Отличительной чертой яиц возобновленных кладок от основных по биохимическим показателям является то, что первые и третьи яйца содержали больше каротиноидов, чем соответствующие в основных, но различия имели низкую степень достоверности - $t_{st}=1,3$. Для вторых яиц данный показатель выше в основном цикле при значении $t_{st}=2,1$. По содержанию витамина А во вторых и третьих яйцах основных кладок показатель с высокой достоверностью $t_{st}=3,7$ и $t_{st}=3,0$ был выше, чем в тех же у возобновленных. Для первых яиц различия были в пределах $t_{st}=1,8$.

Существенные различия по уровню кислотности желтка и белка были выявлены в яйцах основного и возобновленного цикла размножения. Так в желтке первых и вторых яиц возобновленных кладок среда была менее кислой, чем в основных в пределах статистически достоверных $-t_{st}=6,8$ и $t_{st}=2,4$ соответственно. Для третьих яиц эти различия незначительны – $t_{st}<1$. Для белка показатель рН был в первых и вторых яйцах возобновленных кладок также статистически достоверно выше, чем в основных – $t_{st}=5,2$ у первых и $-t_{st}=2,8$ у вторых, что говорит об увеличении основных свойств (хим. терминология) в белковой среде.

В качестве заключения к изложенному материалу следует отметить, что яйца в кладке сизой чайки различаются не только по морфологическим показателям [2], но и активностью биохимических процессов в инкубируемых яйцах в зависимости от очередности их откладки. Исследование яиц из возобновленных кладок показали вариабельность значения биохимических индикаторов в зависимости от ранга яиц с более высокими значениями в первых отложенных яйцах. Что позволяет предположить их значимость в формировании численности и структуры гнездовой популяции.

1. Дьяконова И.В., Дьяконов Ю.В. Возобновленные кладки как один из механизмов поддержания численности популяции птиц в период размножения // Известия Самарского научного центра РАН Российской академии наук. 2014. Т.16, № 5 (1) с. 469 – 472.
2. Дьяконова И.В., Дьяконов Ю.В. Сравнительный анализ яиц основных и возобновленных яйцекладок сизой чайки (*Larus canus* L) //Наука и образование: новое время (сетевое издание) 2018. № 2.

Егорова Д.А., Молканова О.И.

Предотвращение фенольной экссудации *Chamaenerion angustifolium* (L.) Scop. в культуре in vitro

ФГБУН Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН
(Россия, Москва)

doi: 10.18411/lj-11-2019-260

idsp: lj-11-2019-260

Аннотация

Chamaenerion angustifolium (L.) Scop. характеризуется широким комплексом хозяйственно-полезных свойств. Оптимальным способом размножения данной культуры является клональное микроразмножение. Однако размножение *Ch. angustifolium* in vitro сопряжено с определенными трудностями, обусловленными наличием в химическом составе большого количества полифенольных соединений, приводящих к фенольной экссудации растительных тканей и питательной среды. Изучали влияние антиоксидантов (аскорбиновой, лимонной кислот) и сорбента (поливинилпирролидона) на рост и развитие регенерантов. Наиболее оптимальной питательной средой для клонального микроразмножения *Ch. angustifolium* оказалась среда Мурасиге-Скуга, содержащая 50 мг/л аскорбиновой и 50 мг/л лимонной кислот. Коэффициент размножения составил $5,2 \pm 0,3$.

Ключевые слова: *Chamaenerion angustifolium*, фенольная экссудация, клональное микроразмножение, коэффициент размножения

Abstract

Chamaenerion angustifolium (L.) Scop. is characterized by a wide range of economically useful properties. The optimal way to propagate this culture is clonal micropropagation. However, *in vitro* propagation of *Ch. angustifolium* is associated with certain difficulties due to presence of large quantities of polyphenolic compounds in chemical composition leading to phenolic exudation of plant tissues and nutrient medium. The effect of antioxidants (ascorbic and citric acids) and sorbent (polyvinylpyrrolidone) on growth and development of regenerants was studied. The most optimal nutrient medium for *Ch. angustifolium* clonal micropropagation was Murashige-Skoog medium containing 50 mg/l ascorbic acid and 50 mg/l citric acid. The reproduction rate was 5.2 ± 0.3 .

