

На правах рукописи



Ухатова Юлия Васильевна

Совершенствование методов криоконсервации и оздоровления от вирусных
болезней образцов вегетативно размножаемых культур

06.01.05 – Селекция и семеноводство сельскохозяйственных растений

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2017

Работа выполнена в отделе биотехнологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова».

Научный руководитель:

Татьяна Андреевна Гавриленко,
доктор биологических наук,
зав. отделом биотехнологии
Федерального государственного бюджетного научного
учреждения «Федеральный исследовательский центр
Всероссийский институт генетических ресурсов растений
им. Н.И. Вавилова»

Официальные оппоненты:

Атрощенко Геннадий Парфенович,
доктор сельскохозяйственных наук,
профессор кафедры
плодоовощеводства и декоративного садоводства
Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования
«Санкт-Петербургский Государственный
Аграрный университет»

Бьядовский Игорь Александрович,
кандидат сельскохозяйственных наук,
старший научный сотрудник отдела
биотехнологии и защиты растений
Федерального государственного бюджетного
научного учреждения «Всероссийский
селекционно-технологический институт
садоводства и питомниководства»

Ведущая организация:

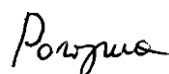
Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт
картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха»

Защита состоится 20 декабря 2017 г. в 14–00 часов на заседании диссертационного совета Д 006.041.02. при Всероссийском институте генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова по адресу 190000, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, д. 44.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова и на сайте института:
<http://www.vir.nw.ru/>

Автореферат разослан «__» _____ 2017 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук



Е.В. Рогозина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Ряд вегетативно размножаемых культур имеет важное экономическое значение. Среди них – картофель и ягодные культуры – малина, ежевика. Так, по данным ФАО (FAOSTAT, 2014), Российская Федерация является ведущей страной в мире по производству свежих ягод малины и занимает третье место по объему производства картофеля. Современная селекция этих культур базируется на эффективном использовании генофонда культурных и родственных дикорастущих видов, являющихся основой для создания новых высокоурожайных сортов, устойчивых к биотическим и абиотическим стрессорам. Поэтому надежное сохранение генетических ресурсов этих важнейших вегетативно размножаемых культур имеет первостепенное значение для развития отечественной селекции.

Полевые коллекции вегетативно размножаемых культурных растений – наиболее уязвимы, сильно поражаются вирусами и другими патогенами; образцы этих коллекций невозможно сохранять семенами. Для надежного хранения генофонда сортов, гибридов и селекционных клонов наряду с полевыми коллекциями создаются дублетные *in vitro* и криоколлекции, позволяющие сохранять оздоровленные от патогенов образцы вегетативно размножаемых культур в контролируемых условиях среды (IPGRI/FAO, 1998; Гавриленко и др. 2007; Reed, 2008, 2013; Дунаева и др. 2012; ФАО, 2014; Panis et al. 2016; Bamberg et al. 2016; Носов и др. 2017). Криоколлекции малины и ежевики создаются в генбанках: NCGR, США (210 сортов и клонов диких видов); MTT ARF, Финляндия (37 образцов); IPBB, Казахстан (30 образцов). Криоколлекции картофеля сохраняются в генбанках: IPK, Германия (1428 селекционных сортов), CIP, Перу (1028 аборигенных сортов), USPG, США (280 селекционных сортов); ВИР, Россия (160 аборигенных сортов); CAES, Япония (100 образцов). Несмотря на то, что для малины, ежевики и картофеля накоплен большой объем экспериментальных данных в области оздоровления растений от вирусных инфекций, клонального микроразмножения и криоконсервации, эти методы нуждаются в дальнейшем совершенствовании с целью повышения их эффективности, расширения возможностей их использования для генетически разнообразного материала, сокращения длительности протоколов, а также снижения стоимости работ при создании больших криоколлекций.

Разработка новых технологий и совершенствование существующих методов оздоровления растений от вирусных инфекций и клонального микроразмножения важны и для развития современного семеноводства вегетативно размножаемых культур, которое основано на производстве высококачественного безвирусного посадочного материала.

Целью работы являлось совершенствование методов криоконсервации и оздоровления от вирусных болезней образцов малины, ежевики, картофеля из *in vitro* коллекции ВИР для долгосрочного сохранения вегетативно размножаемых культур в контролируемых условиях.

В соответствии с этой целью были поставлены следующие **задачи**:

1. Изучить способность к «эффективному микроразмножению» селекционных сортов и образцов культурных и дикорастущих видов малины и ежевики из *in vitro* коллекции ВИР. Отобрать генотипы с высокими показателями коэффициентов клонального микроразмножения для последующего их использования в экспериментах по криоконсервации.

2. Оптимизировать метод капель-витрификации (DV) для криоконсервации образцов малины – определить оптимальные тип экспланта и продолжительность обработки эксплантов раствором криопротекторов.

3. Определить способность к посткриогенному восстановлению у сортов малины и ежевики из *in vitro* коллекции ВИР с использованием оптимизированного протокола «DV-biotech».

4. Оценить регенерационную способность после замораживания-оттаивания у образцов различных культурных видов картофеля из *in vitro* коллекции ВИР с использованием протокола «DV-biotech».

5. Оценить эффективность оздоровления микрорастений малины от вируса RBDV с использованием различных методов антивирусной терапии: химиотерапии, комплексной термо-химиотерапии, а также криотерапии на основе оптимизированного протокола «DV-biotech».

6. Изучить эффективность оздоровления микрорастений картофеля от вируса PLRV с использованием методов комплексной термо-химиотерапии и криотерапии на основе протокола «DV-biotech».

Научная новизна и практическая значимость работы:

1. Разработан оптимизированный протокол дроблет-витрификации «DV-biotech» для криоконсервации образцов малины и ежевики, позволяющий получить высокие показатели посткриогенной регенерации эксплантов; определены оптимальные тип экспланта и продолжительность обработки раствором криопротекторов.

2. Впервые в одной работе проведены исследования по оптимизации и апробации метода криоконсервации на основе дроблет-витрификации для различных вегетативно размножаемых культур (малина, ежевика, картофель); для каждой культуры были использованы представительные выборки образцов.

3. Предложен усовершенствованный регламент закладки на длительное хранение в криобанке ВИР коллекционных образцов вегетативно размножаемых культур на примере малины, ежевики и картофеля с использованием протокола «DV-biotech».

4. Впервые на одном и том же материале (образец, генотип, клон) проведено сравнение эффективности разных методов антивирусной терапии, включающих метод комплексной термо-химиотерапии, используемый в ведущих генбанках, и метод криотерапии, основанный на оптимизированном протоколе дроблет-витрификации. Для криотерапии в отношении PLRV метод дроблет-витрификации был применен впервые.

5. Рекомендованы усовершенствованные методы для практического использования в программах по оздоровлению образцов малины от RBDV и картофеля от PLRV. Получены оздоровленные от вируса RBDV клоны *in vitro* растений малины на основе метода комплексной термо-химиотерапии. Получены оздоровленные от вируса PLRV микрорастения картофеля с использованием метода криотерапии на основе протокола «DV-biotech», а также метода комплексной термо-химиотерапии.

Практическое применение полученных результатов перспективно для дальнейшего расширения криоколлекций.

Апробация результатов работы. Результаты работы были представлены на международных и всероссийских конференциях, в том числе: Международной научной конференции «Генетические ресурсы растений – основа продовольственной безопасности и повышения качества жизни» (Санкт-Петербург, 2014); Международной научно-практической конференции «Методы и технологии в селекции растений и растениеводстве» (Киров, 2015); Международной научно-практической конференции «Развитие новых технологий селекции и создание отечественного конкурентоспособного семенного фонда картофеля» (Коренево, 2016); Выставке-конференции «Биоиндустрия 2016» (Санкт-Петербург, 2016); Международной научно-практической конференции «Пути повышения эффективности садоводства» (Республика Крым, 2017).

По материалам диссертации опубликованы 6 научных статей в изданиях, рекомендованных ВАК, и 16 тезисов.

Личный вклад автора. Основные результаты, изложенные в диссертации, получены автором самостоятельно в отделе биотехнологии ВИР. Непосредственное участие автор принимал на всех этапах исследований, в обработке и анализе полученных данных, подготовке публикаций. Детекция вирусов у микрорастений проведена совместно с к. б. н., в. н. с. отдела биотехнологии ВИР Антоновой О.Ю. Криоконсервация 10 селекционных сортов картофеля проведена совместно с лаборантом-исследователем Волковой Н.Н.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов, заключения, выводов, списка сокращений, списка литературы и одного приложения. Работа изложена на 137 страницах, содержит 18 таблиц и 13 рисунков. Список литературы включает 327 источников, из них 210 на иностранных языках.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность научному руководителю д.б.н. Т.А. Гавриленко за всестороннюю помощь и советы на всех этапах работы. Искреннюю благодарность за помощь на разных этапах работы автор адресует сотрудникам отдела биотехнологии ВИР: к.б.н. С.Е. Дунаевой, к.б.н. О.Ю. Антоновой, к.б.н. Г.И. Пендинен, к.б.н. О.В. Апаликовой, лаб.-иссл. Н.Н. Волковой, лаб.-иссл. М.М. Черепко, лаб.-иссл. Л. Е. Шуваловой. За помощь в статистической обработке данных автор благодарит к.т.н. Л.Ю. Новикову. Отдельная благодарность адресована членам семьи.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Растительный материал включал 142 образца малины, ежевики и картофеля из *in vitro* коллекции ВИР. Каждый образец в *in vitro* коллекции представлен одним генотипом (клоном). Микрорастения 47 сортов малины обыкновенной (*Rubus idaeus*), 20 сортов ежевики (подрод *Rubus*) и четырех образцов дикорастущих видов рода *Rubus* (*R. axillaris*, *R. illecebrosus*, *R. parvifolius*, *R. pyramidalis*) были использованы в экспериментах по микроразмножению, криоконсервации и оздоровлению от вирусных инфекций. Микрорастения 55 образцов 5 культурных видов картофеля (*S. chilotanum* (= *S. tuberosum* ssp. *tuberosum*), *S. andigenum* (= *S. tuberosum* ssp. *andigenum*), *S. stenotomum*, *S. phureja*, *S. chaucha*, *S. juzepczukii*) послужили источниками эксплантов для экспериментов по криоконсервации и оздоровлению. *In vitro* растения 20 селекционных сортов картофеля были получены из коллекции Банка здоровых семян картофеля ВНИИКХ им. А.Г. Лорха.

