УДК 635.9:58.085

UDC 635.9:58.085

DOI 10.30679/2219-5335-2020-6-66-270-283

DOI 10.30679/2219-5335-2020-6-66-270-283

**ВЛИЯНИЕ КАЛЬЦИЯ
НА ФИЗИОЛОГО-
БИОХИМИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ
ГИДРАНГЕИ КРУПНОЛИСТНОЙ
(*HYDRANGEA MACROPHYLLA* SER.)
В МЕДЛЕННОРАСТУЩЕЙ
КУЛЬТУРЕ *IN VITRO***

**EFFECT OF CALCIUM
THE PHYSIOLOGICAL
AND BIOCHEMICAL PARAMETERS
OF LARGE-BED HYDRANGEA
(*HYDRANGEA MACROPHYLLA* SER.)
IN A SLOW-GROWING
CULTURE *IN VITRO***

Маляровская Валентина Ивановна
канд. биол. наук
ведущий научный сотрудник
зав. отделом биотехнологии
e-mail: malyarovskaya@yandex.ru

Malyarovskaya Valentina Ivanovna
Cand. Biol. Sci.
Leading Research Associate
Head of Biotechnology Department
e-mail: malyarovskaya@yandex.ru

Малюкова Людмила Степановна
д-р биол. наук
профессор РАН
главный научный сотрудник
лаборатории агрохимии
и почвоведения
e-mail: Malukovals@mail.ru

Malyukova Lyudmila Stepanovna
Dr Sci. Biol.
Professor of the RAS
Chief Research Associate
of Agric-chemistry
and Soil Science Laboratory
e-mail: Malukovals@mail.ru

Конинская Наталья Григорьевна
младший научный сотрудник
отдела биотехнологии
e-mail: natakoninskaya@mail.ru

Koninskaya Natalia Grigorievna
Junior Research Associate
of Biotechnology Department
e-mail: natakoninskaya@mail.ru

*Федеральное государственное
бюджетное учреждение науки
«Федеральный исследовательский центр
«Субтропический научный центр
Российской академии наук»,
Сочи, Россия*

*Federal Research
Centre the Subtropical
Scientific Centre
of the Russian
Academy of Sciences,
Sochi, Russia*

Для оптимизации условий медленно растущей культуры значительный интерес представляет исследование эффективности введения в питательные среды различных ингибиторов роста (осмотики и т.п.) и катионов, в частности кальция. В этой связи была поставлена цель – выявить влияние кальция и маннита на физиолого-биохимические параметры гидрангеи крупнолистной в медленно растущей культуре *in vitro*. В статье представлены результаты

To optimize the conditions of a slowly growing culture, of considerable interest is the study of the effectiveness of introducing the various growth inhibitors (osmotics, etc.) and cations, in particular calcium, into nutrient media. In this regard, the goal was – to identify the effect of calcium and mannitol the physiological and biochemical parameters of large-leaved hydrangea in a slow-growing *in vitro* culture. The results of a study to optimize

исследования по оптимизации условий культивирования гидрангеи крупнолистной (*Hydrangea macrophylla* Ser.) в медленнорастущей культуре *in vitro*. Изучали влияние различных концентраций кальция (440-660-880 мг/л) при осмотическом стрессе, который моделировали путем внесения маннита в концентрации 40 г/л в питательную среду. Оценивали морфометрические показатели растений – высоту микропобега, количество листьев на микропобеге, количество междоузлий, количество корней, длину корней, относительную электропроводность листьев и содержание свободного пролина. Результаты исследований показали возможность беспересадочного сохранения в культуре *in vitro* в течение 4-8 месяцев микропобегов и микрорастений гидрангеи крупнолистной. Проведенные эксперименты выявили способность изучаемых растений снижать кинетику роста и сохранять жизнеспособность при повышенных концентрациях кальция в питательной среде (CaCl_2 660 и 880 мг/л). Показано, что добавление маннита в концентрации 40 г/л в питательную среду вызывало сильный осмотический стресс у растений-регенерантов гидрангеи (при длительном культивировании), приводя к угнетению роста и развития растений, снижению стабильности клеточных мембран и накоплению свободного пролина. В условиях осмотического стресса увеличение концентрации кальция в питательной среде способствовало более интенсивному накоплению свободного пролина, что повышало устойчивость микропобегов.

