

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
**«БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**
(Н И У « Б е л Г У »)

ИНСТИТУТ ИНЖЕНЕРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ И ЕСТЕСТВЕННЫХ НАУК
КАФЕДРА БИОЛОГИИ

**КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ СОРТОВ *ARONIA* ИЗ
КОЛЛЕКЦИИ БОТАНИЧЕСКОГО САДА НИУ «БЕЛГУ» В
УСЛОВИЯХ *IN VITRO***

Магистерская диссертация
обучающейся по направлению подготовки 06.04.01 Биология
очной формы обучения, группы 07001642
Петровой Инны Викторовны

Научный руководитель
Доктор биологических наук,
с.н.с., Тохтарь В.К.

Рецензент
Заведующий лабораторией
биотехнологии растений
ФГБОУ ВО МГАУ,
к.б.н., Муратова С.А.

БЕЛГОРОД 2018

Оглавление

Введение.....	3
Глава 1. Обзор литературы по теме исследования.....	5
1.1. Основные подходы, разработанные для клонального микроразмножения растений.....	5
1.2. Механизмы действия фитогормонов.....	16
1.3. Описание рода <i>Aronia</i> L.	21
Глава 2. Материал и методы исследования.....	29
2.1. Объекты исследований.....	29
2.1.2. Определение сортов аронии, наиболее богатых ценными элементами.....	36
2.2. Методика проведения исследования.....	40
2.3. Учет результатов	43
Глава 3. Полученные результаты и их обсуждение.....	44
3.1. Определение содержания антоцианов в сортах рода <i>Aronia</i> L. из коллекции ботанического сада НИУ «БелГУ».....	44
3.2. Этап введения сортов рода <i>Aronia</i> L. в культуру <i>in vitro</i>	48
3.3. Влияние концентрации цитокинина на эффективность размножения и рост микропобегов сортов аронии.....	51
3.4. Влияние типа и концентрации ауксина на эффективность ризогенеза сортов аронии.....	55
3.5. Перевод растений в нестерильные условия культивирования	59
Выводы.....	63
Список использованных источников.....	64

Введение

Неблагоприятное воздействие экологических и антропогенных факторов на окружающую среду, а также низкая гарантия успешного воспроизводства видов и сортов растений традиционными методами обуславливает необходимость в создании технологии клонального микроразмножения растений в условиях *in vitro* для поддержания биоразнообразия, сохранения редких и исчезающих видов растений, производства пищевой биомассы и лекарств [Андреев, 2003; Белокурова и др., 2005].

Растения имеют ведущее значение в современной биосфере. Характер фитоценозов определяет облик ландшафтов. В то же время на территории Российской Федерации объемы производства посадочного материала растений ценных современных сортов недостаточны, а имеющийся материал дорогостоящий [Блюднева и др., 2016]. В связи с этим разработка современной технологии увеличения объёмов производства, равно как, и оздоровления и удешевления посадочного материала весьма актуальны.

Арония (*Aronia* L.) является редкой, нетрадиционной садовой культурой. Растения этого рода имеют большую ценность для Белгородской области, так как в их плодах содержится большое количество биологически активных веществ. Они являются источником мультивитаминов, способны укрепить иммунитет, нормализовать работу щитовидной железы, защитить организм от лучевого поражения. Кроме того, эти сорта имеют высокую декоративную ценность в течение всего вегетативного периода. Семена растений аронии не отличаются хорошей всхожестью. Поэтому для их размножения чаще всего используются черенки [Исаченко, 2002]. Разработка способов клонального микроразмножения аронии *in vitro* дает возможность проводить работы в течение всего года и сократить площади, необходимые для выращивания посадочного материала.

В настоящее время не существует полноценной технологии клонального микроразмножения изучаемых сортов из рода *Aronia*.

Целью выпускной квалификационной работы является оптимизация методов клонального микроразмножения сортов рода *Aronia* из коллекции Ботанического сада НИУ «БелГУ».

Задачи исследования:

1. Изучить содержание антоцианов в ягодах различных сортов рода *Aronia* L.;
2. Получить стерильные культуры исследуемых сортов аронии в условиях *in vitro*;
3. Определить концентрацию цитокинина при клональном микроразмножении сортов аронии;
4. Определить тип и наиболее эффективные концентрации ауксина для оптимизации процесса ризогенеза ароний;
5. Провести оценку выживаемости растений, полученных при использовании разработанных сред и режимов культивирования, в процессе их адаптации к нестерильным условиям.

Объектом исследования являлись различные виды и сорта рода *Aronia* из коллекции ботанического сада НИУ «БелГУ»:

- 1) Арония Мичурина, *A. mitschurini* «Amit»;
- 2) Арония сливолистная, *A. prunifolia* «Nero»;
- 3) Арония сливолистная, *A. prunifolia* «Viking»;
- 4) Арония черноплодная, *A. melanocarpa* «Hugin»;
- 5) Арония древовидная, *A. arbutifolia* «Brilliant».

В данной работе использовался анализ и обобщение специальной литературы, а также был поставлен ряд экспериментов для решения задач исследования.

Научная новизна исследования заключается в проведении первого полного исследования клонального микроразмножения *in vitro* сортов аронии

из коллекции Ботанического сада НИУ «БелГУ» с их последующей адаптацией к нестерильным условиям.

Основными методами исследования были методы, разработанные для клонального микроразмножения растений на разных стадиях их воспроизводства и адаптации [Тимофеева, Невмержицкая, 2012]. При анализе содержания антоцианов использовались разработанные методики определения количественного содержания антоцианов в растительном сырье [Giusti, Wrolstad, 2001]. Данные обрабатывались статистически. Для их обработки использовались статистическая программа Excel 2010.

Практическая значимость: средняя стоимость одного саженца аронии в настоящее время составляет 200 рублей, тогда как себестоимость растений, полученного методом клонального микроразмножения составляет 20 рублей.

Магистерская диссертация изложена на 70 страницах. Она состоит из оглавления, введения, трех основных разделов, выводов. Список использованных источников насчитывает 64 наименований. В работе используются 10 таблиц и 26 рисунков.

Глава 1. Обзор литературы по теме исследования

1.1. Основные подходы, разработанные для клонального микроразмножения растений

Обычно лаборатория биотехнологии состоит минимум из 3-х помещений. Это бокс, где ведутся стерильные работы; комната для приготовления питательных сред, хранения химикатов, оборудования и прочих вспомогательных мелочей; автоклавная. Вынесение автоклавов в отдельную комнату продиктовано требованиями безопасности, поскольку процесс стерилизации идет под давлением и в случае неисправности прибора могут случиться жертвы и разрушения [Катаева, 1983].

Впрочем, технический прогресс не стоит на месте и современные модели автоклавов более надежны и безопасны, с ними могут работать и необученные специально люди, а отдельных комнат не требуется.

Стерильные работы можно проводить в специальном помещении – микробиологическом боксе или же использовать ламинар-боксы. В любом случае полы и стены комнаты, где ведутся стерильные работы, должны быть моющимися (в идеале – кафельные) [Свитайло и др., 1988].

Помещение, где ведутся работы с культурами тканей необходимо периодически стерилизовать ультрафиолетовыми лампами (кварцевать), поэтому наличие любой растительности там исключено [Тимофеева, Невмержица, 2012].

