 2012, 2023. Активность свыше 2,0 относительных единиц характерна штаммам № 1982, 1984, 1997, 2009, 2083. Остальные штаммы не обладают способностью к гидролизу и утилизации нерастворимой целлюлозы.

**Выводы.** Все изученные штаммы способны к гидролизу карбоксиметилцеллюлозы. Способностью к гидролизу нерастворимой целлюлозы не обладают 13 штаммов. 7 из 31 штамма – штаммы с низкой (ниже 0,7 отн.ед.) активностью; 6 штаммов – со средними значениями целлюлазной активности (до 2,0 отн.ед.).

На основании проведенных исследований и комплексной оценки 31 штамма целлюлозолитических бактерий из коллекции микроорганизмов НПО Биотехсоюз, представленных данными рисунка 1, было установлено, что для дальнейших исследований, как промышленные агенты – продуценты целлюлозолитических ферментов могут быть рекомендованы несколько штаммов.

1. Штаммы первой степени активности: с высокой гидролазной активностью всех ферментов: № 1982; 1997, 2083, 2086 имеющие наибольшее количество баллов.
2. Штаммы второй степени активности: с высокой гидролазной активностью всех ферментов, но продуцирующие токсичные продукты: аммиак и индол: № 2009, 2012, 2101.
3. Штаммы третьей степени активности: с высокой гидролазной активностью всех ферментов, но продуцирующие токсичные продукты: аммиак и индол и сероводород из цистеина и тиосульфата: № 1983, 1984, 2005, 2023, 2043.



**Штаммы целлюлозолитических *Bacillus* sp. из коллекции НПО Биотехсоюз**

Рис. 1. Результаты комплексной оценки штаммов целлюлозолитических бактерий рода *Bacillus* из коллекции НПО Биотехсоюз. Количество баллов соответствует вероятности включения в дальнейшие промышленные исследования

В результате исследований было установлено, что для дальнейших исследований, как промышленные агенты – продуценты целлюлозолитических ферментов могут быть рекомендованы несколько штаммов: № 1982; 1997, 2083, 2086

### ОСОБЕННОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ГИБРИДОВ *PHALENOPSIS* ИЗ НЕЗРЕЛЫХ СЕМЯН В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

В.О. Климентова <sup>1</sup>, Е.В. Бучугина <sup>1</sup>, В.В. Назаров <sup>2</sup>, Л.А. Хасанова <sup>3</sup>

<sup>1</sup> обучающаяся кафедры ботаники, физиологии растений и биотехнологии факультета биологии и химии Таврической академии ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского»

<sup>2</sup> доцент, к.б.н. кафедры ботаники, физиологии растений и биотехнологий факультета биологии и химии Таврической академии ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского»

<sup>3</sup> профессор, д.б.н. кафедры биоэкологии и биологического образования естественно-географического факультета ФГБОУ ВО «Башкирский государственный педагогический университет им. М.Акмиллы»  
[vika.1298.1@mail.ru](mailto:vika.1298.1@mail.ru) , [yvn22222@mail.ru](mailto:yvn22222@mail.ru)

**Введение.** Среди оптовых продаж орхидей устойчивое первое место занимают многочисленные гибриды *Phalenopsis*. По данным интернет ресурса только за 2000 год в США было продано этих растений на сумму в 75 миллионов долларов [[https://ru.wikipedia.org/wiki/Селекция\\_фаленопсисов](https://ru.wikipedia.org/wiki/Селекция_фаленопсисов)]. Мировой ежегодный оборот

*Phalenopsis* не поддается точному учету, но несомненно, что он в настоящее время приближается к миллиарду. Несмотря на длительное изучение культуры *in vitro* у диких видов и гибридов *Phalenopsis* разработка более эффективных технологий производства этих растений по-прежнему чрезвычайно актуальна. Снижение расходов на 1% или ускорение роста и цветения может дать выигрыш в десятки миллионов долларов в мировом масштабе. Наиболее критичными и трудоемкими этапами технологии выращивания *Phalenopsis* являются получение протокормов в условиях *in vitro* и последующая их адаптация к естественным субстратам [Paek et al., 2011; Lesar et al., 2012].

**Цель и объект исследований.** Целью исследования был поиск наиболее эффективных методов получения протокормов в асептических условиях культуры *in vitro* и увеличения коэффициента размножения. В качестве модельного объекта исследования выбран гибрид *Phalenopsis* линии «*Pico fantasy*». Данное растение до начала исследований ежегодно цвело 3 раза подряд. Его розетка состояла из 10-11 листьев. На момент начала исследования в ноябре 2018 растение дало 2 хорошо развитых цветоноса с общей численностью в 18 цветков.