Методы исследования

В настоящей работе использовали общепринятые методы культуры *in vitro* с небольшими модификациями, разработанными для представителей рода *Rubus* (Reed, 1990; Дунаева и др., 2011) и *Solanum* (Трускинов, 1987; Дунаева и др., 2011).

1. Оценка способности к «эффективному клональному микроразмножению» коллекционных образцов малины и ежевики проведена в соответствии со схемой В.-М. Reed (1990). В качестве эксплантов использовали одноузловые черенки микрорастений, по 15 на генотип для каждой повторности. Через шесть недель культивирования на питательной среде №1 (Мурасиге и Скуга (МС) + 1 мг/л бензоаминопурина (БАП) + 0,1 мг/л индолил-масляной кислоты (ИМК)) подсчитывали коэффициент микроразмножения (КМР) эксплантов. «Эффективным клональным микроразмножением», согласно В.-М. Reed (1990), считали образование в течение шести недель из одного исходного экспланта как минимум трех новых побегов ($КМР \geq 3$), на каждом из которых сформировалось не менее двух почек (рис. 1).

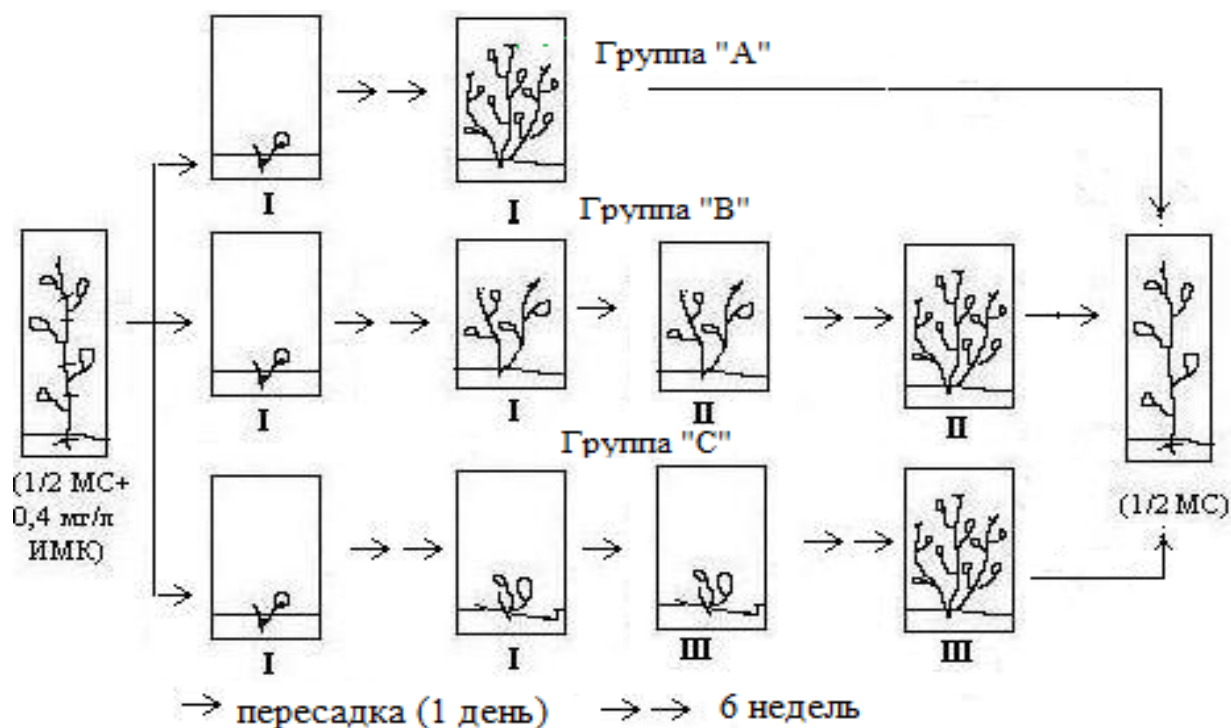


Рисунок 1 – Схема опыта по оценке способности образцов к «эффективному клональному микроразмножению»

Образцы со значениями $KMP \geq 3$ после 6-недельного культивирования на питательной среде №I были отнесены к группе «А», в дальнейшем микрорастения этих образцов переносили на среду $\frac{1}{2}$ МС без гормонов для среднесрочного *in vitro* хранения. Образцы, экспланты которых имели низкие значения $KMP (<3)$ к концу шестой недели культивирования на питательной среде №I, разделялись на две группы – «В» и «С»:

- в группу «В» включали образцы с хорошо развитыми зелеными микропобегами, для «эффективного микроразмножения» их переносили на питательную среду №II (МС + 1 мг/л БАП + 0,1 мг/л ИМК + 0,1 мг/л гиббереллина (ГК));
- в группу «С» относили образцы с ослабленными бледно-зелеными микропобегами, которые переносили на питательную среду №III (Андерсона + 1 мг/л БАП + 0,1 мг/л ИМК) для достижения более высоких значений KMP .

Микропобеги образцов из групп «В» и «С» культивировали дополнительные шесть недель на питательных средах №II и №III соответственно (рис. 1). В конце этого срока вновь учитывали показатели KMP , после чего микрорастения переносили на среду $\frac{1}{2}$ МС без гормонов (Немцова и др., 2009; Дунаева и др., 2011).

2. Для экспериментов по **криоконсервации** почек микрорастений использовали оригинальный метод **дроplet-витрификации (DV)**, разработанный В. Panis et al. (2005), с учетом модификаций (Дунаева и др., 2011). Оптимизированный для малины и ежевики в рамках настоящей работы протокол «DV-biotech» (Ухатова и др., 2017; Ukhatova et al., 2017) включал следующие этапы (табл. 1).

Эффективность криоконсервации для каждого образца оценивали на 8 неделе после замораживания-оттаивания по показателям: (1) жизнеспособности эксплантов (число, % зеленых почек на питательной среде МСТо; параллельно учитывался и процент некротизировавшихся эксплантов); (2) регенерационной способности (число, % эксплантов, сформировавших микропобеги). Криоконсервация каждого образца выполнена в трех повторностях. В качестве контроля в каждой повторности использовано 10 эксплантов на образец, которые проходили этапы 1, 2, 3, 5 и 6, без этапа 4 (погружение в жидкий азот) (см. табл. 1).

Таблица 1 – Основные этапы модифицированного метода капель-витрификации – «DV- biotech», использованного для криоконсервации представителей родов *Rubus* и *Solanum*

№	Этап	Условия опыта	
		Сорта малины и ежевики	Образцы картофеля
1	Подготовка растительного материала	Культивирование микрорастений на питательной среде МС с 0,5 мг/л БАП, 0,05 мг/л ИМК и 3% сахарозой (Wang et al., 2005), при 22°C с 16-часовым фотопериодом 4–6 недель.	Культивирование микрорастений на питательной среде МС без фитогормонов с 3% сахарозой (Дунаева и др., 2011) при 22°C с 16-часовым фотопериодом три недели.
2	Изоляция почек	Экспланты (верхушечные почки и пазушные почки верхних ярусов размером 1,1-1,8 мм) помещали в жидкую среду МС с 3% сахарозой без гормонов на 1 час	
3	Обработка эксплантов растворами с криопротекторами	Экспланты помещали в чашки Петри с раствором LS (МС с добавлением 2 М глицерола и 0,4 М сахарозы, Matsumoto et al., 1994) на 20 минут при 20°C на свету ; затем – с раствором PVS2 (МС с добавлением 3,26 М глицерола, 2,42 М этиленгликоля, 1,9 М диметил сульфоксида и 0,4 М сахарозы, Sakai et al., 1990) на 30 минут при 0°C на свету . За последние минуты обработки раствором PVS2 экспланты помещали в индивидуальные капли того же раствора, нанесенные на полоски фольги.	
4	Криоконсервация/погружение в жидкий азот	Быстрое погружение полосок алюминиевой фольги с эксплантами в криопробирки с жидким азотом в сосуд Дьюара на разные сроки в зависимости от целей: на 1 час – для оценки посткриогенной регенерации, на долгосрочное криохраниение в криобанке ВИР – для пополнения криоколлекции. Контрольные экспланты не замораживали.	
5	Оттаивание	Для оценки посткриогенной регенерации полоски фольги с эксплантами из криопробирок с жидким азотом переносили в раствор RS (МС с добавлением 1,2 М сахарозы, Sakai, 1997) на 15 минут при 20°C на свету . Контрольные экспланты помещали в раствор RS прямо из PVS2.	
6	Учет регенерационной способности	Экспланты помещали на агаризованную питательную среду МСТо с 3% сахарозой, дополненную 0,5 мг/л зеатин-рибозида, 0,5 мг/л ИУК и 0,2 мг/л ГК (Towill, 1983), культивировали при 22°C с 16-часовым фотопериодом. Процент выживших и регенерировавших эксплантов отмечали на третьей, шестой и восьмой неделе после оттаивания.	

Для оценки регенерационной способности образца после криоконсервации в каждой повторности было изолировано по 20 эксплантов, которые проходили все этапы (1 – 6) данного протокола. Одновременно в каждой повторности изолировали дополнительные 30 эксплантов для закладки их на длительное криохраниение в биокриокомплексе ВИР, т. е. данные 30 эксплантов проходили только этапы 1 – 4, без этапов 5 и 6 (см. табл. 1). Таким образом, для одной повторности опыта было изолировано по 60 эксплантов.

3. Оздоровление микрорастений малины и картофеля от вирусов

Для детекции вирусных инфекций в исходных и полученных после антивирусной терапии микрорастениях применяли методы иммуноферментного анализа (ИФА) и полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР).

Метод ИФА. Детекцию вируса кустистой карликовости малины (RBDV) и вируса скручивания листьев картофеля (PLRV) проводили методом ИФА с использованием набора реактивов фирмы Agdia, включавшего позитивный и негативный контроли. Для

тестирования использовали листья растений из полевых и *in vitro* коллекций. Растительный материал растирали в жидком азоте, добавляли лизирующий буфер и далее следовали протоколу, рекомендованному фирмой-изготовителем. По результатам ИФА был проведен отбор зараженных RBDV и PLRV пробирочных растений, каждое из которых маркировали и размножали черенкованием для проведения опытов по оздоровлению, оставляя нижнюю часть микрорастений для выделения из них РНК с целью последующего использования полученных препаратов РНК в качестве положительных контролей.