Не рекомендуется в одних и тех же боксах вести работы с микробиологическими объектами и культурами клеток. Микроорганизмы более устойчивы к внешним факторам, и простерилизовать после работы с ними помещение гораздо труднее, особенно это касается работ с грибами [Катаева, 1983].

Все изложенное выше касается работ с непатогенным материалом. Уровни защиты при работе с патогенным материалом иные, и они требуют большей безопасности.

Выращивание изолированных клеток, тканей, органов, растений-регенерантов, водных культур и грибов, используемых в биотехнологии, проводят в условиях полной асептики, т.е. стерильно. Особое внимание следует обратить на чистоту посуды, предназначенной для приготовления питательных сред и их компонентов; на подготовку объектов к пересадке, пассированию и культивированию. Только некоторые объекты (хлорелла, азолла) можно выращивать в нестерильных условиях [Кухарчик и др., 2002].

Стерилизация – полное уничтожение микроорганизмов и их покоящихся форм (например, спор). Существуют разные методы стерилизации: с помощью влажного пара, сухого пара, облучения ультрафиолетовыми лучами, обработки химическими веществами и микрофльтрации [Сковородников, Райков, 2009].

Дробная стерилизация производится в аппарате Коха. При его отсутствии можно 3 раза с интервалом в день по полчаса обрабатывать пробирки со средой паром в обычной пароварке. Такая процедура убивает вегетативные клетки бактерий, но не споры. Промежутки между стерилизацией необходимы для прорастания спор и повышения чувствительности к паровой обработке. Этот прием используют для стерилизации, как питательных сред, так и посуды [Свитайло и др., 1988].

Автоклавирование – обработка влажным паром под давлением, производится в автоклавах. Вегетативные клетки бактерий и грибов гибнут через 5–10 минут уже при температуре около 60°C; для гибели спор дрожжей и грибов требуется температура 120°C в течение 15 минут. Продолжительность автоклавирования зависит от величины (теплоемкости) пробирок, колб и объема питательной среды в них [Сковородников, Райков, 2009].

Большинство культур в лабораторных условиях выращивают в пробирках, колбах Эрленмейера различного объема и чашках Петри одно- или многоразового использования. Вначале посуду тщательно моют с использованием детергентов, а также раствора двухромовокислого калия в

серной кислоте (хромпика). Вымытую посуду ополаскивают водопроводной, затем дистиллированной водой и высушивают в сушильном шкафу. Чтобы избежать заражения стерильных предметов из воздуха, перед стерилизацией их закрывают ватными пробками, заворачивают в оберточную бумагу или закрывают фольгой (у стаканов, колб достаточно завернуть только горлышко). Затем посуду можно стерилизовать двумя способами [Кашин, 1998].

Посуду выдерживают в автоклаве под давлением в течение 20-40 минут при температуре 100–130°C. Продолжительность автоклавирования зависит от его режима: при давлении 0,5 атмосферы – 20–40 минут, при 1 атм. – 15 минут [Катаева, 1983].

При сухом способе стерилизации чашки Петри, колбы, стаканы, завернутые в плотную бумагу, стерилизуют в сушильном шкафу при температуре 140°C в течение 2 часов, при температуре 180°C – 30 минут. При более высоких температурах ватные пробки буреют, а бумага становится ломкой [Кашин, 1998].

Инструменты (скальпели, пинцеты, иглы и т.д.) стерилизуют в сушильном шкафу. Шприцы, ножницы, пробочные сверла удобнее кипятить. Металлические предметы нельзя автоклавировать: под воздействием пара они ржавеют и тупятся. Непосредственно перед работой и в процессе её инструменты помещают в стакан со спиртом и обжигают в пламени спиртовки. Стерильный инструмент используют только для одноразовой манипуляции. Перед повторным употреблением его снова окунают в спирт и обжигают [Тимофеева, Невмержица, 2012].

Вату, марлю, ватные пробки, фильтровальную бумагу, халаты, косынки стерилизуют в автоклаве под давлением 2 атм. в течение 25–30 мин.

Автоклавирование питательных сред для выращивания культур тканей проводят после их разлива в пробирки или колбы под давлением 0,7–0,8 атм. при температуре 115–120°C в течение 15–30 минут, в зависимости от объема

среды. Если в результате стерилизации среда помутнела, следовательно, неправильно выбран режим стерилизации [Муратова, Шорников, 2008].

Органические жидкости, не выносящие нагревания, освобождаются от бактерий при пропускании через стерильные мелкопористые бактериальные фильтры с диаметром пор 0,45 мкм.

Работающий должен вымыть руки с мылом и протереть их спиртом, надеть стерильный халат, завязать волосы стерильной косынкой [Кухарчик и др., 2002].

Перед стерилизацией объекта его тщательно моют теплой водой с мылом, промывают дистиллированной водой, очищают от излишних тканей, снимают кожуру у корнеплодов и корней, кору у побегов, поверхностные листья у верхушек побегов, промывают дистиллированной водой и помещают на несколько секунд в 70% спирт (семена на 1–2 минуты). После этого сегменты корней, побегов, стеблей, клубней или семена переносят в стерилизующий раствор [Новикова и др., 2008].

Вид стерилизующего агента, его концентрация и время действия, зависящие от особенностей тканей исходных растений, необходимо подобрать таким образом, чтобы убить микроорганизмы и не повредить ткани экспланта. Для поверхностной стерилизации растительных объектов применяют следующие средства стерилизации: сулему (двуххлористая ртуть) (0,1%), хлорамин (2–10%), гипохлорит кальция (7–10% $\text{Ca}(\text{ClO})_2$) или натрия (NaOCl), перекись водорода (13–18%) и др. Хлорамин можно купить в аптеке. Для стерилизации можно использовать также хлорсодержащие растворы отбеливателей из хозяйственных магазинов, например, средство «Белизна». Свежие растворы отбеливателей при стерилизации нежных эксплантов, таких как молодые листочки, нужно разводить в 2 или даже в 3 раза. Эффективность стерилизации возрастает при добавлении нескольких капель твина–80 и твина–20 на литр стерилизующего раствора [Кухарчик и др., 2002].

Продолжительность стерилизации меристемы сулемой – 5 минут, семян – 15–20 минут, пергидролем соответственно 15 и 30 минут.

После стерилизации материал переносят в стерильную дистиллированную воду, выдерживают 10 минут, затем меняют воду ещё два раза, выдерживая в каждой порции по 15–20 минут. В стерильных чашках Петри или на стерильных листах бумаги, или на обожженной кафельной плитке обрезают стерильным скальпелем концы сегментов исходного материала, где клетки могут быть повреждены, и из средних зон нарезают кусочки тканей, которые высаживают на инициальную среду для образования каллусов. При стерилизации отрезков стебля или верхушечных почек в растворах сулемы или гипохлорита рекомендуется парафинировать срезы, чтобы стерилизатор не проник в сосуды, что может привести к интоксикации ткани [Новикова и др., 2008].