Ключевые слова: ГИДРАНГЕЯ КРУПНОЛИСТНАЯ (*HYDRANGEA MACROPHYLLA* SER.), МЕДЛЕННОРАСТУЩАЯ КУЛЬТУРА *IN VITRO*, ОСМОТИЧЕСКИЙ СТРЕСС, ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ, ВЛИЯНИЕ КАЛЬЦИЯ

the cultivation of large-leaved hydrangea (*Hydrangea macrophylla* Ser.) in a slow-growing *in vitro* culture are presented. We studied the effect of various concentrations of calcium (440-660-880 mg/L) under osmotic stress, which was modeled by the introduction of mannitol at a concentration of 40 g/L in a nutrient medium. The morphometric parameters of the plants were estimated as the height of the microshoots, the number of leaves on the microshoot, the number of internodes, the number of roots, the length of the roots, the relative electrical conductivity of the leaves, and the content of free proline. The results of the studies showed the possibility of non-stop preservation in culture *in vitro* for 4-8 months of microshoots and microplants of large-leaved hydrangea. The experiments revealed the ability of plants studied to reduce the kinetics of growth and maintain viability at elevated concentrations of calcium in the nutrient medium (CaCl_2 660 and 880 mg/L). It is shown that the addition of mannitol at a concentration of 40 g/L to the nutrient medium caused a strong osmotic stress in hydrangea regenerant plants (with prolonged cultivation), leading to inhibition of plant growth and development, decrease in cell membrane stability and accumulation of free proline. Under conditions of osmotic stress, an increase in the concentration of calcium in the nutrient medium contributed to a more intensive accumulation of free proline, which increased in the stability of microprobe.

Key words: LARGE-LEAVED HYDRANGEA (*HYDRANGEA MACROPHYLLA* SER.), SLOWLY-GROWING CULTURE *IN VITRO*, OSMOTIC STRESS, NUTRIENT MEDIUM, INFLUENCE OF CALCIUM

Введение. Создание коллекций растений *in vitro* связано с рядом требований, предъявляемых к закладываемому на хранение материалу. Растения должны быть введены в культуру *in vitro*, освобождены от патогенов и для каждого культивара должны быть оптимизированы способы его микроразмножения [1-3]. По данным Т.А. Крицкой и А.С. Кашина [1], многие культуры органов и тканей растений обладают высокой скоростью роста, что сопряжено с частыми субкультивированиями. Например, экспланты *Silene cretacea* и *Potentilla vulgarica* во избежание старения культуры необходимо субкультивировать через 21 день [4]. Частые пересадки могут подвергать растения стрессу и потере физиологической стабильности. Поэтому разработка методов хранения растений в состоянии замедленного роста является перспективным направлением для сохранения генофонда, так как способность растений к регенерации может оказаться стабильнее в медленно растущих культурах [5].

Известно, что хранение в условиях замедленного роста позволяет поддерживать биологический материал от нескольких месяцев до 2-3 лет без субкультивирования, в зависимости от используемой технологии и вида растения [6, 7].

Существует несколько способов замедления роста культуры. Один из способов – внесение в питательную среду ингибиторов роста. Одни из них могут оказать осмотическое действие (например, маннит или сорбит), а другие имеют гормональную природу (например, абсцизовая кислота (АБК)) [2]. Также есть данные, что введение маннита и сорбита позволило сохранять жизнеспособность большинства сортов голубики высокой и одного сорта брусники обыкновенной в течение их длительного культивирования (4 месяца) без пересадок [8]. Некоторые авторы показывают, что добавление сорбита и маннита в концентрации от 50 до 200 ммоль в питательную среду снижало ростовую активность и увеличивало продолжительность субкультивирования у разных культур [9, 10]. Однако при высо-

ких концентрациях эти осмолиты снижали водный потенциал питательной среды, что затрудняло поступление воды в растение и создавало физиологический стресс [11].