Метод ОТ-ПЦР. Выделение РНК. Тотальную РНК выделяли из нижних листьев развитых пробирочных растений. Выделение РНК малины проводили, используя набор «Реагент ExtractRNA, #BC032» фирмы Евrogen (<http://www.evrogen.ru/>). Тотальную РНК картофеля выделяли при помощи коммерческого набора «Выделение тотальной РНК на магнитных частицах, покрытых SiO₂» фирмы Силекс М (<http://sileks.com/>). **Синтез кДНК.** Синтез первой нити кДНК проводили в 25 мкл реакционной смеси состава: 2 мкл РНК, 1 × реакционный буфер, 400 мкМ dNTP's, 0,5 мкг смеси случайных гексапраймеров, 1 ед/мкл РНКазина, 4 ед/мкл обратной транскриптазы М-MLV-ОТ. Для отжига гексануклеотидных праймеров инкубировали смесь в течение 10 мин при 25°C и затем при температуре 37°C в течение 60 минут. **Проведение ПЦР.** Для тестирования микрорастений малины на присутствие RBDV использовали праймеры, специфичные к последовательностям генома данного вируса (Немцова, 2009). Для тестирования микрорастений картофеля на присутствие PLRV использовали праймеры, специфичные к последовательностям генома этого вируса (Singh, 1999). Контролем эффективности синтеза матрицы служила реакция с праймерами, специфичными к последовательности гена белка тубулина (Nicot et al., 2005). В качестве позитивных контролей использовали РНК исходных микрорастений каждого клона с детектированным ранее вирусом. В качестве негативного контроля брали воду. **Электрофорез.** ПЦР-продукты разделяли при помощи электрофореза в 2,5 % агарозных гелях с окраской бромистым этидием и визуализацией фрагментов ДНК в УФ свете.

Для проведения работ по **оздоровлению образцов** клоны из полевых коллекций с детектированными вирусами были введены в культуру *in vitro* в виде апексов крупного размера. После введения выбранных клонов в стерильные условия процедуру тестирования повторяли и микрорастения малины и картофеля, содержащие вирус, включали в программу по оздоровлению.

Оздоровление микрорастений малины от RBDV проводили в трех вариантах опытов: А – криотерапии, Б – химиотерапии, В – комплексной терапии (совместное действие термо- и химиотерапии). Для **криотерапии** микрорастений малины был использован модифицированный метод «DV-biotech» (табл. 1). При этом в качестве эксплантов изолировали только верхушечные почки. **Химиотерапию** выполняли согласно Антоновой и др. (2015), культивируя верхние части побегов микрорастений на питательной среде (½МС + 0,1 мг/л ИМК + 0,1 мг/л ГК) в трех пассажах на свежих средах того же состава. **Комплексную термо-химиотерапию** выполняли согласно Антоновой и др. (2015), культивируя верхние части побегов микрорастений на питательной среде (½МС + 0,1 мг/л ИМК + 0,1 мг/л ГК) с рибавирином (30 мг/л) в течение 4 недель при постоянной повышенной температуре (35°C) в камере Barnsted (фотопериод – 16/8 часов). Всего при комплексной терапии было проведено два цикла термообработки и три цикла химиотерапии рибавирином. Прошедшие оздоровление микрорастения помещали на питательную среду без противовирусных реагентов и через 3 месяца анализировали на присутствие RBDV методом ИФА.

Оздоровление микрорастений картофеля от PLRV проводили в двух вариантах: криотерапии и комплексной термо-химиотерапии.

Для **криотерапии** микрорастений картофеля использовали модифицированный метод «DV-biotech» (табл. 1), в качестве эксплантов изолировали только верхушечные почки. Для **комплексной термо-химиотерапии** использовали схему оздоровления микрорастений картофеля от вирусов, разработанную в отделе биотехнологии ВИР (Антонова и др., 2017). Комплексная терапия включала три этапа продолжительностью 4 недели каждый, в течение которых микрорастения выдерживали на питательной среде МС без гормонов с добавлением рибавирина (30 мг/л) при повышенной температуре (37°C), после чего пробирочные растения переносили на свежую среду того же состава и культивировали их при 26°C в течение одного месяца. Прошедшие оздоровление микрорастения помещали на питательную среду без рибавирина и через 3 месяца анализировали их на присутствие PLRV методом ОТ-ПЦР.

4. Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью методов вариационной статистики (t-критерий Стьюдента, χ -квадрат, метод ϕ (Фишера)), компьютерной программы StatSoft STATISTICA 6.0. Опыты проводили в трехкратной повторности.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Изучение способности к «эффективному клональному микроразмножению» образцов малины и ежевики из *in vitro* коллекции ВИР

В таблице 3 представлены результаты оценки коэффициентов микроразмножения (КМР) у образцов малины и ежевики из *in vitro* коллекции ВИР. В целом 45 (25 образцов малины и 20 образцов ежевики) из 65 (69%) образцов были отнесены к группе «А», эти образцы проявили способность к «эффективному клональному микроразмножению» уже к концу 6 недели культивирования на питательной среде №I (табл. 2). Оставшиеся 20 (31%) образцов в тех же условиях на среде №I имели низкие значения КМР. Для этих 20 образцов удалось достичь значений $\text{КМР} \geq 3$ после дополнительного 6-недельного культивирования микрорастений на питательных средах: №II – для 7 образцов группы «В» и №III – для 13 образцов группы «С» (см. табл. 2).

На основании полученных результатов выборка из 65 образцов была структурирована на три группы «А», «В» и «С» по способности к микроразмножению. Состав образцов в этих группах в разных повторностях опыта достоверно совпадал согласно критерию $\chi^2(0,68 < 5,99, p < 0,05)$ и коэффициенту ранговой корреляции Спирмена ($r_s = 0,77, p < 0,01$). Результаты однофакторного дисперсионного анализа показали существенное ($p < 0,05$) влияние на способность образцов к клональному микроразмножению фактора «генотип» и фактора принадлежности к группе образцов ежевик (подрод *Idaeobatus*) или малин (подрод *Rubus*).

В среднем у образцов ежевики значения КМР на питательной среде №I были существенно ($p < 0,01$) выше, чем у изученной выборки образцов малин (см. табл. 2). Для 90% образцов ежевики можно добиться «эффективного микроразмножения» за 6 недель культивирования на питательной среде №I. В то же время около половины образцов малины характеризовались низкими значениями КМР на среде №I и нуждались в двухэтапном культивировании (по схемам №I/№II или №I/№III) для достижения $\text{КМР} \geq 3$.

Использование разных схем культивирования позволило достичь показателей «эффективного клонального микроразмножения» для всех 65 образцов выборки, хотя и за разный временной период.

Генотипы из группы «А» с высокими показателями КМР и быстрыми темпами микроразмножения отбирались для экспериментов по криоконсервации.

Таблица 2 – Состав групп («А», «В», «С») образцов малины и ежевики, выделенных по способности к «эффективному клональному микроразмножению»; для каждого образца указаны значения КМР

Группа «А» КМР \geq 3 на среде №I на 6 неделе культивирования				Группа «В» КМР на средах №I (6 недель / №II–(12 недель)		Группа «С» КМР на средах №I (6 недель) / №III–(12 недель)
Ежевика:		Малины:		Ежевика	Малины:	Малины:
Ashton Cross 5,5 \pm 0,9	Logan Thornless 3,6 \pm 0,2	<i>R.</i> <i>pyramidalis</i> и-589009 3,1 \pm 0,1	Барнауль- ская 3,3 \pm 0,1	Cascade 1,5 \pm 0,1 / 3,4 \pm 0,2	Красно- плодный сеянец 2,6 \pm 0,3/3,8 \pm 0,2	Bababerry 2,1 \pm 0,4 / 3,2 \pm 0,2
Bodega Bay 3,2 \pm 0,2	Merton Thornless 3,1 \pm 0,2	Cumberland 3,0 \pm 0,0	Глория \times НК (2) 3,1 \pm 0,3	№с861402 2,1 \pm 0,3 / 3,2 \pm 0,2	Суздальская 2,5 \pm 0,3 / 3,5 \pm 0,2	Canby 2,4 \pm 0,2 / 3,8 \pm 0,2
Evergreen Thornless 3,2 \pm 0,2	Whitford Thornless 3,1 \pm 0,3	Rubin bulgarski 3,8 \pm 0,3	Память Горького 3,0 \pm 0,0		Урожайная 1,9 \pm 0,2 / 3,9 \pm 0,2	Chief 1,6 \pm 0,3 / 3,0 \pm 0,2
Brazos 3,7 \pm 0,2	<i>R.illecebrosus</i> и-588477 5,9 \pm 0,5	Nootka 3,1 \pm 0,2	Sentry 4,0 \pm 0,3		Cornoelles Victoria 2,1 \pm 0,2 / 3,3 \pm 0,2	Festival 1,1 \pm 0,1 / 3,0 \pm 0,1
Cherokee 4,9 \pm 0,3	Silvan 3,9 \pm 0,6	Mandarin 5,3 \pm 0,2	Бабые лето-2 3,4 \pm 0,2		Summit 1,5 \pm 0,2 / 3,6 \pm 0,2	<i>R. parvifolius</i> , и-588463 1,2 \pm 0,2 / 3,1 \pm 0,2
Darrow 4,4 \pm 0,3	Young 3,1 \pm 0,3	Trent 3,2 \pm 0,2	Вислуха 3,3 \pm 0,2			Грушовка 1,9 \pm 0,4 / 3,3 \pm 0,3
Dirskan Thornless 4,9 \pm 0,4	<i>R. axillaris</i> и-588614 3,1 \pm 0,1	Искра 3,1 \pm 0,1	Белая Спирина 3,9 \pm 0,2			Гусар 2,5 \pm 0,2 / 3,3 \pm 0,2
Агавам 3,1 \pm 0,2	Waldo 3,0 \pm 0,2	Каскад 3,2 \pm 0,2	Таганка 3,5 \pm 0,2			Краснокутская 2,6 \pm 0,2 / 3,5 \pm 0,2
Ebano 3,4 \pm 0,1	Orus 1063 3,5 \pm 0,2	Шарташская 3,1 \pm 0,2	Местная 3,1 \pm 0,2			Любительская 1,8 \pm 0,5 / 3,5 \pm 0,3
Boysen 3,1 \pm 0,1	Santiam 3,3 \pm 0,2	Скромница 3,0 \pm 0,0	Метеор 3,3 \pm 0,3			Марьянушка 1,3 \pm 0,2 / 3,2 \pm 0,2
		Сормовичка 3,0 \pm 0,2	Надежда 3,0 \pm 0,0			Ранняя сладкая 2,2 \pm 0,3 / 3,4 \pm 0,2
		Ивушка 4,0 \pm 0,3	Прогресс 3,0 \pm 0,2			Самарская плотная 1,8 \pm 0,3 / 3,7 \pm 0,3
		Sentry 4,0 \pm 0,3				