Ход работы [Свитайло и др., 1988]:

1. Простерилизовать инструменты, посуду и питательные среды, необходимые для проведения работ по выращиванию стерильных проростков и выращивания каллусных тканей.
2. Завернуть в плотную бумагу и простерилизовать сухим жаром в сушильном шкафу стеклянную посуду – колбы, чашки Петри.
3. Подвергнуть предварительной стерилизации в сушильном шкафу скальпели и пинцеты. Перед помещением в сушильный шкаф завернуть инструменты в плотную бумагу.
4. Простерилизовать в автоклаве дистиллированную воду в колбе. Для получения стерильной воды налейте в колбу 1/3 часть объема дистиллированной воды, закройте ватной пробкой, а сверху плотной бумагой или целлофаном, можно обернуть горлышко фольгой. Автоклавировать 30 минут при 1 атмосфере.
5. Простерилизовать в автоклаве в течение 20 мин при давлении 1 атм. пробирки с питательной средой, закрытые фольгой или ватными пробками, обернутыми плотной бумагой или целлофаном.

Метод клонального микроразмножения имеет ряд преимуществ перед существующими традиционными способами размножения [Муратова, Шорников, 2008; Новикова и др., 2008]:

1. Получение генетически однородного посадочного материала;
2. Освобождение растений от вирусов за счет использования меристемной культуры;
3. Высокий коэффициент размножения (10^5 - 10^6 – для травянистых, цветочных растений, 10^4 - 10^5 – для кустарниковых древесных растений и 10^4 – для хвойных);
4. Сокращение продолжительности селекционного процесса;
5. Ускорение перехода растений от ювенильной к репродуктивной фазе развития;
6. Размножение растений, трудно размножаемых традиционными способами;
7. Возможность проведения работ в течение всего года;
8. Возможность автоматизации процесса выращивания.

На эффективность микроклонального размножения влияет масса факторов различной природы. Это физиологические особенности вводимого в культуру растения, химические и физические условия культивирования. Наиболее важным моментом является выбор материнского растения и экспланта [Кашин, 1998].

При выборе материнского растения необходимо учитывать его физиологические, сортовые и видовые особенности. Исходные растения должны быть здоровы, не поражены грибными, бактериальными и вирусными болезнями. Кроме того, они должны находиться в состоянии интенсивного роста (выход из фазы покоя и переход к активному росту). Луковицы, корневища и клубни в состоянии покоя непригодны, перед введением в культуру их предварительно обрабатывают высокими или низкими температурами. Способность к размножению также детерминирована генетически. Например, земляника размножается всеми

способами, облепиха – ни одним, хотя в природе черенкуется. Двудольные обладают большей регенерационной способностью, чем однодольные и древесные [Сковородников, Райков, 2009].

Процесс клонального микроразмножения растений в классическом виде включает в себя четыре основных этапа [Murashige, Skoog, 1962]:

1. Введение растений в стерильную культуру в условиях *in vitro*;
2. Размножение растений в условиях *in vitro*;
3. Укоренение микроклонов в условиях *in vitro*;
4. Адаптация полученных регенерантов к нестерильным условиям.

На первом этапе размножения растений в условиях *in vitro* для успешного введения их в стерильную культуру экспланты подвергают поверхностной стерилизации. Чаще всего в качестве стерилизующих агентов используют соединения хлора, серебра и ртути, поскольку они наиболее эффективно освобождают поверхность исходного материала от бактериальной и грибной контаминации. Асептические экспланты помещают на питательные среды для индукции процессов регенерации [Новикова и др., 2008].

Успешное введение растений в культуру *in vitro* зависит от сроков изоляции, возраста, размера и типа эксплантов, а также интенсивности окисления полифенолов при инокуляции на питательные среды. Повреждение при ранении тканей первичных эксплантов способствует выбросу полифенолов и стимулирует активность полифенолоксидазы. В результате фенольного окисления образуются токсические вещества – хиноны. Питательная среда и ткани экспланта чернеют, в конечном счете, это может стать причиной гибели эксплантов. Решить проблему фенольного окисления позволяет предварительное культивирование эксплантов в жидких средах с добавлением антиоксидантов, таких как аскорбиновая кислота, диэтилдитиокарбамат или поливинилпирролидон, а также снижение интенсивности освещения или культивирование в темноте [Кутас, 2009]. Поэтому необходимо учитывать сезонную динамику накопления фенольных

соединений для определения сроков изоляции эксплантов. Схема клонального микроразмножения представлена на рисунке 1.

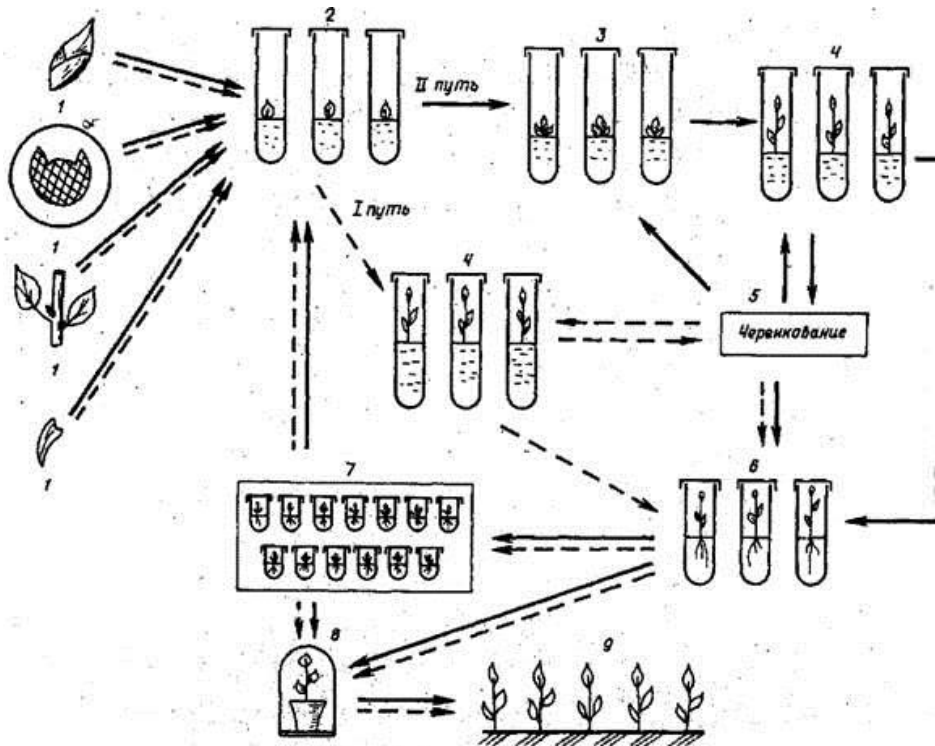


Рис. 1. Схема клонального микроразмножения растений методом активации развития существующих меристем (1-й путь), индукции возникновения адвентивных почек на экспланте (2-й путь): 1 – выбор исходного эксплантанта; 2 – получение стерильной культуры; 3 – образование адвентивных почек непосредственно на первичном экспланте; 4 – рост почек и формирование микропобегов; 5 – размножение микропобегов; 6 – укоренение микропобегов; 7 – депонирование размноженных растений-регенерантов при пониженной температуре; 8 – перевод в тепличные условия; 9 – высадка растений в поле

На этапе массового размножения растений необходимо использование различных экзогенных регуляторов роста. При определении оптимальных комбинаций и концентраций экзогенных цитокининов и ауксинов необходимо учитывать уровень биосинтеза регуляторов роста в тканях самого экспланта. Поскольку эндогенные ауксины и цитокинины синтезируются,

соответственно, в тканях листовых примордиев и верхушки корня, то воздействие экзогенными регуляторами роста зависит от типа используемых эксплантов [Соловых, 2009].