Для оптимизации условий медленнорастущей культуры также значительный интерес представляет исследование эффективности введения в питательные среды различных катионов, в частности кальция. Известно, что ионы кальция обладают уникальными свойствами и универсальной способностью проведения самых различных сигналов, оказывающих на клетку первичное воздействие (гормоны, патогены, свет, гравитация и т.п.) [12].

В каждой из известных у растений систем сигнальной трансдукции важное значение как вторичный посредник имеют ионы Ca_2^+ . Кальций является эффективным регулятором метаболических процессов во всех клетках, где существуют системы, реагирующие на небольшие изменения его концентрации [13]. Установлено, что ионы Ca_2^+ имеют важное значение в механизме действия фитогормонов – ауксина, АБК и гиббереллинов, в функционировании фитохромов и т. п. [14, 15].

Кальций, как известно, снижает окислительные повреждения у различных растений при засухе путем индуцирования антиоксидантной системы, оказывает влияние на фотосинтез и водно-воздушный режимы, накопление стрессовых белков [16-20]. В этой связи была поставлена цель – выявить влияние кальция и маннита на физиолого-биохимические параметры гидрангеи крупнолистной в медленнорастущей культуре *in vitro*.

Объекты и методы исследований. Объектом исследования являлись культивируемые в депонированной коллекции (3 года) *in vitro* растения гидрангеи крупнолистной сорта 'Draps Wonder'. Для депонирования в качестве исходного материала использовали микропобеги гидрангеи. Культивирование микропобегов проводили при 16-часовом фотопериоде, температуре воздуха $+15\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, освещении 2000 лк и влажности воздуха 70 %.

В эксперименте по оптимизации условий культивирования медленнорастущей коллекции использовали различные концентрации хлорида кальция (440-660-880 мг/л) и 40 г/л маннита:

$\frac{1}{2}$ MS [21] (контроль);

В.-1. $\frac{1}{2}$ MS + CaCl₂ 440 мг/л + маннит 40 г/л;

В.-2. $\frac{1}{2}$ MS + CaCl₂ 660 мг/л;

В.-3. $\frac{1}{2}$ MS + CaCl₂ 660 мг/л + маннит 40 г/л;

В.-4. $\frac{1}{2}$ MS + CaCl₂ 880 мг/л;

В.-5. $\frac{1}{2}$ MS + CaCl₂ 880 мг/л + маннит 40 г/л.

Материал анализировали после четырех месяцев культивирования с помощью качественных и количественных показателей эксплантов: высота микропобега (см), количество листьев на микропобеге (шт.), количество междоузлий (шт.), количество корней (шт.), длина корней (см). Эксперименты проводили в трехкратной повторности, в каждой повторности – не менее 10 микропобегов.

Электропроводность измеряли портативным кондуктометром ST300C, датчик STCON3, с поверкой (Ohaus). Проводили 4 замера показаний через 0, 60, 120 минут после погружения листьев, а также после кипячения растительной пробы в течение 60 минут. Относительную электропроводность раствора рассчитывали по формуле: $REC = L1/L2 * 100 \%$, где L1- электропроводность через 0 мин, L2 – электропроводность в остывшем растворе после кипячения на водяной бане 1 час при 100 °С.

Содержание пролина в листьях (мг/г свежего листа) оценивали нингидриновым методом [21] на спектрофотометре УСФ-1 при длине волны 520 нм и пересчитывали с использованием стандартной формулы. Для статистической обработки полученных результатов использовали программное приложение Statistica 6.0.

Обсуждение результатов. В исследованиях по замедлению кинетики роста гидрангеи крупнолистной использовали влияние некоторых факторов: наличие в питательной среде различных концентраций хлорида кальция и осмотика – маннита. В вариантах наблюдали замедление роста эксплантов в 1,4-3,1 раза по сравнению с контролем, где отмечен активный рост микропобегов. В таблице даны морфометрические характеристики микропобегов и показано влияние на их рост различных концентраций хлорида кальция, а также хлорида кальция в соединении с маннитом.