Оптимизация протокола капель-витрификации (DV) для криоконсервации образцов малины – анализ литературных данных, выбор оптимального типа эксплантов и продолжительности их обработки раствором криопротекторов

В настоящее время метод DV (Panis et al., 2005) широко используется для криоконсервации *in vitro* образцов многих культурных видов – представителей более 10 семейств (Panis et al., 2016). Для образцов разных видов использовались различные модификации этого метода, касающиеся всех этапов протокола DV. Криоконсервация образцов рода *Rubus* методом DV описана в трех публикациях: для единичных сортов малины (Condello et al., 2011) и ежевики (Vujović et al., 2011) – без использования каких-либо предобработок исходных микрорастений и в работе Nukari et al. (2011) – для 32 сортов малины – без уточнений деталей предобработки исходных микрорастений и состава питательной среды для посткриогенной регенерации. Отметим, что в этих работах указана разная продолжительность важного этапа криоконсервации, определяющего уровень посткриогенной регенерации – обработки эксплантов витрифицирующим раствором PVS2. В связи с этим первоначальная задача состояла в выборе оптимальной продолжительности обработки эксплантов раствором криопротекторов, определении оптимального типа

эксплантов для криоконсервации, апробации питательной среды МСТо (см. табл. 1) для посткриогенной регенерации.

Изучение влияния продолжительности обработки эксплантов раствором криопротекторов (PVS2). Для криоконсервации (см. табл. 1) использовали верхушечные почки *in vitro* растений малины сорта Барнаульская, применяя четыре варианта обработки витрифицирующим раствором PVS2 20, 30, 40 и 60 минут (рис. 2). При 20-минутной инкубации эксплантов в растворе PVS2 посткриогенные регенеранты не формировались. Наиболее высокий процент регенерации после замораживания-оттаивания был получен при обработке эксплантов раствором криопротекторов PVS2 в течение 30 минут. Более длительная обработка (40 и 60 минут) приводила к существенному ($p < 0,05$) снижению уровня регенерации не только в опыте, но и в контроле (рис 2). В дальнейшем для криоконсервации использовали 30-минутную обработку эксплантов криопротектором.

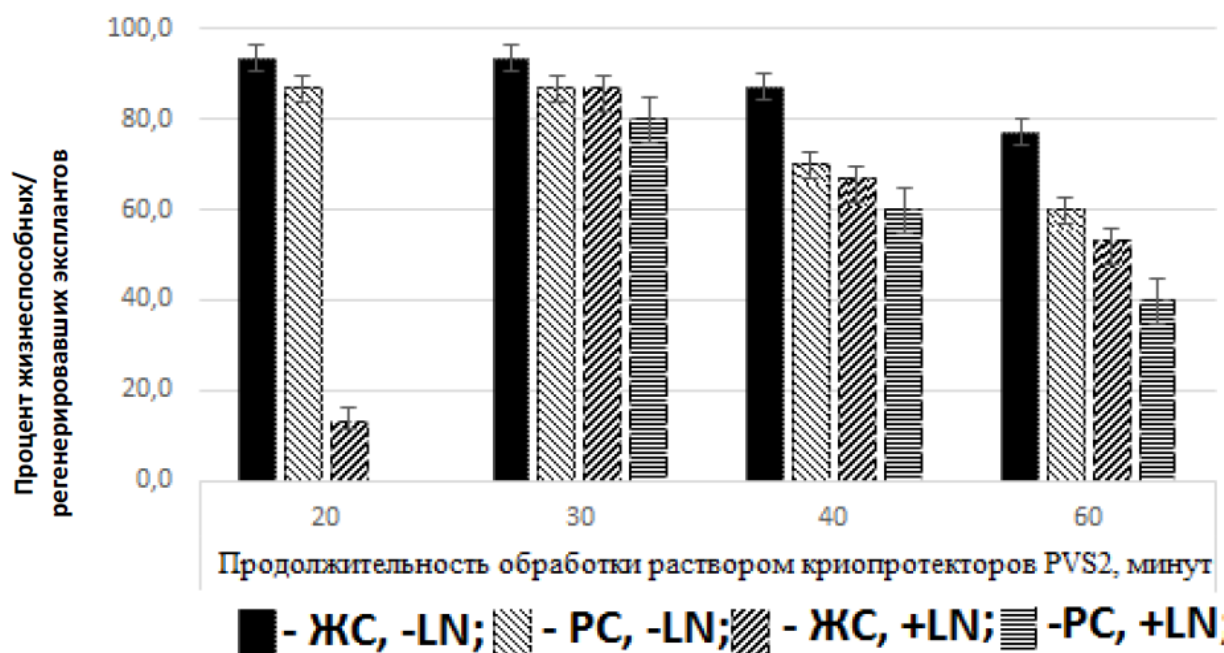


Рисунок 2 – Влияние продолжительности обработки эксплантов раствором PVS2 на их способность к регенерации после оттаивания у малины сорта Барнаульская. ЖС – процент жизнеспособных эксплантов, РС – процент регенерирующих эксплантов, -LN – контрольные экспланты, +LN – варианты опыта по криоконсервации.

На следующем этапе была проведена оценка показателей посткриогенного восстановления двух типов эксплантов – верхушечных и пазушных почек микрорастений двух сортов малины Барнаульская и Шарташская. Для каждого сорта использовали по 30 верхушечных и 30 пазушных почек микрорастений на каждую из трех повторностей. Результаты представлены на рисунке 3 и в таблице 3.

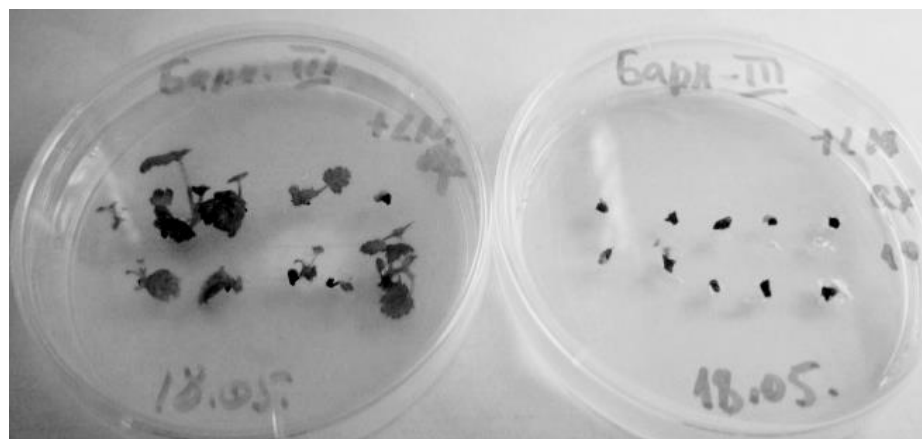


Рисунок 3 – Регенерация верхушечных (слева) и пазушных (справа) почек малины сорта Барнаульская после оттаивания.

Полученные результаты указывают на достоверно более высокие ($p < 0,05$) показатели посткриогенного восстановления верхушечных почек микрорастений по сравнению с пазушными. В дальнейшем для экспериментов по криоконсервации и закладки образцов малины и ежевики на криохранение использовали только верхушечные почки.

Таблица 3 – Жизнеспособность и регенерационная способность верхушечных и пазушных почек микрорастений малины сортов Барнаульская и Шарташская после замораживания-оттаивания и в контроле

Сорт	Тип экспланта	Жизнеспособность эксплантов, %		Регенерационная способность эксплантов, %	
		-LN	+LN	-LN	+LN
Барнаульская	Верхушечные	96,3±3,7 ^{ab}	87,8±6,2 ^{ab}	92,6±7,4 ^{ab}	81,1±1,1 ^{ab}
	Пазушные	86,5±3,5 ^{ab}	21,5±3,8 ^d	76,3±3,3 ^{ab}	21,5±3,8 ^d
Шарташская	Верхушечные	90,7±4,9 ^{ab}	75,0±7,6 ^{ab}	87,0±6,7 ^{abc}	67,2±11,2 ^{ab}
	Пазушные	76,7±3,3 ^{ab}	0 ^e	73,3±3,3 ^{abc}	0 ^e

Примечания: Значения, отмеченные одинаковыми буквами, статистически не отличаются ($p < 0,05$).

-LN – контрольные экспланты (без погружения в жидкий азот),

+LN – варианты опыта по криоконсервации (экспланты прошли все этапы протокола, см. табл. 6)

Таким образом, на основе анализа литературных данных о модификациях оригинального метода DV (Panis et al., 2005), использованных для криоконсервации образцов малины, ежевики и других объектов, а также собственных результатов была предложена оригинальная модификация данного метода – «DV-biotech», которая в дальнейшем и использовалась для криоконсервации.

Изучение способности к посткриогенному восстановлению сортов малины и ежевики

Оптимизированный нами протокол «DV-biotech» был использован для криоконсервации 13 сортов малины и 4 сортов ежевики из *in vitro* коллекции ВИР (табл. 4). В контроле показатели жизнеспособности и эффективности регенерации изученных сортов малины и ежевики были близки и, как и ожидалось, имели высокие значения: 100,0±0,0 – 86,1±7,3 % и 100,0±0,0 – 82,6±3,8% соответственно. В экспериментах по криоконсервации средние показатели жизнеспособности и регенерационной способности эксплантов после оттаивания были существенно ниже – 68,2±3,5 % и 59,6±4,9 % – в группе сортов малин, и 35,6±14,2% и 33,1±14,7% в группе сортов ежевик (см. табл. 4). Средние показатели посткриогенного восстановления у сортов малины и ежевики существенно не отличались. Выявлена достоверная положительная корреляция между показателями жизнеспособности и регенерационной способности почек после оттаивания у сортов малины и ежевики (коэффициенты ранговой корреляции Спирмена = 0,94 и 1,0 соответственно).