Keywords: *Chamaenerion angustifolium*, phenolic exudation, clonal micropropagation, reproduction rate

Chamaenerion angustifolium (L.) Scop. – иван-чай узколистый относится к семейству Onagraceae Juss. – Кипрейные. Плантации *Ch. angustifolium* характеризуется широким комплексом хозяйственно-полезных свойств и могут одновременно использоваться на кормовые, пищевые, медоносные, лекарственные и технические цели [1]. Сырье *Ch. angustifolium* является богатым источником полифенолов (флавоноидов, фенольных кислот и дубильных веществ), стероидов, тритерпеноидов и жирных кислот. Наиболее интересной группой являются макроциклические эллаготанины (энотеины В и А и их производные). Основным активным компонентом растительного материала является энотеин В (2–14%) [2]. Практическое осуществление семенного способа размножения связано с рядом трудностей, обусловленных биологическими особенностями процесса прорастания семян и развития всходов [3, 4]. Также для *Ch. angustifolium* характерна межвидовая гибридизация, осложняющая получение генетически однородного материала [2]. Традиционный вегетативный способ размножения (ризомами и зелеными черенками) характеризуется неэффективностью разработанных технологий для получения достаточного количества растений в течение года [3, 4]. Одним из наиболее перспективных методов получения большого количества единиц посадочного материала иван-чая является клональное микроразмножение. В лаборатории биотехнологии растений Главного ботанического сада имени Н.В. Цицина Российской академии наук (ГБС РАН) был проведен цикл работ [5, 6], посвященный размножению *in vitro* белоцветковой формы иван-чая. В 2016 году был разработан протокол, описывающий быстрый и высокоэффективный способ регенерации побегов из эксплантов *Ch. angustifolium* лиловоцветковой формы в условиях *in vitro* [2].

Ряд авторов [2, 7] отмечает, что при культивировании *in vitro* *Ch. angustifolium* существует проблема гибели большого количества эксплантов на стадии инициации из-за окисления фенольных соединений. Многие растения, особенно лекарственные и ароматические, содержат большое количество фенольных соединений, концентрация которых может сильно варьировать в разных генотипах одного и того же вида [8]. В результате повреждений при изолировании экспланта, активируются ферменты, окисляющие фенолы [9]. В щелочной и нейтральной среде фенолы окисляются в хиноны, ингибирующие деление и рост клеток, что ведет к гибели первичного экспланта или к уменьшению способности растительных тканей к пролиферации. Для снижения отрицательного воздействия полифенолов на развитие эксплантов на этапе микроразмножения в качестве антиоксидантов целесообразно добавлять в питательную среду антиоксиданты (аскорбиновую, лимонную кислоты), сорбенты (поливинилпирролидон, активированный уголь), снижать освещенность до 500 кл и уменьшать период беспересадочного культивирования в 2 раза [10, 11].

Данное исследование посвящено совершенствованию состава питательной среды для *Ch. angustifolium in vitro* с целью предотвращения гибели эксплантов на стадии

инициации и потери регенерационной способности из-за фенольной интоксикации растительных тканей.

Материалы и методы исследований

В работе были использованы растения лиловоцветковой формы *Ch.angustifolium*. Подготовку эксплантов и введение их в культуру *in vitro* производили в стерильных условиях согласно методике, изложенной в патенте [5,6]. Для введения в культуру *in vitro* *Ch.angustifolium* и изучения влияния антиоксидантов на рост и развитие микрорастений на стадии собственно размножения использовали питательную среду MS (Murashige and Skoog 1962), дополненную регулятором роста 6-BAР (6-бензиламинопурин) в концентрации 0,1 мг/л. В качестве антиоксидантов применяли лимонную и аскорбиновую кислоту (в концентрации 50 мг/л и 100 мг/л), а также сочетание аскорбиновой и лимонной кислот (в концентрации 25 мг/л и 50 мг/л). В качестве сорбента использовали PVP (поливинилпирролидон) в концентрации 50 мг/л и 100 мг/л. В качестве контроля использовали среду MS без добавления антиоксидантов и сорбентов. Степень фенольной экссудации (выделение фенольных соединений в питательную среду) оценивалась визуально, по интенсивности потемнения питательной среды: экссудация отсутствует или незначительная <10%; низкая экссудация 10–25%; средняя экссудация 25–50%; высокая экссудация >50% [12]. Опыты проводили в 3-кратной повторности, по 10 эксплантов в каждом варианте. На стадии размножения измеряли длину побега, определяли число микропобегов и рассчитывали коэффициент размножения. Статистическую обработку полученных результатов проводили методами параметрической статистики.

Результаты и обсуждение

Часто трудностью для получения стерильной культуры и дальнейшего успешного клонального микроразмножения является побурение тканей первичных эксплантов и питательных сред за счет экссудации фенольных соединений из поверхности срезов.

Наибольшую фенольную интоксикацию (26,7%) наблюдали в контрольном варианте (табл.1).