**Методика исследования.** Для посадки использовались незрелые коробочки. Опыление цветков проводили вручную при помощи пинцета и бинокулярной лупы с учетом биологических особенностей опыления видов *Phalenopsis* [Shin-Chang et al., 2015]. Коробочки срезались для посадки до их вскрытия спустя 60-90 дней с момента опыления цветков. Срезанные коробочки стерилизовались в 50% растворе гипохлорита натрия (белизна). Время стерилизации варьировало в пределах 30-50 минут в зависимости от состояния эпидермиса коробочек. Отмывка от стерилизанта производилась дистиллированной водой в стерильных условиях. Незрелые семена из вскрытых коробочек высаживались в чашки Петри на искусственную питательную среду. В качестве среды использовалась 1/2 среды Мурасиге и Скуга с концентрацией сахарозы 15 г/л. В последующем чашки Петри с незрелыми семенами выдерживались в термостате при +18-20°C в темноте до появления протокормов. Затем чашки Петри переносились в климатическую камеру, где содержались при +20°C с 8 часовым чередованием темной и освещенной фаз. После позеленения часть протокормов культивировалась в темноте при температуре +23-25 °C. Другая часть оставалась в климатической камере. Морфогенез у протокормов изучался под бинокулярным микроскопом Olympus SZX16 с увеличением от 400x до 700x. Для изучения особенностей динамики роста отбиралось по 25 протокормов в каждой изучаемой выборке. Они фотографировались цифровой фотокамерой микроскопа. Длина и ширина отобранных экземпляров измерялась с использованием графической программы Cell Science Olympus с точностью до 1 мк.

**Результаты исследований.** Установлено, что массовое появление протокормов на среде 1/2 МС-15 наблюдалось после 1,5 месяца их содержания в темноте от 60-ти дневных и через 20 дней от 90-то дневных коробочек. При переносе протокормов в освещенные условия первое позеленение у них наблюдалось уже в течение 1-2 дней. Бело-молочная окраска полностью исчезала примерно через 10 дней после начала освещения. Начало морфогенеза у протокормов от 90-то дневных коробочек наблюдалось уже после 30 дней культивирования в темноте.

У протокормов, культивируемых на свету, вначале наблюдался геммогенез. Он выражался в образовании листового валика в апикальной части. Первый настоящий лист образовывался через 1 месяц. Спустя еще месяц листовая пластинка достигала 5-6 мм в диаметре. К этому времени наблюдалось массовое образование первого настоящего корня. В его основании имелся густой ореол из эпидермальных волосков.

Иной ход морфогенеза наблюдался у протокормов, которые после светового периода культивирования, помещались обратно в темноту. У этих протокормов наблюдалось преобладание ризогенеза над геммогенезом. Через 1 месяц культивирования в темноте только у одной трети этих протокормов образовывались настоящие листья. Однако, они имели уже листовой валик до помещения в темные условия. У остальных происходила

массовая пролиферация. При этом отдельные экземпляры могли образовывать до 20 новых протокормов. Базальная часть у большинства протокормов в темноте сильно вытягивалась и была покрыта рядами длинных эпидермальных волосков. Коэффициент размножения в этом случае увеличивался в среднем до 5 за один месяц.

#### **Выводы.**

1. Незрелые семена гибрида *Phalenopsis* линии «*Pico fantasy*» от 90-ти дневных коробочек показали лучшие результаты прорастания, чем семена от 60-ти дневных.
2. Протокормы проявляли разную направленность морфогенеза в зависимости от условий культивирования *in vitro*. На свету преобладал геммогенез, а в темноте - ризогенез.
3. Содержание протокормов в темноте можно использовать в качестве эффективного приема для размножения гибрида *Phalenopsis* линии «*Pico fantasy*», так как коэффициент размножения увеличивался при этом в 5 раз в течение одного месяца.