Морфометрические показатели микропобегов
Hydrangea macrophylla после 4 месяцев депонирования
(размер исходного микропобега 1,0 см±0,2 мм)

Вариант	Высота микропобега, см	Количество листьев, шт.	Количество междоузлий, шт.	Количество корней, шт.	Длина корней, см
½ MS (контроль)	6,3±1,6	6,3±2,3	4,0±0,4	14,7±3,1	5,9±2,4
½ MS + CaCl ₂ 440 мг/л + маннит 40 г/л	2,2±0,2	3,1±0,4	2,1±0,1	1,9±0,2	1,9±0,2
½ MS + CaCl ₂ 660 мг/л	3,9±0,4	3,8±0,3	3,2±0,3	7,8±2,3	3,7±0,3
½ MS + CaCl ₂ 660 мг/л + маннит 40 г/л	1,8±0,2	3,1±0,2	1,7±0,4	1,4±0,1	1,2±0,2
½ MS + CaCl ₂ 880 мг/л	3,5±0,6	3,7±0,5	2,9±0,4	5,9±1,5	4,7±0,5
½ MS + CaCl ₂ 880 мг/л + маннит 40 г/л	2,1±0,5	3,2±0,1	1,9±0,2	1,7±0,2	0,9±0,1

Так, повышение концентрации хлорида кальция в питательной среде (660 мг/л и 880 мг/л) не только снижало рост в 1,6-1,8 раз, но оказывало существенное влияние на формирование листьев и корней (рис.1). Высота побегов на этих средах была 3,9 см и 3,5 см, соответственно, по сравнению с контролем 6,3 см. Регенеранты отличались морфологически более насыщенной зеленой окраской листьев и уплотненностью побега.

а

б

в

Рис. 1. Растения гидрангеи крупнолистной с хорошо развитой корневой системой после 4 месяцев культивирования на питательной среде $\frac{1}{2}$ MS: а – CaCl_2 440 мг/л; б – CaCl_2 660 мг/л; в – CaCl_2 880 мг/л.

Повышенная концентрация кальция в питательной среде при более длительном культивировании (8 месяцев) способствовала снижению роста микропобегов в 2,5 раза по сравнению с контролем (рис. 2).

а

б

Рис. 2. Растения гидрангеи крупнолистной после 8 месяцев культивирования на питательной среде $\frac{1}{2}$ MS: а – CaCl_2 440 мг/л (контроль); б – CaCl_2 880 мг/л.

Однако, при осмотическом стрессе, вызванном добавлением в питательную среду 40 г/л маннита, отмечено ингибирование роста и развития побегов, менее выраженное на вариантах с кальцием в концентрации

Физиолого-биохимические показатели листьев также подтверждали положительную роль кальция в культивировании микропобегов гидрангеи в стрессовых условиях. В качестве индикаторов состояния микропобегов использовали 2 показателя (относительную электропроводность и содержание пролина), которые, по мнению ряда исследователей, являются достаточно информативными при изучении ответных реакций на различные стрессы [23, 24].

К одним из начальных этапов реакции клеток на действие различных стрессоров относят изменение состояния мембран, показателем которого является её относительная электропроводность [25, 26]. Мембранная регуляция клетки, являясь частью всего комплекса систем регуляции организма, рассматривается как важнейший адаптационный механизм, определяющий сохранение жизнеспособности растения, а проницаемость мембран растительных клеток (интенсивность выхода из тканей электролитов) – показателем устойчивости растений к стрессам, в том числе к осмотическому.

Исследования показали, что в эксперименте по депонированию наибольшей стабильностью клеточных мембран характеризовался вариант с концентраций CaCl_2 660 мг/л. На фоне добавления маннита (осмотический стресс) для всех вариантов опыта отмечено увеличение относительной электропроводности листьев микропобегов, отражающее снижение стабильности клеточных мембран. При этом увеличение концентрации кальция в питательной среде в полтора и два раза приводило к разному эффекту: увеличению или снижению относительной электропроводности, соответственно (рис. 4).