Для стимуляции побегообразования у эксплантов, не содержащих меристем необходимы и ауксины и цитокинины, в то время как пролиферация верхушек микропобегов может происходить без присутствия экзогенных ауксинов в среде [Сидорович, Кутас, 2011].

Реализация того или иного пути морфогенеза в системах *in vitro* определяется соотношением концентраций экзогенных регуляторов роста в питательной среде. Известно, что преобладание цитокининов в среде для регенерации способствует прямой регенерации побегов, а ауксинов – образованию корней или каллуса. Добавляя цитокинины в питательные среды, пролиферация побегов достигается либо за счет снятия апикального доминирования и развития пазушных почек, либо посредством дедифференциации клеток экспланта и формирования адвентивных побегов [Кухарчик и др., 2002].

Воздействие цитокининами лежит в основе клонального микроразмножения растений, поскольку они определяют уровень размножения, высоту побегов, а также частоту возникновения генетических вариаций. Кроме того, успешность и эффективность прохождения стадии собственно микроразмножения зависит от особенностей генотипа исходного растения, минерального состава питательных сред, а также от воздействия физических факторов при культивировании (свет, температура, влажность) [Катаева, 1983].

Микроклоны, полученные на стадии собственно микроразмножения, укореняют различными способами. В основе этих методов лежит обработка ауксинами, причем тип и концентрация ауксина для каждого вида и даже сорта определяется экспериментально.

Ризогенез чаще всего стимулируют в условиях *in vitro*. Регенеранты укореняют либо непосредственно на питательной среде, содержащей ИМК,

либо при культивировании на безгормональной среде, после предшествующего короткого замачивания их в водном растворе ИМК. Длительное воздействие ауксинами зачастую вызывает пролиферацию каллуса на базальном конце побега, из клеток которого впоследствии дифференцируются корни. Проводящая система таких корней не связана с проводящей системой побега, что приводит к гибели растений при дальнейшей адаптации. При коротких обработках регенерантов в растворе ауксинов, исключается образование каллуса, но корневая система, сформированная в условиях *in vitro* не функциональна, поскольку не имеет корневых волосков. Эта особенность может стать причиной гибели растений при переносе в условия *ex vitro* в субстрат для адаптации. Импульсная обработка ауксинами с последующим укоренением *ex vitro* непосредственно в почвенном субстрате или смеси торфа и песка, решает проблемы, связанные с укоренением *in vitro* и повышает выход качественного посадочного материала [Бутенко, 1999; Муратова, Шорников, 2008].

Адаптация микроклонов к условиям *ex vitro* является наиболее ответственным этапом микроразмножения, поскольку именно на этой стадии высока вероятность потери большого количества регенерантов. Развитие микроклонов в культуре *in vitro* способствует появлению ряда морфологических, анатомических и физиологических аномалий, которые затрудняют перевод растения в условия *ex vitro*. Растениям, выращенным в условиях *in vitro*, присущи гетеротрофный тип питания, низкая фотосинтетическая активность, ограниченная способность регулировать транспирацию, редукция кутикулярного воска, слабая дифференцировка мезофилла и недостаточное развитие проводящей системы [Катаева, 1983].

Перенос регенерантов в условия *ex vitro* связан с серьезными перестройками в морфо-анатомическом строении и физиологических процессах. Для успешной адаптации *ex vitro* и преодоления указанных выше ограничений растения переносят в грунт, сохраняя температурный режим, влажность и освещение на прежнем уровне. Затем постепенно снижают

влажность и одновременно повышают интенсивность освещения. В некоторых случаях обогащают атмосферу, в которой адаптируются растения, углекислым газом, что способствует повышению адаптивной способности микроклонов за счет закрытия устьиц и снижения испарения воды растениями [Новикова и др., 2008].

Таким образом, процесс клонального микроразмножения растений в классическом виде включает четыре основных этапа. Несмотря на достаточную разработанность основных подходов и принципов, которые необходимо соблюдать при поэтапном введении растений в культуру *in vitro*, для каждого отдельного вида и даже сорта должны быть подобраны специфичные условия культивирования. Поэтому изучение особенностей введения в культуру перспективных для использования сортов ароний из коллекции Ботанического сада НИУ «БелГУ» требует проведения экспериментальной работы на всех стадиях формирования растений.

1.2. Механизмы действия фитогормонов

Фитогормоны – это химические вещества, образующиеся в растениях и регулирующие их развитие и рост. Они образуются в активно растущих тканях на верхушках корней и стеблей. К фитогормонам обычно относят ауксины, гиббереллины и цитокинины, а иногда и ингибиторы роста, например, абсцизовую кислоту. В отличие от гормонов животных, они менее специфичны и часто оказывают свое действие в том же участке растения, где образуются. Многие синтетические вещества обладают таким же действием, как природные фитогормоны [Джигадло, 2005].

Фитогормоны контролируют все этапы онтогенеза растений. Деление и растяжение клеток, лежащие в основе всех процессов роста и морфогенеза, находятся у растений под контролем ауксинов и цитокининов, поэтому полное отсутствие этих фитогормонов для растений летально. Общий габитус и форма (архитектура) растения определяется действием ауксинов,

цитокининов и гиббереллинов. Ауксины, сконцентрированные в верхушке побега, подавляют рост боковых почек (апикальное доминирование), тогда как цитокинины это доминирование преодолевают, вызывая ветвление растений. Гиббереллины усиливают рост растения, активируя апикальные и интеркалярные (вставочные) меристемы. Ауксины способствуют образованию корней и определяют адаптивные изгибы растения в соответствии с направлением света или вектора силы тяжести (фото- и геотропизм). Формирование фотосинтетического аппарата и транспирация растений регулируются гормонами-антагонистами – цитокининами и абсцизовой кислотой: цитокинины вызывают дифференцировку хлоропластов и открывание устьиц, тогда как абсцизовая кислота подавляет оба эти процесса [Деменко, 2005; Ветчинкина, 2010]. Для многих растений те или иные фитогормоны (гиббереллины, цитокинины, этилен) могут быть индукторами или стимуляторами цветения. Последовательное участие фитогормонов необходимо для нормального формирования плодов и семян. Завязывание и рост плодов стимулируются ауксинами, гиббереллинами и цитокининами, выделяемыми семяпочками или семенами. Созревание и опадение плодов, а также листьев вызываются воздействием этилена и абсцизовой кислоты. Стрессовые воздействия на растения вызывают всплеск количества этилена, а водный дефицит – абсцизовой кислоты. Цитокинины, гиббереллины и, в ряде случаев, этилен способствуют прорастанию семян многих растений и повышают их всхожесть [Бутенко, 1999].

Ауксины – это вещества индольной природы. Основным фитогормоном типа ауксина является *b*-индолилуксусная кислота (ИУК). В верхушке проростка под влиянием одностороннего освещения вырабатывается вещество, которое передвигается вниз и вызывает изгиб. Было показано также, что удаление верхушки проростка (декапитация) резко замедляет рост нижележащих клеток, находящихся в фазе растяжения. Наиболее богаты ауксинами растущие части растительного организма: верхушки стебля, молодые растущие части листьев, почки, завязи,

развивающиеся семена, а также пыльца [Тимофеева, Невмержицкая, 2012]. Образование ауксинов в большинстве случаев идет в меристематических тканях. Ауксины передвигаются из верхушки побега вниз к его основанию, а далее от основания корня к его окончанию. Недостаток кислорода, торможение процесса дыхания с помощью различных ингибиторов приостанавливают передвижение ауксинов. Во взрослом дифференцированном растении при высокой концентрации гормона может наблюдаться и неполярное передвижение ауксинов вверх по растению с током воды по ксилеме [Муратова, Шорников 2008].