*Работа выполнена в рамках реализации проекта программы развития ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского» на 2015 – 2024 годы: «Разработка новой междисциплинарной модульной магистерской программы «Биотехнология, биохимия и биоинформатика»».*

## ОСОБЕННОСТИ РЕПРОДУКТИВНОЙ БИОЛОГИИ И КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *IN VITRO CYNORKIS SEYCHELLARUM AVER.*

Е.В. Бучугина<sup>1</sup>, В.О. Климентова<sup>1</sup>, В.В. Назаров<sup>2</sup>

<sup>1</sup> обучающаяся кафедры ботаники, физиологии растений и биотехнологии факультета биологии и химии Таврической академии ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского»

<sup>2</sup> доцент, к.б.н. кафедры ботаники, физиологии растений и биотехнологий факультета биологии и химии Таврической академии ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского»  
[buchugina99@mail.ru](mailto:buchugina99@mail.ru), [vvv22222@mail.ru](mailto:vvv22222@mail.ru)

**Введение.** *Cynorkis seychellarum* Aver. - представитель семейства Orchidaceae из трибы Orchideae произрастающий на Сейшельских островах. В эту же трибу входят такие известные представители орхидной флоры из умеренных широт северного полушария, как виды из родов *Orchis*, *Ophrys*, *Dactylorhiza* и др. Виды *Cynorkis* обнаруживает значительное сходство по многим аспектам репродуктивной биологии с перечисленными европейскими родами. Прежде всего это сходство между ними выражено в строении цветка, поллиниариев, механизме опыления цветка, продолжительности созревания семян и их строении. *Cynorkis seychellarum* является корнеклубневым видом с двумя зелеными линейно-ланцетными листьями. Это орхидное ведет наземный образ жизни. Отличительной особенностью репродуктивной биологии цветка у *C. seychellarum* является его способность к самоопылению в нераскрытых бутонах [Назаров, Широков, 2014]. Ещё одна интересная особенность репродуктивной биологии связана с историей открытия этого орхидного. Оно было случайно завезено в виде покоящихся клубней с коллекцией других видов орхидных, собранных в ходе научной экспедиции на Сейшельские острова в 1981 году. В последствии она выросла и зацвела среди других орхидных фондовой коллекции БИН РАН и была описана в качестве нового вида [Аверьянов, 1983].

**Цель и объект исследований.** Целью исследования стало изучение некоторых важных особенностей репродуктивной биологии *Cynorkis seychellarum*: цветения, опыления, плодоношения, прорастания семян в условиях *in vitro*.

**Методика исследования.** Морфология цветков и протокормов изучались под бинокулярным микроскопом Olympus SZX16 при увеличении от 50x до 700x. Для изучения морфологии семян использовался инвертированный микроскоп Olympus SC53 при

увеличении от 400х. Изучаемые объекты фотографировались цифровой 5 мегапиксельной CMOS-фотокамерой. Динамика развития коробочек изучалась по фотоснимкам, сделанным при помощи цифровой фотокамеры Nikon D-200 с макрообъективом AF-S 60 mm 1:2,8 G. Снимки коробочек производили вместе со специальной миллиметровой шкалой на прозрачной пленке. Для определения размеров и площади листовых пластинок листья срезались на уровне почвы, наклеивались скотчем на бумагу и сканировались при разрешении 600 dpi вместе с миллиметровой шкалой. Все измерения морфологических параметров изучались на фотографиях с использованием графической программы Cell Science Olympus. Точность измерения по снимкам, сделанным на микроскопах составила 1 мк, а на фотоаппарате и сканере - 0,1 мм.

**Результаты исследований.** Изученные растения *Cynorkis seychellarum* были получены из коллекции БИН РАН в 2014 году в виде ювенильных особей с одним листом от 10 до 15 мм длины. Все растения имели схожий генотип, так как они были получены от одного растения в результате самоопыления. Поэтому они были идеальными объектами для проверки влияния различных условий культивирования на реализацию генотипа в фенотип. Ранее было установлено, что скорость роста у *C. seychellarum* зависит от соседства с другими видами орхидных [Назаров, Широков, 2014]. Поэтому полученные ювенильные растения были высажены в горшки со следующими видами: *Bletilla striata* (Thunb.) Rchb.f., *Doritis pulcherrima* Lindley и гибридам *Paphiopedilum*. Наиболее быстрое развитие *C. seychellarum* наблюдалось в горшках с *Paphiopedilum*. Здесь переход от однолистных ювенильных растений к генеративным двухлиственным наблюдался в течении одного года. В первый год цветения на соцветии образовывался обычно только один цветок в завязи у которого закладывалось в среднем 3100 (1700-3600) семян. На следующий год на генеративных особях *C. seychellarum* в горшках с *Paphiopedilum* уже образовалось от 2 до 4 цветка (в среднем 2,6). В каждой завязи в среднем имелось по 7400 (5100-9300) семян. В горшках с *Bletilla striata* ювенильные особи *C. seychellarum* зацветали только на второй или третий год. Первые цветки в завязях здесь содержали меньше семян (1200-2900,  $x=2250$ ). Интересно, что после первого плодоношения генеративные экземпляры *C. seychellarum* больше не появились над поверхностью почвы в последующие 2 года наблюдений. Измерения площади листьев у генеративных особей показало, что при увеличении числа плодов и семян на побеге листовой индекс снижается на 18%. Это выражалось прежде всего в уменьшении длины листьев.