Рис. 4. Относительная электропроводность микропобегов гидрангеи, культивируемой *in vitro* при осмотическом стрессе в сравнении с контролем (без маннита)

Известно, что при стрессе отмечается возрастание активности гидролитических процессов, которое ведет к накоплению стрессовых метаболитов, например, такого низкомолекулярного осмотически активного соединения, как пролин, который способен образовывать гидрофильные коллоиды, что защищает белки от денатурации при различных стрессах [27].

Для микропобегов гидрангеи при осмотическом стрессе также отмечено увеличение содержания свободного пролина, как результат адаптации (рис. 5). При этом на вариантах с увеличенными концентрациями кальция в питательной среде содержание пролина было значительно выше. Соотношение содержания пролина (после стресса/до стресса), которое отражает интенсивность накопления этого вещества и рассматривается как показатель устойчивости, также было выше на вариантах с полуторной и двойной концентрациями кальция.

Рис. 5. Содержание пролина в листьях растений-регенерантов гидрангеи, культивируемых на средах с различными концентрациями хлорида кальция в отсутствии (контроль) или присутствии маннита (40 г/л)

Выводы. Результаты исследований показали возможность беспересадочного сохранения в культуре *in vitro* в течение 4-8 месяцев микропобегов и микрорастений гидрангеи крупнолистной. Проведенные эксперименты выявили способность растений снижать кинетику роста и сохранять жизнеспособность при повышенных концентрациях кальция в питательной среде (CaCl_2 660 и 880 мг/л).

Добавление маннита в концентрации 40 г/л в питательную среду вызывало сильный осмотический стресс у растений-регенерантов гидрангеи (при длительном культивировании), приводя к угнетению роста и развития растений, снижению стабильности клеточных мембран и накоплению свободного пролина. В условиях осмотического стресса увеличение концентрации кальция в питательной среде способствовало более интенсивному накоплению свободного пролина. Относительная электропроводность листьев при внесении повышенных концентраций кальция не изменялась (CaCl_2 880 мг/л) или увеличивалась (CaCl_2 660 мг/л), что не позволило сделать однозначных выводов о роли кальция в развитии процессов липопероксидации в мембранах.

Литература

1. Крицкая Т.А., Кашин А.С. Особенности длительного депонирования культуры *in vitro* некоторых редких и исчезающих видов растений Саратовской области // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2016. Т. 16. Вып. 1. С. 74-80. DOI: 10.18500/1816-9775-2016-16-1-74-80
2. Митрофанова И.В. Соматический эмбриогенез и органогенез как основа биотехнологии получения и сохранения многолетних садовых культур. Киев: Аграрна наука, 2011. 344 с.
3. Коломиец Т.М., Маляровская В.И., Губаз С.Л. Создание и поддержание коллекции субтропических плодовых, цветочно-декоративных культур, редких и исчезающих видов растений Западного Кавказа в культуре *in vitro* // Плодоводство и ягодоводство России. 2015. Т. 43. С. 99-103.
4. Крицкая Т.А., Кашин А.С. Использование метода культуры *in vitro* для сохранения некоторых редких и исчезающих кальцефильных видов растений Саратовской области // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2013. Т. 13. Вып. 4. С. 65-73.
5. Вечернина Н.А. Сохранение биологического разнообразия редких, исчезающих видов, уникальных форм и сортов растений методами биотехнологии: дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.05 / Вечернина Нина Александровна. Барнаул, 2006. 325 с
6. Edison S., Unnikrishnan M., Vimala B., Santha V. Biodiversity of Tropical Tuber Crops in India. NBA Scientific Bulletin № 7, National biodiversity authority, Chennai, Tamil Nadu, India, 2006, P.60.
7. Коломиец Т.М., Маляровская В.И., Губаз С.Л., Самарина Л.С. Разработка режимов среднесрочного хранения *in vitro* эндемичного вида *Campanula sklerophylla* Kol. // Роль ботанических садов в сохранении и мониторинге биоразнообразия Кавказа: матер. юбил. межд. конф. (Сухум, 06-10 сентября 2016 г.). Сухум, 2016. С. 240-244.
8. Сидорович Е.А., Кутас Е.Н., Филипеня В.Л. Влияние осмотических ингибиторов на сохранение жизнеспособности интродуцированных сортов *Vaccinium corymbosum* L. и *Vaccinium vitis-idaea* L. в культуре *in vitro* // Докл. АН Беларуси. 1995. Т. 39. № 1. С. 63-66.