Ауксин, образующийся в кончике корня, может, по-видимому, передвигаться на короткие расстояния вверх, в зону растяжения. При изучении процессов синтеза ИУК, его транспорта и распределения между отдельными компартментами клетки большое значение имели опыты с мутантами [Калинин и др., 1992]. Основным источником для образования *b*-индолилуксусной кислоты (ИУК) является аминокислота триптофан. В клетках ауксин содержится в цитозоле и хлоропластах. Показано, что образование ИУК зависит от снабжения растения азотом, обеспечения растения водой. Освещение уменьшает содержание ауксинов, а затемнение увеличивает. Большое влияние на содержание ауксинов оказывает эпифитная микрофлора. Под влиянием микроорганизмов содержание ауксинов у высших растений заметно возрастает [Калинин и др., 1980]. По-видимому, именно через изменение содержания фитогормонов осуществляется первоначальное влияние условий внешней среды на процессы обмена веществ и рост. Содержание ауксинов меняется и в процессе онтогенеза растительного организма. Обычно в листьях максимум содержания ауксинов наступает в фазу бутонизации или цветения. Распускающиеся почки, прорастающие семена содержат большое количество ауксина. В период, когда процессы роста прекращаются (период покоя), содержание ауксинов падает. Как правило, между содержанием ауксинов и скоростью роста клеток имеется прямая зависимость. Она хорошо проявляется и при внесении

ауксинов извне. В целом, регуляция образования и разрушения ИУК – это один из способов регуляции ее содержания, а, следовательно, и процессов роста [Высоцкий, 1998; Бутенко, 1999; Муратова, Шорников, 2008].

Гиббереллины – широко распространенные среди растений вещества, обладающие высокой физиологической активностью, способствующие прорастанию семян, зацветанию растений. В настоящее время известно более 80 веществ, относящихся к группе гиббереллинов и обозначаемых номерами: ГА₁, ГА₂ и др. Не все гиббереллины обладают физиологической активностью. По химической структуре это производные дитерпенов – дитерпеноиды, состоящие из четырех изопреновых остатков. Наиболее распространенный гиббереллин А₃ – гибберелловая кислота (ГК). Остальные гиббереллины различаются в основном по структуре боковых цепочек. Растения на разных этапах онтогенеза могут различаться по набору гиббереллинов, активность которых может быть различной. Гиббереллины могут образовываться в разных, по преимуществу растущих частях растительного организма. Все же основное место синтеза гиббереллинов – это листья. Имеются данные, что гиббереллины образуются в пластидах. В отличие от ауксинов гиббереллины передвигаются из листьев как вверх, так и вниз, как по ксилеме, так и по флоэме. Это пассивный процесс, не связанный с метаболизмом [Тимофеева, Невмержица, 2012]. Внешние условия оказывают влияние на образование и содержание гиббереллинов в растении. Во многих случаях под влиянием одного и того же внешнего фактора содержание ауксинов и гиббереллинов изменяется противоположным образом. Так, освещение увеличивает содержание гиббереллинов и уменьшает содержание ауксина. Большое влияние на содержание гиббереллинов оказывает качество света. При выращивании растений при красном свете в них содержится больше гиббереллинов по сравнению с выращиванием при синем свете [Горбунов и др., 2005].

Улучшение питания растений азотом увеличивает содержание ауксинов, а содержание гиббереллинов при этом снижается.

Противоположные изменения в содержании ауксинов и гиббереллинов позволяют предполагать, что и в образовании этих двух фитогормонов имеется общий предшественник. Им может быть ацетил-КоА [Высоцкий, 1982]. Содержание гиббереллинов меняется в процессе онтогенеза растительного организма. Очень сильно возрастает содержание гиббереллинов в процессе прорастания семян. Возможно, что в этом случае гиббереллины частично переходят из связанного в свободное состояние. Содержание гиббереллинов в листьях разных растений (кормовых бобов, сои, картофеля) в процессе их онтогенеза изменяется в соответствии с одновершинной кривой, возрастая вплоть до цветения, а затем уменьшаясь [Свитайло и др., 1988].

Открытие цитокининов связано с обширными исследованиями по выращиванию каллуса, образовавшегося из изолированной ткани сердцевинки стебля табака на питательной среде [Murashige, Skoog, 1962]. Было показано, что клетки каллуса в стерильной культуре через определенный промежуток времени прекращают деление. Однако при добавлении к питательной среде производных ДНК, получающихся после ее автоклавирования, деление клеток возобновляется. В 1955 г. было выделено активное начало, вызывающее деление клеток, – 6-фурфурила-минопурин, названное кинетином. 6-фурфуриламинопурин в растениях не встречается [Murashige, Skoog, 1962; Калинин и др., 1980]. Однако в них были найдены близкие химические соединения, регулирующие процесс деления клеток, – цитокинины. Один из цитокининов, выделенный из кукурузы, был назван зеатином. Все известные цитокинины – это производные пуриновых азотистых оснований, а именно аденина, в котором аминогруппа в шестом положении замещена различными радикалами [Сковородников, Райков, 2009].

Цитокининами богаты клетки апикальных побегов и меристем корня. Они образуются главным образом в корнях и пассивно в виде зеатинрибозида передвигаются в надземные органы по ксилеме. Также

имеются данные об образовании цитокининов в семенах (зрелые зародыши) и развивающихся плодах. В литературе мало данных о влиянии условий среды на образование цитокининов. Имеются сведения, что улучшение питания растений азотом усиливает образование цитокининов [Кашин, 1998].

Таким образом, к наиболее важным биологически активным веществам, которые играют первостепенную роль в процессе онтогенеза растений, относятся ростовые вещества – фитогормоны. Анализ действия ауксинов, гибберелинов, цитокининов и других соединений свидетельствует о том, что они выполняют разные функции дополняя друг друга в процессе развития растения. В процессе клонального микроразмножения растений воссоздаются основные параметры среды в клетках и этапность действия фитогормонов в условиях *in vitro*, что позволяет копировать природные процессы, происходящие в растениях. Однако искусственно перенести разработанные для отдельного вида или сорта биотехнологические подходы на другие растения без проведения исследований по подбору оптимальных концентраций фитогормонов на разных этапах развития растений в условиях *in vitro* невозможно. Для каждого сорта аронии должны быть подобраны специфичные условия культивирования, что требует проведения экспериментальной работы на всех стадиях формирования растений.

1.3. Описание рода *Aronia* L.

В состав семейства розовых (*Rosaceae*) входят два интересных рода растений – Арония (*Aronia*) и Рябина (*Sorbus*). Арония и рябина родственники в ботанической иерархии, а на уровне рода имеют биологические отличия. Достаточно внимательно посмотреть на строение листьев, общий габитус растения, ареал распространения, требования к окружающей среде и химический состав, чтобы понять – это разные растения. В переводе с греческого видовой эпитет аронии переводится как черный плод, отсюда полное название на русском – арония черноплодная

(*Aronia melanocarpa*). В народе ее часто ошибочно называют рябиной черноплодной [Хабаров и др., 1997].