Наиболее высокие показатели регенерационной способности отмечены у сорта Метеор (89,3%), минимальные – у сорта Скромница (24,2%). Среди образцов ежевики сорт Darrow имел наиболее высокие показатели посткриогенной регенерации (см. табл. 4). Для сорта Ashton Cross необходимо провести дополнительные исследования по оптимизации протокола криоконсервации. По данным дисперсионного анализа, в пределах изученной выборки сортов малины не выявлено значимого влияния генотипа на жизнеспособность эксплантов ($p=0,07$), в то время как влияние генотипа на регенерационную способность почек после оттаивания было статистически достоверным ($p=0,0003$).

В изучении находились диплоидные образцы малины обыкновенной – *R. idaeus* и образцы ежевики разного уровня ploидности (2x, 4x, 7x, 8x). Частота регенерации после оттаивания у диплоидных сортов в среднем составила 58,6±5,7%, у полиплоидных – 37,5±19,8%; различия недостоверны.

Таблица 4 – Жизнеспособность и регенерационная способность верхушечных почек микрорастений сортов малины и ежевики после замораживания-оттаивания и в контроле

№ п/п	Сорт	Жизнеспособность эксплантов, %		Регенерационная способность эксплантов, %	
		-LN	+LN	-LN	+LN
Малина обыкновенная (2n=2x):					
1	Скромница	100,0±0,0 d	44,4±7,1 ab	96,7±3,3 cd	24,2±5,6 a
2	Новокитаевская	100,0±0,0 d	60,6±6,5 abc	96,3±3,7 cd	40,0±6,5 ab
3	Спутница	100,0±0,0 d	63,6±13,7 abc	95,2±4,8 cd	45,5±1,1 ab
4	Кокинская	93,3±6,7cd	56,7±7,1 abc	85,0±7,6 cd	51,7±1,7 abc
5	Самарская плотная	93,3±6,7cd	65,5±10,9 abc	86,7±6,7 cd	55,2±10,3 abc
6	Прогресс	89,6±0,4 c	68,5±13,2 abc	82,6±3,8 bcd	56,8±9,1 abc
7	Белая Спирина	100,0±0,0 d	65,5±7,3 abc	100,0±0,0 d	57,4±6,3 abc
8	Шарташская	90,7±4,9 cd	75,0±7,6 bc	87,0±6,7 bcd	67,2±11,2 bc
9	Phenix	86,1±7,3 bc	75,9±5,8 bc	94,4±5,6 bc	70,1±4,7 bc
10	Бальзам	94,4±5,6 cd	80,6±6,3 bc	88,9±5,6 bc	80,6±6,3bc
11	Барнаульская	96,3±3,7 cd	87,8±6,2 bc	92,6±7,4 cd	81,1±1,1 bc
12	Соколенок	86,7±3,3 c	84,0±4,9 bc	83,3±3,3 bc	81,1±7,0 bc
13	Метеор	100,0±0,0 d	90,7±0,7 cd	100,0±0,0 d	89,3±0,7 c
	Среднее	95,2±1,3 bc	68,2±3,5 bc	90,8±1,7 bc	59,6±4,9 abc
Ежевика (2n=2x ... 8x):					
1	Whitford Thornless (2x)	94,0±3,1 bc	30,0±15,0 abc	84,3±2,9 bc	20,0±10,0 abc
2	Young (7x)	90,6±0,6 bc	45,0±25,0 abc	84,4±2,9 bc	45,0±25,0 abc
3	Darrow (4x)	96,7±3,3 bc	67,5±14,2 abc	87,3±3,7 bc	67,5±14,2 abc
4	Ashton Cross (8x)	100,0±0,0 d	0 ^e	94,4±5,6 bc	0 e
	Среднее	95,3±1,9 bc	35,6±14,2 abc	87,6±2,4 bc	33,1±14,7 abc
	Среднее по 17 сортам:	95,3±0,5 bc	62,4±5,5 bc	89,5±1,2 bc	54,9±5,9 bc

Примечания. Значения, отмеченные одинаковыми буквами, статистически не отличаются ($p < 0,05$), -LN – контрольные почки, +LN – экспериментальные почки. В скобках указан уровень плоидности образца.

Изучение жизнеспособности и регенерационной способности после оттаивания у селекционных сортов и у коллекционных образцов культурных видов картофеля

Изучение способности к посткриогенному восстановлению у коллекционных образцов картофеля было проведено на основе протокола «DV-biotech» по той же схеме, которая применялась для образцов малины и ежевики. Вначале было проведено изучение способности к посткриогенному восстановлению двух типов эксплантов – верхушечных и пазушных почек микрорастений 30 образцов тетраплоидного ($2n=4x=48$) культурного картофеля *S. tuberosum* ssp. *tuberosum*, включая 20 селекционных сортов (табл. 5).

У 19 (95%) из 20 изученных сортов отмечена достоверно ($p < 0,05$) более высокая частота выживших после замораживания-оттаивания верхушечных почек по сравнению с пазушными. У 17 (85%) сортов частота регенерации верхушечных почек была существенно выше ($p < 0,05$), чем у пазушных и только у трех сортов (Великан, Ильинский, Накра) эти различия были недостоверны, однако и для них отмечена та же тенденция (см. табл. 5). Аналогичные результаты получены и при изучении посткриогенного восстановления аборигенных чилийских сортов картофеля (данные не представлены). Полученные данные однозначно указывают на более высокую способность к посткриогенному восстановлению верхушечных почек микрорастений по сравнению с пазушными. Исходя из полученных результатов, во всех последующих экспериментах по криоконсервации картофеля использовался только один тип эксплантов – верхушечные почки микрорастений.

Значимая ($p < 0,05$) положительная корреляция между показателями выживаемости и

регенерационной способности отмечена как у селекционных сортов ($r=0,72$), так и у аборигенных чилийских сортов ($r=0,42$); коэффициент ранговой корреляции Спирмена для значений этих показателей составил 0,63 по выборке из 30 тетраплоидных сортов.

Таблица 5 – Показатели посткриогенного восстановления различных типов эксплантов у тетраплоидных сортов картофеля *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* ($2n=4x=48$)

№ п/п	Название сорта	Жизнеспособность после замораживания-оттаивания, %		Эффективность регенерации после замораживания-оттаивания, %	
		Верхушечные почки	Пазушные почки	Верхушечные почки	Пазушные почки
1	Импала	76,6±3,3*	40,0±10,0	73,3±3,3*	33,3±6,7
2	Никулинский	90,0±0,0*	30,0±15,3	63,3±8,8*	26,7±12,0
3	Жуковский ранний	73,3±3,3*	6,7±6,7	60,0±0,0*	6,7±6,7
4	Gala	63,3±6,7*	23,3±6,7	60,0±5,8*	20,0±5,8
5	Барин	60,0±10,0*	13,3±6,7	60,0±10,0*	13,3±6,7
6	Лорх	53,3±6,7*	3,3±3,3	53,3±6,7*	3,3±3,3
7	Red Scarlett	60,0±0,0*	6,7±6,7	53,3±6,7*	0
8	Голубизна	50,9±15,4*	10,0±5,8	50,9±15,4*	6,7±3,3
9	Накра	68,9±7,8*	46,7±13,3	49,9±7,1	30,0±11,5
10	Крепыш	56,7±6,7*	23,3±6,7	46,7±3,3*	16,7±6,7
11	Жигулевский	53,3±3,3*	20,0±5,8	46,7±6,7*	10,0±5,8
12	Невский	44,8±8,7*	26,2±3,1	44,8±8,7*	22,8±2,9
13	Вымпел	50,0±0,0*	6,6±3,3	42,5±3,8*	3,3±3,3
14	Брянский деликатес	61,8±10,0*	6,6±3,3	42,4±9,5*	6,7±3,3
15	Великан	50,0±17,3	22,9±12,2	40,0±10,0	16,9±12,6
16	Фиолетовый	41,8±6,1*	9,4±5,3	38,8±5,9*	9,4±5,3
17	Метеор	46,7±12,0*	10,0±5,8	36,7±6,7*	6,7±3,3
18	Удача	50,0±10,0*	13,3±6,7	30,0±5,8*	3,3±3,3
19	Колобок	40,0±11,5*	10,0±5,8	30,0±5,8**	6,7±6,7
20	Ильинский	60,0±11,5*	20,0±0,0	26,7±3,3	16,7±3,3
	$\bar{X} \pm m_x$	57,6±2,8*	17,4±2,6	47,5±2,7*	12,9±2,1

Примечание: Приведены данные по выживаемости и регенерационной способности эксплантов, учтенные на 8 неделе после момента их размораживания. * – достоверные различия ($p<0,05$) между соответствующими показателями у верхушечных и пазушных почек.

В таблице 6 представлены результаты экспериментов по криоконсервации 10 чилийских образцов *S. tuberosum* ssp. *tuberosum*, 25 образцов пяти андийских культурных видов картофеля разных уровней плоидности: *S. chaucha* ($2n=3x$), *S. juzepczukii* ($2n=3x$), *S. stenotomum* ($2n=2x$), *S. phureja* ($2n=2x$), *S. tuberosum* ssp. *andigenum* ($2n=4x$), а также нескольких образцов дикорастущего вида *S. acaule* ($2n=4x$). Отметим, что числа хромосом сохраняемых *in vitro* клонов были подсчитаны ранее (Gavrilenko et al., 2010).

Как и в предыдущих экспериментах, для образцов андийских культурных видов картофеля подтверждена достоверная ($p<0,05$) корреляция двух показателей посткриогенного восстановления изученных образцов: процента жизнеспособности эксплантов и частоты их регенерации после замораживания-оттаивания.

Различия в показателях эффективности регенерации после замораживания-оттаивания между образцами различных видов, проанализированные с использованием критерия Тьюки, оказались недостоверными ($p>0,05$), не позволив выделить однородные группы. Также не существенны ($p>0,05$) различия в способности к посткриогенной регенерации между группами образцов разного уровня плоидности. В то же время в разных группах образцов выявлено существенное ($p<0,05$) влияние генотипа на уровень посткриогенной регенерации образцов (см. табл. 6).