9. Camillo, J. *In vitro* maintenance, under slow-growth conditions, of oil palm germplasm obtained by embryo rescue / J. Camillo, J.E. Scherwinski-Pereira // Pesquisa Agropecuária Brasileira 2015. № 50 (5). P. 426-429.
10. El-Bahr, M.K., Abd EL-Hamid A., Matter M.A., Shaltout A., Bekheet S.A., El-Ashry A.A. *In vitro* conservation of embryogenic cultures of date palm using osmotic mediated growth agents // Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. 2016. № 14 (2). P. 363-370.
11. Claeys, H., Landeghem S.V., DuboisM., Maleux K., Inzé D. What is Stress? Dose-Response Effects in Commonly Used *in vitro* Stress Assays // Plant Physiology. 2014. 165. P. 519-527.
12. Kadota M., Niimi Y. Influences of Carbon Sources and their Concentrations on Shoot rolfiration and Rooting of 'Hosui' Japanese Pear // Horticultural Science, 2004. 39(7). 1681- 1683.
13. Медведев С.С., Маркова И.В. Роль ионов Ca^{2+} при передаче сигналов в клетках растений // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. Серия: Биология, 2001. С. 20-25.
14. Trewavas A.J., Malho R. Ca^{2+} signalling in plant cells: the big network //Current Opinion in Plant Biology. 1998. V. 1. P. 428–433.
15. Sanders D., Brownlee C., Harper J.F. Communication with calcium // The Plant Cell. 1999. V. 11. P. 691–706.
16. Bowler C., Fluhr B. The role of calcium and activated oxygen as signals for controlling cross-tolerance. Trends Plant Sci., 2000, 5: 241-243.
17. Fang W., Sha Y, Feng G., Jingjing et al. Effect of calcium on peanut (*Arachis Hypogae* L.) seedling growth, accumulation of reactive oxygen species and photoinhibition // American Journal Plant Science, 2015. Vol. 35. № 15. P. 1496-1504.
18. Liu H.T., Sun D.Y., Zhou R.G. Ca^{2+} and At CaM3 are involved in the expression of heat shock protein gene in *Arabidopsis*. Plant Cell Environ., 2005, 28: 1276-1284.
19. О формировании устойчивости у растений чая (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) при недостаточном водообеспечении на фоне корневого внесения кальция в виде природного удобрения / Л.С. Малюкова [и др.] // Сельскохозяйственная биология, 2016. Т. 5. № 5. С. 673-679.
20. Малюкова Л.С., Притула З.В. Влияние кальцийсодержащих удобрений на водный режим *Camellia Sinensis* (L.) Kuntze в условиях засухи // Вестник АПК Ставрополя, 2016. № 4(24) С. 120-123.
21. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. Vol. 15, № 13. P. 473–497.
22. Шихалеева Г.Н., Будняк А.К., Шихалеев И.И., Иващенко О.Л. Модифицированный метод определения пролина в растениях // The Journal of V.N. Karazin Kharkiv National University. Series: biology, 2015. 21(1112). 168-172.
23. Влияние салициловой кислоты на стабильность клеточных мембран микропобегов чая *in vitro* при холодовом стрессе / Л.С. Самарина [и др.] // Субтропическое и декоративное садоводство, 2019. № 69. С. 110-117. DOI: 10.31360/2225-3068-2019-69-110-117
24. Индукция осмотического стресса *in vitro* и его влияние на физиологические параметры у сеянцев *Citrus x meyeri* Yu. Tanaka / Л.С. Самарина [и др.] // Субтропическое и декоративное садоводство, 2017. № 60. С. 117-123.
25. Gao X.Y., Yang G.P., Xu Z.Q., Xu F.C. Effect of calcium on antioxidant enzymes of lipid peroxidation of soy-bean leaves under water stress. J. South China Agric. Univ., 1999, 2: 58-62.

26. Shu M.Y., Fan M.Q. Effect of osmotic stress and calcium on membrane-lipid peroxidation and the activity of defense enzymes in Fir Seedling // Forest Res., 2000, № 4. p. 391-396.