Путают аронию черноплодную также с аронией Мичурина и тоже часто называют ее черноплодной рябиной. С ботанической точки зрения арония Мичурина не полностью арония черноплодная, а лишь ее разновидность с другим набором хромосом. То есть на биологическом уровне это разные растения одного рода. Арония Мичурина также абсолютно не рябина. Рябина по своим биологическим признакам относится совсем к другому роду – *Sorbus*, с типовым наименованием в системе растений – обыкновенная (*Sorbus aucuparia*) [Мятковский, 1966].

Арония в переводе с греческого языка означает помощница, помощь, польза. Арония черноплодная – первая помощница человека, с древнейших времен незаменимый лекарь в лечении многих и многих его недугов [Плохарски, Смоляж, 1996].

В естественных условиях арония черноплодная вырастает 0,5–2,0 м высоты. Окультуренные формы достигают 3–4 м – это крупный ветвистый кустарник, крона которого с возрастом становится раскидистой, занимая в диаметре до 2–2,5 м [Васильченко, 1967]. Корневая система аронии черноплодной мочковатая, хорошо развитая, занимает верхний 40–60 см слой почвы. Корневая система не распространяется за внешние параметры кроны. Однолетние побеги красно-бурого цвета, со временем покрываются серобурой корой. Листья аронии черноплодной блестящие, простые, черешковые. Расположение очередное. Листовая пластинка цельная, обратно яйцевидная, крупная, иногда она почти квадратная с пильчатым краем и краевыми вырезами. Верхушка листовой пластинки острая. Цвет листьев аронии черноплодной ярко-зеленый. По центральной жилке листовой пластинки отчетливо видны черно-коричневые железки. К осени цвет листьев приобретает разные оттенки – оранжевые, красные, пурпуровые, что придает кустам яркую, нарядную декоративность [Игнатенко, 1965].

Цветки аронии черноплодной обоеполюе, средних размеров, правильные. Венчик белый, слегка розоватый. В цветке находятся 15–20 тычинок, чьи пурпуровые пыльники свисают над рыльцами пестиков, придавая цветку необычную привлекательность. Цветки собраны в сложные щитки до 6 см в диаметре. Цветение «черноплодной рябины» начинается в мае – июне и длится 2–3 недели [Воробьев, 2001].

Плодоношение аронии черноплодной начинается на 2–3 год. Плоды созревают в августе – первой половине сентября. Плоды круглые черные, с сизым налетом. В биологической спелости плоды сочные и сладкие. В мякоти плода находятся 4–8 продолговатых семян. Кустарник может произрастать в тени, но на солнечных участках лучше цветет и плодоносит, имеет более яркую окраску осенней листвы [Барабаш, 1960].

Естественный ареал аронии древовидной – восточная часть Северной Америки (рис. 2).

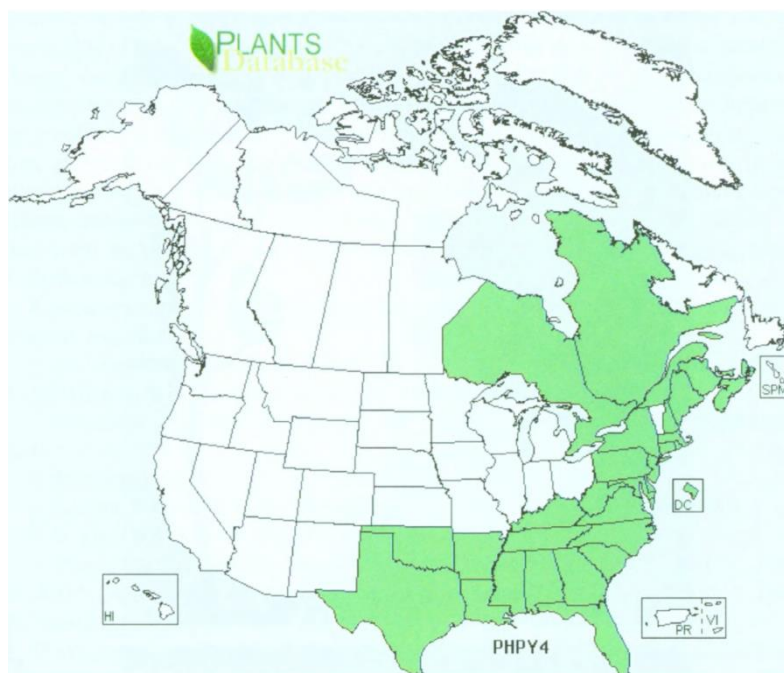


Рис. 2. Естественный ареал аронии древовидной

Центральная часть ареала занимает юго-восточную часть Прибрежных Долин, а вне этой области вид можно найти в подходящих местообитаниях в Аппалачах. Ареал простирается от восточных районов Техаса до северо-

востока Флориды и восточного побережья страны [Виноградова, Куклина, 2014].

Естественный ареал аронии сливолистной (восточная часть Северной Америки) в значительной степени перекрывает ареал аронии черноплодной (рис. 3).

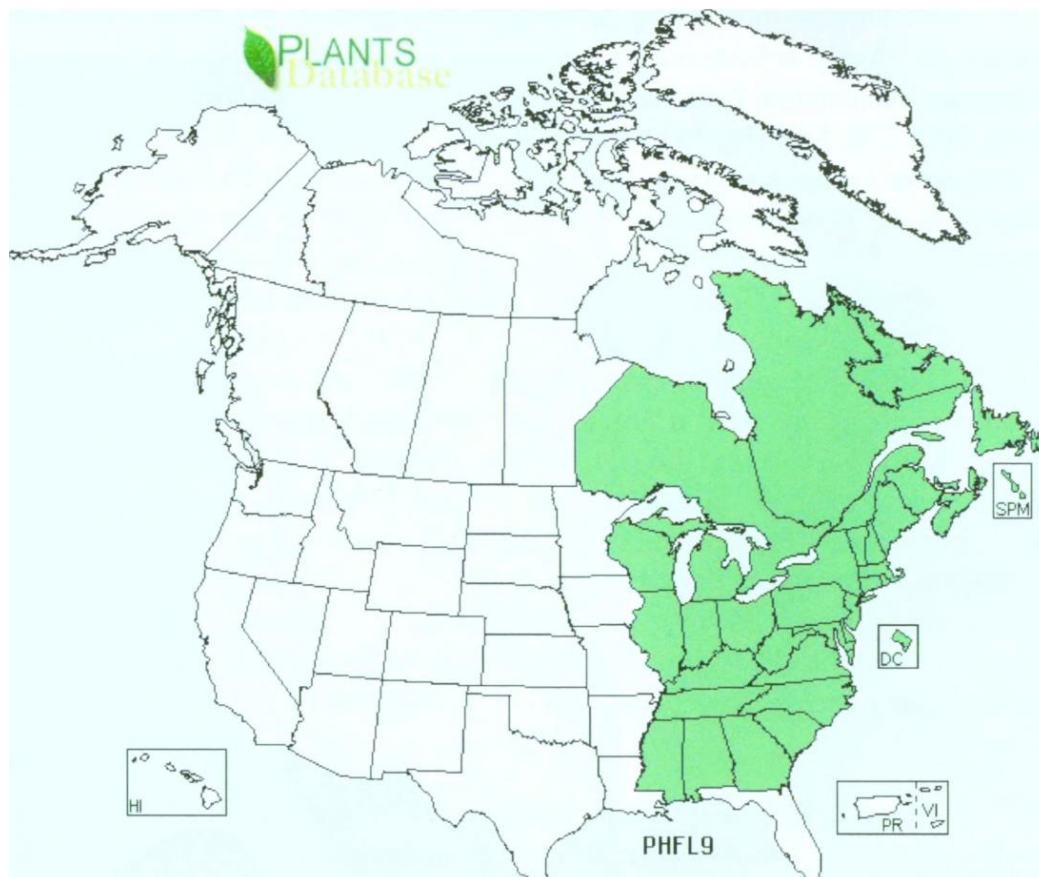


Рис. 3. Естественный ареал аронии сливолистной

Естественный ареал аронии черноплодной – восток Северной Америки от Новой Шотландии до Онтарио и Флориды [Виноградова, Куклина, 2014]. Центр ареала располагается в северо-восточных штатах Соединенных Штатов Америки и в районе Великих Озер, а также в средне- и высокогорьях Аппалачей (рис. 4).