Наблюдения за развитием опыленных цветков *C. seychellarum* показало, что на момент его раскрытия на обоих долях рыльца всегда имеются от 5 до 20 массул. Массулы выпадают на рыльце из карманов пыльника при малейшем сотрясении цветка. После опыления увеличение длины и ширины завязей происходит по параболической линии. Прирост размеров постепенно уменьшается и останавливается на 17-18 день после раскрытия цветка. Коробочка начинает вскрываться в верхней части по швам на 20-21 день. Полное её раскрытие длится 3-4 дня, что способствует постепенному рассеиванию семян. Процент абортированных семян в коробочка не превышал 0,5%.

При выращивании семян на среде 1/2 МС-15 массовое прорастание наблюдалось спустя 1 месяц после их высадки. После образования в апикальной части листового валика часть протокормов была подсажена к протокормам *Phalenopsis* линии «*Pico fantasy*» и гибридам *Paphiopedilum*, которые выращивались на питательной среде того же состава.

#### **Выводы.**

1. Скорость перехода из ювенильного состояния к генеративному у *Cynorkis seychellarum* сильно зависела от присутствия в горшках других видов орхидных. В присутствии гибридов *Paphiopedilum* наблюдалось существенное ускорение индивидуального развития.

2. Интенсивное плодоношение существенно снижало индекс листовой поверхности у *Cynorkis seychellarum* в благоприятных условиях. При неблагоприятных условиях

произрастания генеративные особи могли уходить во вторичный покой или полностью отмирать.

3. Подсадка протокормов *Synorkis seychellarum* к протокормам *Paphiopedilum* и *Phalenopsis* в культуре *in vitro* взаимно ускоряла протекание морфогенеза протокормов обоих орхидных.

*Работа выполнена в рамках реализации проекта программы развития ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского» на 2015 – 2024 годы: «Разработка новой междисциплинарной модульной магистерской программы «Биотехнология, биохимия и биоинформатика»».*

## ВЛИЯНИЕ МУЖСКОГО ГАМЕТОФИТА НА МОРФОГЕНЕЗ СПОРОФИТА У ГИБРИДА *PHALENOPSIS* В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

А.О. Матяш<sup>1</sup>, В.В. Назаров<sup>2</sup>, Л.А. Хасанова<sup>3</sup>

<sup>1</sup> обучающийся кафедры биоэкологии и биологического образования естественно-географического факультета ФГБОУ ВО «Башкирский государственный педагогический университет им. М.Акмиллы»

<sup>2</sup> доцент, к.б.н. кафедры ботаники, физиологии растений и биотехнологий факультета биологии и химии Таврической академии ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского»

<sup>3</sup> профессор, д.б.н. кафедры биоэкологии и биологического образования естественно-географического факультета ФГБОУ ВО «Башкирский государственный педагогический университет им. М.Акмиллы»

ullman008@gmail.com, vvn22222@mail.ru

**Введение.** Традиционно считается, что продолжительность жизни мужского гаметофита неуклонно уменьшается в ходе эволюции покрытосемянных растений [Уранов, Комарницкий, Кудряшов, 1975]. Орхидные, которые согласно А.Л.Тахтаджяну [1966] являют собой вершину энтомофильной линии эволюции покрытосемянных растений, резко выделяются из этой общей закономерности. Особенно это выражено у тропических орхидных. По данным электронного ресурса «Duration of seed ripening in orchids» [[http://www.r-b-o.eu/cgi-bin/RBO/seed\\_ripening/display.pl](http://www.r-b-o.eu/cgi-bin/RBO/seed_ripening/display.pl)] продолжительность созревания коробочки у этих растений составляет в среднем 175 дней, а у таких видов как *Encyclia* и *Stanhopea* длится более года. Хорошо известно, что к моменту раскрытия цветка у большинства тропических орхидных в завязи отсутствуют нормально развитые семязачатки. У некоторых из них к этому времени даже не образуются плацентарные тяжи. Развитие всех этих структур спорофита начинается только после опыления и прорастания пыльцевых трубок. Дальнейшее развитие происходит под воздействием мужского гаметофита. Этот сложный процесс изучен в настоящее время фрагментарно. Только отдельные аспекты биохимического и физиологического влияния мужского гаметофита на процессы изменения в цветке и завязи изучены экспериментально [Arditti, Brigitta, 1974; Chen, Fang, 2015; Zheng, 2019]. Данная экспериментальная работа в первые направлена на изучение влияния мужского гаметофита на дочерние спорофиты.