27. Maritim T.K., Kamunya S.M., Mireji P., Wendia C.M., Muoki R.C., Cheruiyot E.K., Wachira F.N. Physiological and biochemical response of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) to water-deficit stress. J. Horticultural Sci. Biotechnol., 2015, 90(4). 395-400. doi: 10.1080/14620316.2015.11513200. 0.4236/ajps.2012.34054.

References

1. Krickaya T.A., Kashin A.S. Osobennosti dlitel'nogo deponirovaniya kul'tury in vitro nekotoryh redkih i ischezayushchih vidov rastenij Saratovskoj oblasti // Izv. Sarat. un-ta. Nov. ser. Ser. Himiya. Biologiya. Ekologiya. 2016. T. 16. Vyp. 1. S. 74-80. DOI: 10.18500/1816-9775-2016-16-1-74-80

2. Mitrofanova I.V. Somaticheskij embriogenez i organogenez kak osnova biotekhnologii polucheniya i sohraneniya mnogoletnih sadovyh kul'tur. Kiev: Agrarna nauka, 2011. 344 s.

3. Kolomiec T.M., Malyarovskaya V.I., Gubaz S.L. Sozdanie i podderzhanie kollekcii subtropicheskikh plodovyh, cvetochno-dekorativnyh kul'tur, redkih i ischezayushchih vidov rastenij Zapadnogo Kavkaza v kul'ture in vitro // Plodovodstvo i yagodovodstvo Rossii. 2015. T. 43. S. 99-103.

4. Krickaya T.A., Kashin A.S. Ispol'zovanie metoda kul'tury in vitro dlya sohraneniya nekotoryh redkih i ischezayushchih kal'cefil'nyh vidov rastenij Saratovskoj oblasti // Izv. Sarat. un-ta. Nov. ser. Ser. Himiya. Biologiya. Ekologiya. 2013. T. 13. Vyp. 4. S. 65-73.

5. Vechernina N.A. Sohranenie biologicheskogo raznoobraziya redkih, ischezayushchih vidov, unikal'nyh form i sortov rastenij metodami biotekhnologii: dis. ... d-ra biol. nauk: 03.00.05 / Vechernina Nina Aleksandrovna. Barnaul, 2006. 325 s

6. Edison S., Unnikrishnan M., Vimala B., Santha V. Biodiversity of Tropical Tuber Crops in India. NBA Scientific Bulletin № 7, National biodiversity authority, Chennai, Tamil Nadu, India, 2006, P.60.

7. Kolomiec T.M., Malyarovskaya V.I., Gubaz S.L., Samarina L.S. Razrabotka rezhimov srednesrochnogo hraneniya in vitro endemichnogo vida *Campanula sklerophylla* Kol. // Rol' botanicheskikh sadov v sohranении i monitoringe bioraznoobraziya Kavkaza: mater. yubil. mezhd. konf. (Suhum, 06-10 sentyabrya 2016 g.). Suhum, 2016. S. 240-244.

8. Sidorovich E.A., Kutas E.N., Filipenya V.L. Vliyanie osmoticheskikh ingibitorov na sohranenie zhiznesposobnosti introducirovannyh sortov *Vaccinium corymbosum* L. i *Vaccinium vitis-idaea* L. v kul'ture in vitro // Dokl. AN Belarusi. 1995. T. 39. № 1. S. 63-66.

9. Camillo, J. In vitro maintenance, under slow-growth conditions, of oil palm germplasm obtained by embryo rescue / J. Camillo, J.E. Scherwinski-Pereira // Pesquisa Agropecuária Brasileira 2015. № 50 (5). P. 426-429.

10. El-Bahr, M.K., Abd EL-Hamid A., Matter M.A., Shaltout A., Bekheet S.A., El-Ashry A.A. In vitro conservation of embryogenic cultures of date palm using osmotic mediated growth agents // Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. 2016. № 14 (2). P. 363-370.

11. Claeys, H., Landeghem S.V., Dubois M., Maleux K., Inzé D. What Is Stress? Dose-Response Effects in Commonly Used in Vitro Stress Assays // Plant Physiology. 2014. 165. P. 519-527.