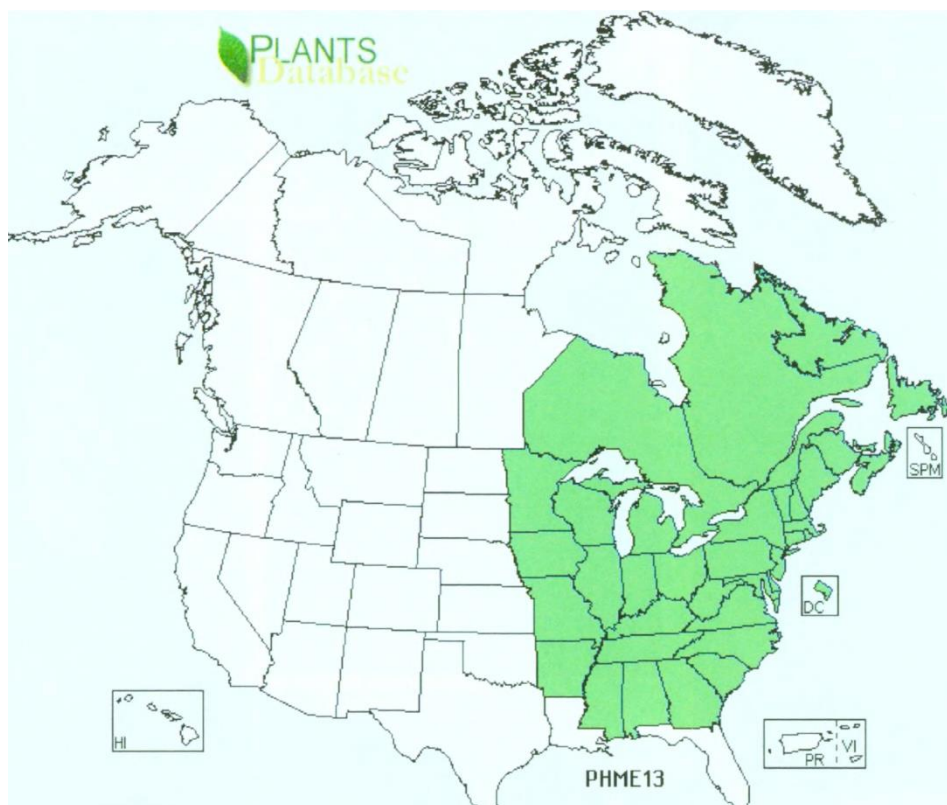


Рис. 4. Естественный ареал аронии черноплодной

Ареал распространения аронии черноплодной охватывает зоны умеренного климата по всему земному шару [Виноградова, Куклина, 2014].

Арония черноплодная четко отличается по морфологическим и биологическим признакам от аронии Мичурина. Плоды аронии черноплодной и аронии Мичурина достоверно различаются по размеру и массе. Кроме того, у аронии черноплодной плоды блестящие, овальные или грушевидные, тогда как у аронии Мичурина они шаровидные, часто сплюснутые, особенно на верхушке, и всегда матовые [Жингиету, 1975; Strik, Wrolstad, 2003].

Ее с успехом выращивают в Украине, Белоруссии, Казахстане. В Российской Федерации растет отдельными кустами на лесных полянах, опушках, в подлеске лесной и лесостепной зоны европейской части. Широко распространена «черноплодная рябина» в Центральном, Поволжском районах, на Северном Кавказе (рис. 5).



Рис. 5. Ареал аронии Мичурина в Европе в Атласе Флоры Европы

Зимостойкая культура растет практически на каждом подворье в Уральском регионе, Западно-Сибирском, Северо-Западном, даже в Якутии, других регионах Азиатской части России. В зонах, отличающихся зимними температурами выше -35°C , аронию черноплодную на зиму пригибают к земле, прикрывая лапником или снегом [Рыжков, 1973].

Род арония насчитывает 15 видов, но введен в культуру и послужил основой для выведения и интродуцирования сортов в разные климатические зоны только один – арония черноплодная [Виноградова, Куклина, 2014].

Выведенные культурные сорта «черноплодной рябины» как ценное лекарственное сырье выращивают в промышленных количествах на Алтае. Значительные площади заняты культурой в Украине, Белоруссии, Прибалтике. Используется как ценное декоративное растение для декора ландшафтов парков, скверов, уголков отдыха, естественное ограждение участков [Мятковский, 1970].

Арония черноплодная формирует до 7–9 кг ягод с куста. Урожай снимают перед наступлением заморозков. Их можно использовать в свежем

виде, а также перерабатывать на сок, вино, наливки, компоты. Из ягод готовят варенье, джем, сироп, мармелад, пастилу, желе. Сухие плоды хранятся в бумажных пакетах до двух лет. Для использования лечебных чаев сушат листья, заготовленные после цветения. Свежие ягоды «черноплодной рябины» при нулевой температуре хранятся до года, не теряя вкусовых и полезных качеств [Мусич, Алексеенко, 1978].

Из свежих и сушеных плодов готовят лечебные экстракты и настои, которые используют в домашних условиях при сниженном иммунитете, сахарном диабете, как профилактическое средство при онкологии, гипертонии. Их используют для лечения аллергического васкулита, при авитаминозе, что очень ценно, особенно для детей с нарушениями обмена веществ. Плоды аронии черноплодной снижают холестерин, улучшают работу эндокринной и дыхательной системы. Плоды – хороший антисептик. Широко используются препараты из плодов и листьев при заболеваниях печени, желчного пузыря, сердечно-сосудистой системы, гипертонии [Тимофеева и др., 2007].

Арония черноплодная мало требовательна к условиям окружающей среды. Культура зимостойкая и теневыносливая. Но в затененных местах практически не плодоносит и может использоваться, в основном, только как декоративная культура. Легко переносит морозы. В течение вегетационного периода формирует более высокие урожаи при поливах и хорошем освещении. При соблюдении агротехнических требований куст вырастает до 3 м и формирует до 50 стволиков разного возраста [Курьянов, 1994].