Таблица 6 – Показатели эффективности регенерации в контроле и после оттаивания верхушечных почек микрорастений образцов чилийских и андийских видов картофеля

№	№	Название вида	№ каталога ВИР	Высота над ур. м. мест сбора образца	Регенерационная способность в контроле, -LN,%	Регенерационная способность после оттаивания, +LN,%
1 Образцы аборигенных чилийских сортов <i>S. tuberosum</i> ssp. <i>tuberosum</i>						
1	1	ssp. <i>tuberosum</i>	7540	0	93,3±6,7	70,8±7,7
2	2	ssp. <i>tuberosum</i>	7576	106	80,0±0,1	60,0±11,5
3	3	ssp. <i>tuberosum</i>	2083	-	76,7±3,3	57,2±9,5
4	4	ssp. <i>tuberosum</i>	7589	109	88,6±5,9	56,7±12,0
5	5	ssp. <i>tuberosum</i>	3414	77	96,7±3,3	53,4±13,4
6	6	ssp. <i>tuberosum</i>	7568	106	80,0±0,1	50,0±0,0
7	7	ssp. <i>tuberosum</i>	2095	-	84,9±2,9	46,7±12,0
8	8	ssp. <i>tuberosum</i>	7550	102	81,5±9,8	45,0±10,1
9	9	ssp. <i>tuberosum</i>	7599	106	70,1±5,0	38,3±7,2
10	10	ssp. <i>tuberosum</i>	10648	-	80,6±10,0	31,9±1,1
		X±m _x (2n=4x=48)	N=10		83,2±2,5	51,0±3,5
2а Образцы диплоидных (2n=2x=24) культурных видов <i>S. stenotomum</i> , <i>S. phureja</i>						
11	1	<i>S. stenotomum</i>	10194	3700	95,8±4,2	69,0±5,5
12	2	<i>S. stenotomum</i>	16911	3950	86,3±5,7	63,9±5,4
13	3	<i>S. stenotomum</i>	11020	н/д	86,9±10,3	80,0±2,9
14	4	<i>S. stenotomum</i>	9048	3750	69,9±1,1	57,5±5,2
15	5	<i>S. stenotomum</i>	16596	н/д	92,5±3,8	43,3±8,8
16	6	<i>S. stenotomum</i>	1664	н/д	76,7±3,3	43,3±3,3
		X±m _x	N=6		84,7±3,9	59,5±5,9
17	1	<i>S. phureja</i>	1817	3690	84,5±3,6	60,0±5,8
18	2	<i>S. phureja</i>	5642	3500	90,9±0,0	60,0±10,0
19	3	<i>S. phureja</i>	21564	н/д	83,0±1,7	45,0±2,9
20	4	<i>S. phureja</i>	9836	3500	76,7±3,3	36,7±6,7
		X±m _x	N=4		83,8±2,9	50,4±5,8
		X±m _x (2n=2x=24)	N=10		84,3±2,5	55,9±4,3
Образцы триплоидного (2n=3x=36) культурного вида <i>S. chaucha</i>						
21	1	<i>S. chaucha</i>	24679	3300	68,6±9,6	30,6±4,0
22	2	<i>S. chaucha</i>	24689	3550	90,9±9,1	38,2±7,7
23	3	<i>S. chaucha</i>	24690	3800	77,8±14,7	46,9±5,1
24	4	<i>S. chaucha</i>	24698	3880	84,5±10,8	31,1±14,5
25	5	<i>S. chaucha</i>	25000	3330	88,9±11,1	43,7±7,8
26	6	<i>S. chaucha</i>	24678	3300	56,7±3,3	32,7±1,5
27	7	<i>S. chaucha</i>	24682	3300	86,7±2,0	27,7±5,4
28	8	<i>S. chaucha</i>	24674	3700	77,1±2,9	62,2±2,2
		X±m _x (2n=3x=36)	N=8		78,9±4,0	39,1±4,1
Образцы тетраплоидного (2n=4x=48) культурного вида <i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigenum</i>						
29	1	ssp. <i>andigenum</i>	1789	2614	78,9±1,0	37,4±8,1
30	2	ssp. <i>andigenum</i>	1763	н/д	76,7±3,3	44,3±2,9
31	3	ssp. <i>andigenum</i>	1770	н/д	73,3±3,3	36,1±16,9
32	4	ssp. <i>andigenum</i>	3172	2800	86,7±2,0	61,7±2,4
		X±m _x (2n=4x=48)	N=4		78,9±2,8	50,1±5,9
2б Образцы триплоидного (2n=3x=36) культурного вида <i>S. juzepczukii</i> (в происхождении которого участвовал дикорастущий вид картофеля <i>S. acaule</i>)						
33	1	<i>S. juzepczukii</i>	25027	3740	91,7±8,3	53,4±0,8
34	2	<i>S. juzepczukii</i>	25015	3700	86,7±3,3	86,2±1,6
35	3	<i>S. juzepczukii</i>	25019	3820	87,0±3,2	67,0±3,2
		X±m _x (2n=3x=36)	N=3		88,4±1,6	68,8±9,5
Образцы тетраплоидного (2n=4x=48) дикорастущего вида <i>S. acaule</i>						
36	1	<i>S. acaule</i>	23005	3100	78,3±1,7	29,0±2,6
37	2	<i>S. acaule</i>	23004	3500	76,7±3,3	51,7±1,7
38	3	<i>S. acaule</i>	9814	3650	77,1±2,9	50,0±10,0
		X±m _x (2n=4x=48)	N=3		77,4±0,5	43,6±7,3

Не исключено, что образцы различного эколого-географического происхождения, адаптированные к действию различных абиотических стрессоров, могут отличаться и по криорезистентности. Сравнение показателей эффективности регенерации после оттаивания было проведено в двух контрастных группах образцов (1) и (2):

(1) чилийские образцы, собранные на высоте менее 200 м над ур. м. в районе острова Чилоэ и прилегающей прибрежной материковой части Чили, эффективность регенерации которых варьировала от 31,9 до 70,8%, в среднем составив $51,0 \pm 3,5\%$ (см. табл. 6);

(2) образцы андийских культурных видов, собранные в высокогорных районах Анд на высотах от 3300 до 3950 м над ур. м.:

(2а) 14 образцов трех родственных культурных видов с известными координатами и высотами точек их сбора, включая 3 образца *S. stenotomum*, 3 образца *S. phureja*, 8 образцов *S. chaucha*. В этой группе уровень регенерации после оттаивания варьировал от 30,6 до 80,0%, в среднем составив $47,2 \pm 3,9\%$ (см. табл. 6);

(2б) 6 образцов двух высокогорных родственных видов, включая 3 образца культурного гибридогенного вида *S. juzepczukii* и 3 образца дикорастущего вида *S. acaule*, эффективность посткриогенной регенерации которых варьировала от 29,0 до 86,2%, в среднем составив $60,4 \pm 7,7\%$ (см. табл. 6).

Оказалось, что уровень посткриогенной регенерации чилийских аборигенных сортов (группа 1) и высокогорных андийских видов картофеля (группы 2а, 2б и 2) достоверно ($p < 0,05$) не отличались.

Формирование криоколлекций малины, ежевики, картофеля в ВИР

С использованием модифицированного метода дроплет-витрификации в 2010 году в ВИР были начаты работы по созданию криоколлекции образцов культурных видов картофеля (Shvachko, Gavrilenko, 2011; Дунаева и др., 2011; Швачко, 2012). В последние годы проводятся исследования по оптимизации указанного выше метода, предложен оптимизированный протокол криоконсервации «DV-biotech» (Ukhatova et al., 2017), с использованием которого криоколлекция ВИР пополняется новыми сортами картофеля и образцами других культур (малина, ежевика) (Ухатова и др., 2017; Ukhatova et al., 2017). Вопросы о стандартах и регламенте закладки образцов на криохранилище и организации криоколлекций растений активно обсуждаются в литературе. Наиболее часто в генбанках уровень посткриогенной регенерации 39% считается минимально допустимым для надежного сохранения образцов *in cryo* (Keller et al., 2011; Volk et al., 2016; Vamberg et al., 2016). Однако некоторые исследователи при закладке образцов в криобанки указывают минимальный порог 20% (Dussert et al., 2003; Vollmer et al., 2017). Таким образом, минимальные значения посткриогенной регенерации четко не регламентированы, однако они имеют большое значение для определения числа сохраняемых *in cryo* эксплантов каждого коллекционного образца.

Исходя из вышесказанного, образцы изученной нами выборки были дифференцированы на три группы:

А) образцы с высоким уровнем регенерационной способности – выше 40%;

Б) образцы, уровень регенерации которых составил 21–39%;

В) образцы, регенерационная способность которых была ниже 20%.

Согласно полученным нами данным, из 17 сортов малины и ежевики 82,3% можно отнести к группе А, 11,8% – к группе Б и один сорт – к группе В (табл. 4). Из 56 изученных аборигенных и селекционных сортов картофеля 75% можно отнести к группе А и 25% – к группе Б (табл. 5, 6).

Согласно рекомендациям Dussert et al. (2003) и Volk et al. (2016), мы закладывали в криобанк по 90 эксплантов (в 9 криопробирках) каждого образца. Такой подход позволяет

не только сохранить образец в криобанке, но и изымать по необходимости часть материала для мониторинга регенерационной способности данного образца после одного года, 10, 25 лет криохранения.

В результате проведенной работы 65,8% (48 из 73 образцов) образцов малины, ежевики и картофеля были заложены на длительное хранение в криобанк ВИР в соответствии с рекомендованными в последнее время требованиями (по 90 эксплантов, уровень посткриогенной регенерации выше 40%).

Уточнения регламента закладки на длительное хранение в криобанке ВИР образцов малины, ежевики и картофеля для их надежного сохранения при сверхнизких температурах приведены на рисунке 4.

Для криоконсервации и криохранения одного коллекционного образца необходимо 180 эксплантов (верхушечных почек микрорастений):		
КОНТРОЛЬ: 30 эксплантов (10x3) изучение регенерационной способности эксплантов без замораживания в трех повторностях по 10 эксплантов в каждой	КРИОКОНСЕРВАЦИЯ: (погружение эксплантов в жидкий азот на 1 час) 60 эксплантов (20x3) изучение регенерационной способности после оттаивания в трех повторностях по 20 эксплантов в каждой	КРИОХРАНЕНИЕ: (долгосрочное хранение эксплантов в криобанке) 90 эксплантов (30x3) пополнение криоколлекции ВИР: в трех повторностях по 30 эксплантов (3 криопробирки по 10 эксплантов) в каждой

Рисунок 4 – Регламент для проведения экспериментов по криоконсервации и криохранению образцов вегетативно размножаемых культур.