12. Kadota M., Niimi Y. Influences of Carbon Sources and their Concentrations on Shoot proliferation and Rooting of 'Hosui' Japanese Pear // Horticultural Science, 2004. 39(7). 1681- 1683.

13. Medvedev S.S., Markova I.V. Rol' ionov SA2+ pri peredache signalov v kletkah rastenij // Vestnik Nizhegorodskogo universiteta im. N.I. Lobachevskogo. Seriya: Biologiya, 2001. S. 20-25.
14. Trewavas A.J., Malho R. Ca2+ signalling in plant cells: the big network // Current Opinion in Plant Biology. 1998. V. 1. P. 428–433.
15. Sanders D., Brownlee C., Harper J.F. Communication with calcium // The Plant Cell. 1999. V. 11. P. 691-706.
16. Bowler C., Fluhr B. The role of calcium and activated oxygen as signals for controlling cross-tolerance. Trends Plant Sci., 2000, 5: 241-243.
17. Fang W., Sha Y, Feng G., Jingjing et al. Effect of calcium on pea nut (*Arachis Hypogae* L.) seedling growth, accumulation of reactive oxygen species and photoinhibition // American Journal Plant Science, 2015. Vol. 35. № 15. R. 1496-1504.
18. Liu H.T., Sun D.Y., Zhou R.G. Ca2+ and At CaM3 are involved in the expression of heat shock protein gene in Arabidopsis. Plant Cell Environ., 2005, 28: 1276-1284.
19. O formirovanii ustojchivosti u rastenij chaya (*Samellia sinensis* (L.) Kuntze) pri nedostatochnom vodoobespechenii na fone korneвого vneseniya kal'ciya v vide prirodnogo udobreniya / L.S. Malyukova [i dr.] // Sel'skohozyajstvennaya biologiya, 2016. T. 5. № 5. S. 673-679.
20. Malyukova L.S., Pritula Z.V. Vliyanie kal'cijsoderzhashchih udobrenij na vodnyj rezhim *Samellia Sinensis* (L.) Kuntze v usloviyah zasuhi // Vestnik APK Stavropol'ya, 2016. № 4(24) S. 120-123.
21. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. Vol. 15, № 13. P. 473-497.
22. Shihaleeva G.N., Budnyak A.K., Shihaleev I.I., Ivashchenko O.L. Modificirovannyj metod opredeleniya prolina v rasteniyah // The Journal of V.N. Karazin Kharkiv National University. Series: biology, 2015. 21(1112). 168-172.
23. Vliyanie salicilovoj kisloty na stabil'nost' kletochnyh membran mikropobegov chaya in vitro pri holodovom stresse / L.S. Samarina [i dr.] // Subtropicheskoe i dekorativnoe sadovodstvo, 2019. № 69. S. 110-117. DOI: 10.31360/2225-3068-2019-69-110-117
24. Indukciya osmoticheskogo stressa in vitro i ego vliyanie na fiziologicheskie parametry u seyancev Citrus h meyeri Yu. Tanaka / L.S. Samarina [i dr.] // Subtropicheskoe i dekorativnoe sadovodstvo, 2017. № 60. S. 117-123.
25. Gao X.Y., Yang G.P., Xu Z.Q., Xu F.C. Effect of calcium on anti-oxidant enzymes of lipid peroxidation of soy-bean leaves under water stress. J. South China Agric. Univ., 1999, 2: 58-62.
26. Shu M.Y., Fan M.Q. Effect of osmotic stress and calcium on membrane-lipid peroxidation and the activity of defense enzymes in Fir Seedling // Forest Res., 2000, № 4. p. 391-396.
27. Maritim T.K., Kamunya S.M., Mireji P., Wendia C.M., Muoki R.C., Cheruiyot E.K., Wachira F.N. Physiological and biochemical response of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) to water-deficit stress. J. Horticultural Sci. Biotechnol., 2015, 90(4). 395–400. doi: 10.1080/14620316.2015.11513200. 0.4236/ajps.2012.34054.