Таблица 1.

Влияние антиоксидантов/сорбента и их концентраций на контроль фенольной экссудации в питательной среде

Антиоксиданты и сорбент	Концентрация, мг/л	Фенольная экссудация, %			
		Отсутствует или незначительная	Низкая	Средняя	Высокая
Контроль	-	3,3	16,7	53,3	26,7
Аскорбиновая кислота	50	20,0	46,7	26,7	6,7
	100	30,0	43,3	23,3	3,3
Лимонная кислота	50	30,0	30,0	33,3	6,7
	100	26,7	36,7	33,3	3,3
Аскорбиновая + лимонная кислоты	50	76,7	13,3	6,7	3,3
	100	70,0	16,7	13,3	0,0
PVP	50	26,7	60,0	10,0	3,3
	100	63,3	33,3	3,3	0,0

Оптимальный результат по уменьшению отрицательного влияния фенолов был получен на питательных средах, содержащих поливинилпирролидон. При этом фенольная экссудация уменьшалась с увеличением содержания сорбента в два раза. Наименее эффективным антиоксидантом оказалась лимонная кислота. Хотя при увеличении ее концентрации в 2 раза высокая экссудация снизилась на 3,4%, одновременно число вариантов с низкой экссудацией возросло на 6,7%. Добавление аскорбиновой кислоты способствовало снижению фенольной интоксикации, и при

повышении концентрации кислоты в 2 раза число непораженных эксплантов выросло в 1,5 раза. Хотя Turker et al. [7] сообщают о решении проблемы интоксикации фенольными метаболитами путем добавления в питательные среды 100 мг/л аскорбиновой кислоты, Dreger et al. [2] отмечают, что антиоксидантный эффект витамина С был недостаточным в их исследованиях. Сочетание аскорбиновой и лимонной кислот в концентрациях 25 мг/л позволило получить более 76,7% непораженных эксплантов. При увеличении концентраций кислот в 2 раза высокая экссудация была нивелирована, однако число непораженных эксплантов уменьшилось на 6,7%.

Кроме этого, определяли влияние антиоксидантов и сорбента и их концентраций на морфометрические показатели *Ch. angustifolium* (табл. 2).

Таблица 2.

Влияние антиоксидантов на морфометрические показатели Ch. angustifolium

Антиоксиданты	Концентрация, мг/л	Морфометрические показатели		
		Длина микропобега, см	Число микропобегов, шт.	Коэффициент размножения
Контроль	-	8,5±0,7	1,1±0,1	2,1±0,3
Аскорбиновая кислота	50	13,1±1,1	1,9±0,2	3,4±0,3
	100	18,0±1,4	2,3±0,3	4,0±0,4
Лимонная кислота	50	14,1±1,4	2,0±0,2	3,1±0,4
	100	12,5±0,8	1,8±0,2	3,4±3
Аскорбиновая + лимонная кислоты	50	16,9±1,1	2,2±0,2	4,0±0,3
	100	23,3±1,1	2,4±0,2	5,2±0,3
PVP	50	14,6±1,6	2,3±0,2	3,7±0,4
	100	12,5±1,7	1,8±0,2	3,2±0,3

Сравнительный анализ полученных данных на всех вариантах питательных сред, кроме контроля, не показал существенной разницы между числом микропобегов. Наименьшее значение этого показателя (1,1±0,1 шт.) наблюдали в контрольном варианте, для которого была характерна частичная гибель эксплантов из-за высокой фенольной экссудации, а также замедление роста и развития регенерантов.

При изучении влияния различных антиоксидантов и концентраций на длину микропобегов максимальное значение показателя (23,3±1,1 см) было отмечено на среде, содержащей 50 мг/л аскорбиновой и лимонной кислот. Существенное увеличение длины микропобега наблюдали на средах, содержащих 100 мг/л аскорбиновой кислоты и 25 мг/л аскорбиновой и лимонной кислот (18,0±1,4 см и 16,9±1,1 см соответственно). В остальных вариантах по сравнению с контролем также наблюдали увеличение длины микропобега, однако между показателями не было существенных различий.

Установлено, что все исследуемые антиоксиданты и сорбенты обеспечивали увеличение коэффициента размножения. На среде с добавлением аскорбиновой и лимонной кислоты (по 50 мг/л) этот показатель существенно превышал значения, полученные при использовании других концентраций, и составил 5,2±0,3.

В остальных вариантах коэффициент размножения варьировал слабо. На питательных средах, содержащих поливинилпирролидон, листья и побег становились обводненными, для листовых пластинок было характерно нарушение морфологии и скручивание. Растения теряли способность к пролиферации и, как следствие, имели низкий коэффициент размножения.