Полученные результаты позволили уточнить регламент закладки в отношении числа эксплантов (повторностей, контролей) на длительное хранение в криобанк ВИР.

Оценка эффективности оздоровления микрорастений малины от вируса RBDV при использовании различных методов антивирусной терапии

Отобранные по результатам ИФА клоны микрорастений двух сортов Новокитаевская и Самарская плотная, содержащие вирус RBDV, маркировали и размножали черенкованием для проведения последующих опытов по их оздоровлению от вирусной инфекции с использованием методов криотерапии, химиотерапии и комплексной терапии. Результаты экспериментов представлены в таблице 9.

«А» – Оздоровление микрорастений малины методом криотерапии

Метод DV ранее для криотерапии малины не применялся. Известны попытки использования для криотерапии RBDV у одного генотипа малины методом инкапсуляции-дегидратации, однако они оказались неуспешными (Wang et al., 2008). В настоящей работе для оздоровления от RBDV микрорастений двух сортов малины (Новокитаевская и Самарская плотная) использован модифицированный протокол «DV-biotech». Перед началом проведения экспериментов по криотерапии микрорастения были индивидуально протестированы на наличие RBDV методом ОТ-ПЦР, так же, как и по окончании этих работ: методом ОТ-ПЦР тестировали клонально размноженные регенеранты.

В экспериментах по криотерапии у обоих сортов отмечен сравнительно высокий уровень регенерационной способности после замораживания-оттаивания: (43,3% – Новокитаевская 55,2% – Самарская плотная). Однако среди протестированных 14

криорегенерантов обоих сортов не было выявлено ни одного оздоровленного микрорастения (табл. 7, вариант «А»).

«Б» – Оздоровление микрорастений малины методом химиотерапии. В варианте химиотерапии («Б») было отмечено замедление развития микрорастений по сравнению с контролем (среда без рибавирина). Как видно из данных таблицы 7, среди протестированных выживших 14 микрорастений не было выявлено ни одного оздоровленного клона. Наши данные дополняют результаты, полученные в отделе биотехнологии ВИР на большей выборке сортов малины с вирусом RBDV (Антонова и др., 2015), и вместе указывают на неэффективность использования метода химиотерапии (30 мг/л рибавирина в питательной среде) для оздоровления микрорастений малины от RBDV.

Таблица 7 – Результаты криотерапии, химио- и комплексной терапии микрорастений малины от вируса RBDV

Сорт	Число растений (клонов) выживших после терапии / число оздоровленных от RBDV клонов		
	А – Криотерапия	Б – Химиотерапия	В – Комплексная термо-химиотерапия
Самарская плотная	7 / 0	8 / 0	3 / 3
Новокитаевская	7 / 0	6 / 0	2 / 1
Итого	14 / 0	14 / 0	5 / 4
% оздоровления	0%	0%	80,0%

«В» – Оздоровление микрорастений малины методом комплексной термо-химиотерапии. Для оздоровления от RBDV методом комплексной терапии *in vitro* растений двух сортов малины Самарская плотная и Новокитаевская использовали по 15 клонов каждого сорта. Детали экспериментов описаны в разделе «материалы и методы».

В варианте комплексной терапии большая часть микрорастений обоих сортов погибла, и к концу экспериментов выжило только три микрорастения сорта Самарская плотная и два микрорастения сорта Новокитаевская. После окончания комплексной терапии («В») у всех трех выживших микрорастений сорта Самарская плотная и одного из двух выживших микрорастений сорта Новокитаевская RBDV не был выявлен при тестировании микрорастений методами ИФА и ОТ-ПЦР (см. табл. 7). Полученные результаты ИФА и ОТ-ПЦР не противоречили друг другу. В варианте комплексной терапии средний по двум сортам процент оздоровления микрорастений малины от RBDV составил 80%. Оздоровленные клоны сортов Новокитаевская и Самарская плотная в дальнейшем поддерживались индивидуально в культуре *in vitro*. Важно отметить, что в нашей работе сравнение эффективности трех разных методов оздоровления микрорастений от RBDV (криотерапии, химиотерапии, комплексной терапии) было проведено на одних и тех же сортах, на одних и тех же клонах.

Поскольку исследуемые выборки имели небольшие размеры из-за низкой выживаемости микрорастений, для оценки значимости различий между вариантами «А» и «В», «Б» и «В» был использован точный критерий Фишера, согласно которому различия между вариантами «А» и «В», «Б» и «В» были достоверными ($p=0,0013$).

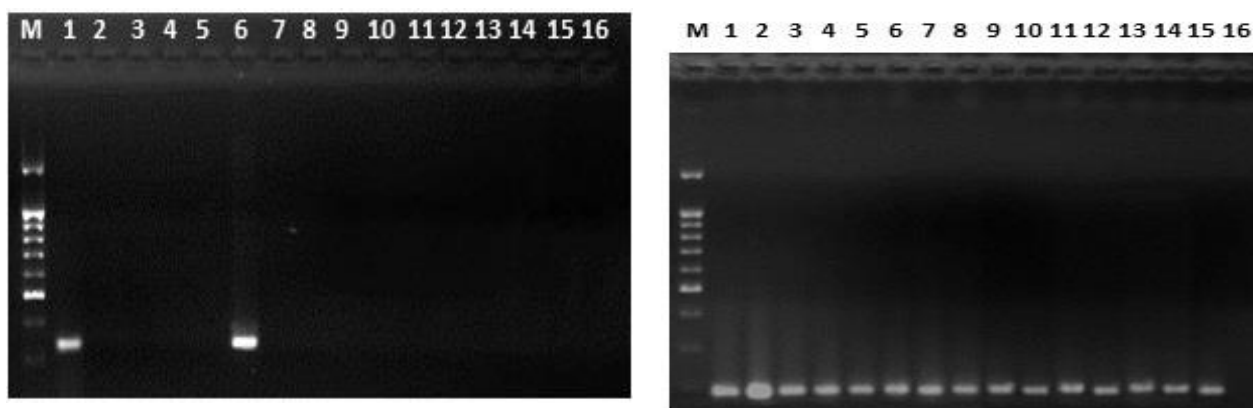
Наши данные дополняют результаты работы Антоновой с коллегами (2015), в которой на большей выборке сортов малины была продемонстрирована эффективность комплексной термо-химиотерапии для оздоровления микрорастений малины от RBDV. Таким образом, метод комплексной термо-химиотерапии может быть предложен для оздоровления микрорастений малины от RBDV.

Изучение эффективности оздоровления микрорастений картофеля от вируса скручивания листьев картофеля (PLRV)

Отобранные по результатам ИФА клоны микрорастений чилийских сортов картофеля, содержащих вирус скручивания листьев картофеля PLRV, маркировали и размножали черенкованием для проведения последующих опытов по оздоровлению их от вирусной инфекции методами криотерапии и комплексной терапии.

«А» – Оздоровление микрорастений аборигенных чилийских сортов картофеля методом криотерапии. Метод капель-витрификации впервые применен для криотерапии картофеля с целью оздоровления микрорастений от PLRV. Для инициации работ по криотерапии использовали микрорастения одного образца – к-7540_ВСЛК, у которого методом ИФА был диагностирован PLRV.

В экспериментах по криотерапии образец чилийского аборигенного сорта картофеля *S. tuberosum* к-7450_ВСЛК проявил сравнительно высокий уровень регенерационной способности после оттаивания – 46,7%. У 14 посткриогенных регенерантов, выбранных из трех разных повторностей опыта, была изолирована РНК для проведения индивидуального ОТ-ПЦР анализа. Как показали результаты этого анализа, после проведенной криотерапии у 13 (92,9%) из 14 протестированных криорегенерантов PLRV не был обнаружен (рис. 5). Оздоровленные клоны в дальнейшем поддерживались индивидуально в культуре *in vitro*.



а
Рисунок 5 – Тестирование *in vitro* растений клона к-7450_ВСЛК на наличие вируса PLRV при помощи метода ОТ-ПЦР:
а – ПЦР с праймерами, специфичными к последовательностям генома PLRV,
б – ПЦР с праймерами, специфичными к последовательности гена белка тубулина;
М – маркер молекулярного веса; 1 – исходное микрорастение (до криотерапии),
2–15 – посткриогенные регенеранты, 16 – вода.

Полученные результаты указывают, что метод криотерапии на основе капель-витрификации эффективен для оздоровления микрорастений картофеля от вируса PLRV.

«Б» – Оздоровление микрорастений аборигенных чилийских сортов картофеля методом комплексной термо-химиотерапии. Отобранные по результатам ИФА клоны микрорастений 14 чилийских сортов картофеля, содержащих вирус PLRV, маркировали и размножали черенкованием для проведения последующих опытов по оздоровлению их от вирусной инфекции методом комплексной терапии. В процессе оздоровления у каждого образца выжили только единичные растения (от одного до трех), т. е. меньше 10% исходных микрорастений. У 19 выживших микрорастений 14 чилийских образцов была изолирована РНК для проведения ОТ-ПЦР анализа с праймерами, специфичными к последовательностям генома PLRV. У 12 (63,2%) микрорастений, которые относились к 8 коллекционным образцам, PLRV не был детектирован (табл. 8). Оздоровленные микрорастения в дальнейшем поддерживались индивидуально в культуре *in vitro*.

Согласно полученным нами результатам, эффективность метода криотерапии на основе протокола криоконсервации «DV-biotech» (92,9%) достоверно ($p < 0,05$) превышала соответствующие показатели в варианте использования комплексной термо-химиотерапии (63,2%). Подчеркнем, что использование метода криотерапии имеет ряд преимуществ, поскольку позволяет в одних и тех же экспериментах проводить оздоровление образца от вирусных инфекций и его криоконсервацию.