**Цель и объект исследований.** Целью данного исследования явилось экспериментальное изучение влияния мужских гаметофитов (пыльцевых трубок) на рост и развитие дочерних спорофитов (зародышей и протокормов) в условиях культуры *in vitro*. В качестве объекта исследований был выбран гибрид *Phalenopsis* линии «Pico fantasy».

**Методика исследования.** У трех цветков гибрида *Phalenopsis* линии «Pico fantasy» было произведено стартовое опыление с целью получения эксплантов в виде пыльцевых трубок и незрелых зародышей. Полученные экспланты высаживались на искусственную

питательную среду на различных стадиях развития. В качестве среды использовали 1/2 среды Мурасиге и Скуга с концентрацией сахарозы 15 г/л. Мужские гаметофиты и дочерние спорофиты высаживались в асептических условиях в пластиковые чашки Петри диаметром 90 мм. Это позволяло вести визуальный контроль за ростом и взаимодействием обоих типов эксплантов в ходе всего эксперимента без вскрытия чашек и делать снимки изучаемых объектов в хорошем качестве при высоком увеличении микроскопа. Контроль за ростом осуществляли при помощи бинокулярного микроскопа Olympus SZX16 (900-1100x). Измерения мужских гаметофитов и дочерних спорофитов выполняли на фотографиях в графической программе Cell Science Olympus с точностью до 0,5 мк.

**Результаты исследований.** Изучена динамика роста зародышей и протокормов *Phalenopsis* линии «*Pico fantasy*» в присутствии и отсутствии родительских пыльцевых трубок на искусственной питательной среде в асептических условиях *in vitro*. Исследования производили у коробочек в разной стадии развития - 30, 60 и 90 дневных с момента опыления. Результаты показали, что наиболее благоприятной стадией для взятия эксплантов мужского гаметофита и дочернего спорофита для культуры *in vitro* у *Phalenopsis* линии «*Pico fantasy*» являются коробочки в 90-то дневного возраста.

Были высажены зародыши незрелых семян и пыльцевые трубки на питательную среду, как по отдельности, так и вместе. Морфологический анализ не выявил достоверных различий в морфогенезе и скорости роста между протокормами, растущими отдельно от пыльцевых трубок и совместно с последними. Интересно отметить, что протокормы, которые были помещены в висячем положении на пыльцевые трубки, не подвергались некротическим изменениям, в то время как более 20% протокормов, лежащих непосредственно в питательной среде, чернели и отмирали после 30 дней культивирования. Это наблюдение позволяет сделать вывод о важной трофической роли мужского гаметофита в эмбриогенезе семян внутри плода у *Phalenopsis*.

#### **Выводы.**

1. Отдельные мужские гаметофиты в виде пыльцевых трубок остаются в жизнеспособном состоянии внутри плода у гибридов *Phalenopsis* спустя 30-40 дней после массового оплодотворения.
2. Эксперименты в условиях культуры выявили трофическую роль мужского гаметофита в эмбриогенезе незрелых семян и протокормов.
3. Мужские гаметофиты, не принявшие участие в оплодотворении могут также играть существенную роль в трофическом питании развивающихся семян внутри плода.

. Работа выполнена в рамках реализации проекта программы развития ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского» на 2015 – 2024 годы: «Разработка новой междисциплинарной модульной магистерской программы «Биотехнология, биохимия и биоинформатика»».

## **АЛФАВИТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ**

### **А**

Арободжиева М.Р

### **Г**

Гоц Я.И.

### **Н**

Назаров В.В.

### **Б**

Бугара И.А.

### **К**

Климентова В.О.

### **П**

Похилец А.С.

Бучугина Е.В.

### **М**

Матяш А.О.

Пехименко Г.В.

**Р**

Решетник Г.В.  
Романова Д.А.

**Х**

Хасанова Л.А.  
Хачатурян Д.М.

**Ш**

Шведова Л.О.

**С**

Серов А.В.  
Сидякин А.И.