Таким образом, оптимальный результат по уменьшению отрицательного влияния фенолов был получен на питательных средах, содержащих

поливинилпирролидон, однако на данных средах наблюдали обводнение микропобегов, которое приводило к укорачиванию побега и снижению коэффициента размножения. В связи с этим наиболее эффективной питательной средой для клонального микроразмножения *Ch. angustifolium* является среда, содержащая 50 мг/л аскорбиновой и 50 мг/л лимонной кислот. Проявление фенольной экссудации на этой среде составило 30%, при этом 16,7% относились к низкой экссудации, длина побега ($23,3 \pm 1,1$ см) и коэффициент размножения ($5,2 \pm 0,3$) были максимальными.

Работа выполнена в рамках ГЗ ГБС РАН (№118021490111-5).

1. Корсун В.Ф., Виктор В.К., Корсун Е.В., Данышин Е.А.. Русский Иван-чай. М.: Простор Оптима, 2015. 185 с.
2. Dreger M., Makowiecka J., Michalik J., Wielgus T. Application of multi-shoots cultures in micropropagation of willow herb (*Chamaenerion angustifolium* (L.) Scop.) // *Herba Polonica*. 2016. N 62.3. С. 28-39. doi: 10.1515/hepo-2016-0015.
3. Шапиро Я.С. Некоторые аспекты культивирования кипрея узколистного (*Chamaenerion angustifolium* (L.) Holub, Onagraceae). Известия Санкт-Петербургского государственного аграрного университета. — 2015. — № 39. — С. 29-32.
4. Старковский Б.Н. Разработка агроприемов при возделывании кипрея узколистного на кормовые цели // Автореф. дис...канд. с.-х. наук. — Вологда, 2003. 18 с.
5. Molkanova O., Egorova D., Mitrofanova I. Preservation characteristics of valuable plant species in in vitro genebanks at russian botanical gardens // *In Vitro. Cellular & Developmental Biology*. 2018. V.54. Pp. 546-547. <https://doi.org/10.1007/s11627-018-9929-7>
6. Способ клонального микроразмножения иван-чая узколистного (*Chamaenerion angustifolium* (L.) Holub) // Патент России № 2016147063, 26.07.2018 / Егорова Д.А., Горбунов Ю.Н., Молканова О.И.; патентообладатель ФГБУН ГБС РАН..
7. Turker A.U., Mutlu E.C., Yildirm A.B. Efficient in vitro regeneration of fireweed, a medicinal plant // *Acta Physiol Plant* 2008; 30(4):421-426.
8. Nayanakantha N.M.C., Singh B.R., Kumar A. (2010). Improved culture medium for micropropagation of *Aloe vera* L. *Trop Agric Res Exten* 13:87–93
9. Гвасалия М.В. Спонтанные и индуцированные сорта и формы чая (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) во влажных субтропиках России и Абхазии, перспективы их размножения и сохранения в культуре in vitro // дис. ... канд. биол. наук — Краснодар, 2015. 159 с.
10. Rani V., Raina S.N. Genetic fidelity of organized meristem derived micropropagated plants: A critical reappraisal // *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant*. 2000. V. 36. Pp. 319–330.
11. Ветчинкина Е. М. Сохранение редких видов растений в генетических коллекциях in vitro / Ветчинкина Е. М., Ширнина И. В., Ширнин С. Ю., Молканова О. И. // *Вестн. Балт. гос. ун-та им. И. Канта*. — 2012. — Вып. 7. — С. 109–118.
12. Çördük N, Aki C (2011) Inhibition of browning problem during micropropagation of *Sideritis trojana* bornm., an endemic medicinal herb of Turkey. *Rom Biotechnol Lett* 16:6760–6765

Прибыткова Е.В.^{1,2}, Терентьев К.Ю.^{1,2}, Шанина Г.И.²

Применение метода определения эмбриотоксичности для оценки качества воды р. Северная Двина

¹ФГБУН Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики имени академика Н.П. Лаверова Российской академии наук

²ФГАОУ ВО Северный (Арктический) федеральный университет имени М.В. Ломоносова

(Россия, Архангельск)

doi: 10.18411/lj-11-2019-261

idsp: ljjournal-11-2019-261

Аннотация

Работа представляет результаты использования метода биотестирования воды на оплодотворенной икре *Danio rerio*. Для работы были отобраны образцы воды из р. Северная Двина вниз по течению от г. Новодвинска до г. Архангельска. В ходе эксперимента фиксировались микроскопическим методом летальные и сублетальные