Таблица 8 – Результаты оздоровления образцов аборигенных чилийских сортов (*S. tuberosum*) от PLRV методом комплексной термо-химиотерапии (по данным ОТ-ПЦР-анализа)

к-ВИР	Число растений (клонов)	
	выживших после терапии	оздоровленных от PLRV
7528	2	2
3407a	2	2
7586	3	3
7568	1	1
24602	1	1
2117 (B-206)	1	1
7583	1	1
2148 (Юз-8973)	1	1
10648, 3446, 3488, 7529, 3456, 7573	7	0
ВСЕГО	19	12 (63,2%)

Таким образом, полученные нами результаты вместе с литературными данными (Wang et al., 2006) указывают на эффективность метода криотерапии в отношении вируса PLRV и позволяют рекомендовать метод криотерапии для использования в генбанках и селекционных центрах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современная стратегия длительного хранения генетического разнообразия вегетативно размножаемых культур в контролируемых условиях среды включает этапы: введения растительного материала в культуру *in vitro* и его оздоровления от вирусных инфекций, клонального микроразмножения, криоконсервации и депонирования образцов в криобанки. Основываясь на литературных данных, можно полагать, что использование методов криоконсервации позволяет одновременно решать две задачи: долгосрочного хранения образцов в криоколлекциях и получение оздоровленных на основе метода криотерапии регенерантов. Однако круг культур, для которых разработан весь комплекс перечисленных выше методов, ограничен. Кроме того, большинство исследований выполнено на единичных образцах и разработанные методики не всегда возможно применять для генетически разнообразного материала.

Результаты настоящей работы, направленной на совершенствование методов криоконсервации и оздоровления от вирусных болезней образцов вегетативно размножаемых культур (на примере малины, ежевики, картофеля), позволяют сделать следующие выводы:

1. Продемонстрировано существенное влияние генотипа на способность образцов малины и ежевики к «эффективному микроразмножению». На основании полученных результатов выполнено структурирование *in vitro* коллекции представителей рода *Rubus*.

2. Установлено, что вариант обработки верхушечных почек микрорастений малины раствором криопротекторов PVS2 в течение 30 минут является оптимальным – эти условия обуславливают наиболее высокую частоту формирования криорегенерантов. Продемонстрирована достоверно более высокая способность к посткриогенному

восстановлению верхушечных почек *in vitro* растений по сравнению с пазушными. На основании полученных результатов, а также анализа литературных данных предложен оптимизированный протокол «DV-biotech» для криоконсервации образцов малины и ежевики.

3. Установлено существенное влияние генотипа на регенерационную способность после замораживания-оттаивания у образцов малины и ежевики. Различия в частоте регенерации эксплантов после оттаивания у образцов этих двух групп были не достоверными.

4. Изучена способность к посткриогенному восстановлению у 55 образцов пяти культурных видов картофеля. Установлено существенное влияние генотипа на регенерационную способность после замораживания-оттаивания у образцов культурных видов картофеля. Не выявлено статистически значимых отличий в уровне посткриогенной регенерации у образцов разных видов, образцов разного уровня ploidy и различного эколого-географического происхождения.

5. Показано, что применение методов криотерапии и химиотерапии для оздоровления *in vitro* растений малины от RBDV не эффективно. Продемонстрирована возможность получения оздоровленных от RBDV микрорастений малины при использовании метода комплексной терапии, включающей обработку микрорастений, культивируемых на среде с рибавирином, повышенной температурой (35°C).

6. Установлено, что эффективность оздоровления микрорастений картофеля от PLRV методом криотерапии была существенно выше, чем при использовании метода комплексной термо-химиотерапии.

Практические рекомендации:

1. Для криоконсервации сортов, гибридов и селекционных клонов малины, ежевики, картофеля рекомендуется использовать оптимизированный протокол «DV-biotech».
2. Предложенный регламент закладки образцов на длительное хранение может быть использован при пополнении криоколлекций образцов картофеля, малины и ежевики, а также других вегетативно размножаемых культур.
3. Метод криотерапии на основе протокола «DV-biotech» можно рекомендовать для оздоровления микрорастений картофеля от вируса PLRV.

Перечень работ, опубликованных по теме диссертации:

Статьи в журналах из перечня ВАК:

1. Дунаева, С.Е. *In vitro* коллекция малин и ежевик и идентификация образцов по изоферментным спектрам / С.Е. Дунаева, Н.В. Кудрякова, Л.Л. Малышев, **Ю.В. Лупышева**, Т.А. Гавриленко // Аграрная Россия. – 2005. – №2. – С.49–55.

2. Антонова, О.Ю. Оздоровление малины от вируса кустистой карликовости (RBDV) методом комплексной терапии в культуре *in vitro* / О.Ю. Антонова, С.Е. Дунаева, **Ю.В. Ухатова**, Н.Ю. Камылина, Н.А. Долганова, О.В. Лисицына, Т.А. Гавриленко // Достижения науки и техники АПК. – 2015. – Т.29. – №7. – С.61–64.

3. **Ухатова, Ю.В.** Оздоровление от вируса скручивания листьев картофеля чилийских образцов *Solanum tuberosum* с использованием методов криотерапии и комплексной химио-, термотерапии / **Ю.В. Ухатова**, О.Ю. Антонова, Т.А. Гавриленко // Достижения науки и техники АПК. – 2016. – Т.30. – №10. – С.56–60.

4. Антонова, О.Ю. Оздоровление микрорастений трех культурных видов картофеля (*Solanum tuberosum* L., *S. phureja* Juz. & Buk. и *S. stenotomum* Juz. & Buk.) от вирусов методом комплексной термо-химиотерапии / О.Ю. Антонова, О.В. Апаликова,

Ю.В. Ухатова, Е.А. Крылова, О.Ю. Шувалов, А.Р. Шувалова, Т.А. Гавриленко // Сельскохозяйственная биология. – 2017. – Т.52. – №1. – С.95–104.

5. **Ухатова, Ю.В.** Криоконсервация селекционных сортов картофеля в ВИРе / **Ю.В. Ухатова**, Е.В. Овэс, Н.Н. Волкова, Т.А. Гавриленко // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – Санкт-Петербург, 2017. – Т.178. – С.13–20.

6. **Ukhatova, Y.V.** Cryopreservation of red raspberry cultivars from the VIR *in vitro* collection using a modified droplet-vitrification method / **Y.V. Ukhatova**, S.E. Dunaeva, O.Y. Antonova, O.V. Apalikova, K.S. Pozdniakova, L.Y. Novikova, L.E. Shuvalova, T.A. Gavrilenko // In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant. – 2017. – DOI :10.1007/s11627-017-9860-3

Прочие издания – материалы конференций, в том числе:

1. **Лупышева, Ю.В.** Методы клонального микроразмножения / **Ю.В. Лупышева**, В.Ф. Огородникова // Материалы конф. «VI Царскосельские чтения». – СПб, 2002. – С.56.

2. **Лупышева, Ю.В.** Микроразмножение и хранение малины и ежевики в культуре *in vitro* / **Ю.В. Лупышева** // Материалы Междунар. научно-практ. конф. «Использование достижений современной биологической науки при разработке технологий в агрономии, зоотехнии и ветеринарии». – Брянск, 2002. – С.30–31.

3. Дунаева, С.Е. Сохранение генофонда вегетативно размножаемых культур растений в условиях *in vitro* в Институте растениеводства им. Н.И.Вавилова / С.Е. Дунаева, Э.В. Трускинов, О.Ю. Антонова, Ю.С. Оследкин, Г.И. Пендинен, С.Ю. Орлова, А.В. Павлов, З.Х. Пазова, **Ю.В. Лупышева**, Н.А. Швачко, Т.А. Гавриленко // Цитология. – 2004. – Т.46. – № 9. – С.789–790.

4. **Лупышева, Ю.В.** Микроразмножение *in vitro* коллекции рода *Rubus* / **Ю.В. Лупышева**, С.Е. Дунаева, Т.А. Гавриленко // Материалы IV Междунар. науч. конф. «Биологическое разнообразие. Интродукция растений». – СПб, 2007. – С.594–595.

5. Дунаева, С.Е. Род *Rubus* L. в коллекции *in vitro* ВНИИР им. Н.И.Вавилова (ВИР) / С.Е. Дунаева, **Ю.В. Лупышева**, Н.А. Долганова, Л.Г. Семёнова, Л.С. Красовская, Г.А. Фирсов, Т.А. Гавриленко // Тез. докл. II Вавиловской междунар. конф. «Генетические ресурсы культурных растений в XXI веке: состояние, проблемы, перспективы». – СПб, 2007. – С.165–166.

6. **Ухатова, Ю.В.**, Дунаева С.Е., Гавриленко Т.А. *In vitro* коллекция представителей рода *Rubus* в ВИРе // Материалы VIII Московского Международного Конгресса «Биотехнология: Состояние и Перспективы Развития». – М. – 2015. – Т.2. – С.48–49.

7. **Ухатова, Ю.В.** Совершенствование существующих методов и приемов селекции и семеноводства малины и ежевики на основе использования биотехнологических подходов / **Ю.В. Ухатова**, С.Е. Дунаева, Л.Р. Колючая, П.Г. Кузнецов, Т.А. Гавриленко // Материалы Междунар. научно-пр. конф. «Методы и технологии в селекции растений и растениеводстве». – Киров: НИИСХ Северо-Востока, 2015. – С.248–252.

8. **Ухатова, Ю.В.** Криоконсервация образцов культурных видов картофеля из коллекции ВИР / **Ю.В. Ухатова**, Н.А. Швачко, Т.А. Гавриленко // «Картофелеводство»: Материалы междунар. научно-практ. конф. «Развитие новых технологий селекции и создание отечественного конкурентоспособного семенного фонда картофеля». – ФГБНУ ВНИИКХ; под ред. С. В. Жеворы. – М., 2016. – С.22–27.

9. Апаликова, О.В. Элиминация вирусных инфекций из микрорастений образцов культурных видов картофеля / О.В. Апаликова, О.Ю. Антонова, **Ю.В. Ухатова**, А.Р. Шувалова, Т.А. Гавриленко // Тез. докл. междунар. науч. конф., посв. 125-л. со д.р. С.М. Букасова «Проблемы систематики и селекции картофеля». – СПб, ВИР, 2016. – С.31–32.

10. **Ухатова, Ю.В.** Сохранение биоразнообразия образцов рода *Rubus* L. в *in vitro* и криоколлекциях / **Ю.В. Ухатова**, С.Е. Дунаева, Л.Е. Шувалова, К.Ш. Позднякова, Т.А. Гавриленко // Сборник научных трудов Государственного Никитского ботанического сада. – 2017. – № 144. – Т.1. – С.71–75.