Арония черноплодная устойчива к вредителям и болезням. В отдельные годы наблюдаются единичные поражения тлей, рябинной молью, зимней пяденицей, вишневым пилильщиком, рябинным клещиком, боярышницей. Борьбу с вредителями безопаснее для здоровья человека проводить биопрепаратами, которые используют против этих вредителей на других культурах: дендробациллин, битоксибациллин, вертициллин, бикол, боверин и другие. Из химических препаратов рекомендованы обработки

аронии черноплодной весной до распускания почек и осенью после листопада 1–2% раствором медного купороса или бордосской жидкости [Виноградова, Куклина, 2014; Сорокопудов и др., 2012].

Из болезней, при запущенных посадках аронии черноплодной, может развиваться бактериальный некроз стеблей коры, монилиальный ожог, ржавчина листьев при близком расстоянии от культур, поражаемых ржавчиной (яблоня, груша), очень редко – вирусная пятнистость. Бороться с болезнями, как и с вредителями, лучше всего биопрепаратами, используя проверенные временем гаупсин, фитоспорин, гамаир, глиокладин, триходермин и другие [Исаченко, 2002; Воробьев, 2001].

Биопрепараты оказывают эффективное воздействие на вредителей и болезни только при четком соблюдении рекомендаций. При ранневесенних обработках можно применить обработку химическими препаратами, но только до раскрытия цветочных бутонов [Куминов, 2005].

Глава 2. Материал и методы исследования

Исследования были проведены с использованием материально-технической базы следующих лабораторий, где имелось все необходимое оборудование для проведения исследований:

- 1) лаборатория биотехнологии растений научно-образовательного центра (НОЦ) «Ботанический сад НИУ «БелГУ» природно-ландшафтного комплекса «Ботанический сад НИУ «БелГУ» (г. Белгород);
- 2) лаборатория аналитической химии БАВ НИУ «БелГУ» (г. Белгород);
- 3) лаборатория биотехнологии ФГБОУ ВО Мичуринский ГАУ (г. Мичуринск).

2.1. Объекты исследований

Объектами исследования были сорта аронии, произрастающие в Ботаническом саду НИУ «БелГУ». Данные сорта были выбраны вследствие того, что они успешно культивируются в условиях Белгородской области и отнесены по результатам наблюдений сотрудников ботанического сада к успешным интродуцентам, перспективным для использования в регионе. Ниже приведены описания изученных сортов:

1. Арония Мичурина «Amit» (рис. 6).

Кустарник высотой более 3 м с плотной овальной кроной. Цветет поздно, в мае-июне, примерно через две недели после распускания листьев, в результате чего не повреждается весенними заморозками, ежегодно плодоносит и очень нарядна осенью, когда ее листья становятся пурпурно-красными, созревающие же в сентябре плоды не осыпаются до самых заморозков. Рекомендуется для одиночных и групповых посадок [Москвитин, 1994].



Рис. 6. Плодоношение аронии Мичурина «Amit»

Ягоды крупные, собраны в гроздья, черного цвета с сизым налетом, обладают сладким вкусом без горечи (рис. 7).



Рис. 7. Плодовая кисть аронии Мичурина «Amit»

2. Арония сливолистная «Nero» (рис. 8).

Сорт «Nero» – первый плодовой сорт, полученный в Чехословакии от черноплодной мичуринской аронии, отличается хорошей урожайностью. Куст высотой до 3 м. Данный сорт характеризуется крупным размером ягод,

которые в 2 раза крупнее, чем у дикорастущей аронии. Имеет превосходный вкус и яркий аромат, пригоден для приготовления напитков и джемов. Обильно плодоносит крупными гроздьями темно-фиолетовых ягод. Не требует особого ухода [Куминов, 2005].

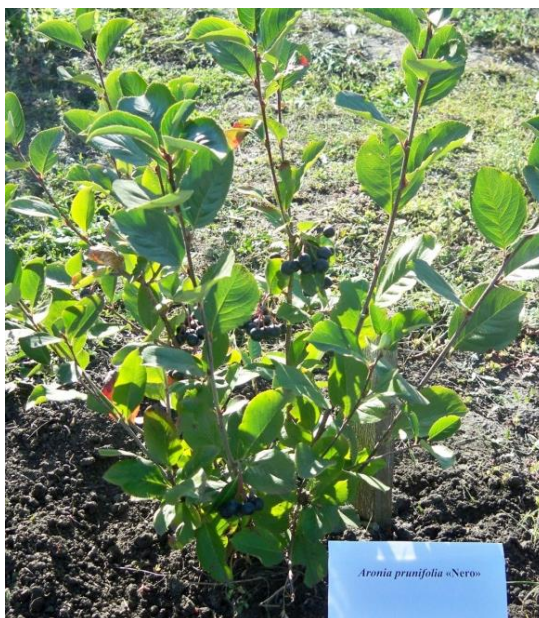


Рис. 8. Плодоношение аронии сливолистной «Nero»

Потребление ягод в свежем виде способствует улучшению циркуляции крови и увеличению умственной активности (рис. 9).



Рис. 9. Плодовая кисть аронии сливолистной «Nero»

Растение рекомендуется как для любителей на приусадебных участках так и на производственных плантациях (также экологических). Кусты используются также для озеленения пейзажа, например, для живых изгородей, в виде борьбы с эрозией, плодами питаются птицы.

3. Арония сливолистная «Viking» (рис. 10).

Финский сорт, ценится за крупноплодность. Осенняя окраска листьев оранжевая или ярко-красная.



Рис. 10. Плодоношение аронии сливолистной «Viking»

Ягоды пурпурно-чёрные, могут быть использованы для начинки пирогов или желе или оставлены на кустах, чтобы дать пищу для птиц и других диких животных. По сравнению с видовыми растениями в ягодах данного сорта меньше танинов. Таким образом, ягоды мягче и слаще на вкус (рис. 11).



Рис. 11. Плодовая кисть аронии сливолистной «Viking»

Сорт может использоваться для создания зелёных изгородей. Сорт отличается устойчивостью к заболеваниям, редко поражается болезнями и вредителями. Абсолютно морозостойкий сорт [Мусич, 1978; Исаченко 2002].

4. Арония черноплодная «Hugin» (рис. 12).

Кустарник высотой до 2,5-3 м сорт, родом из Швеции. Сорт известен как лекарственное растение, ценный источник ягод, богатых антиоксидантами.

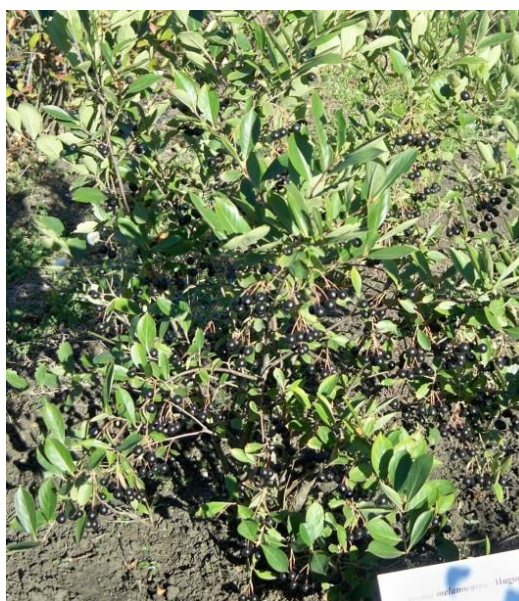


Рис. 12. Плодоношение аронии черноплодной «Hugin»

По содержанию полезных веществ ягоды аронии превосходят голубику, чернику, облепиху и ягоды годжи. Из них можно готовить соки, джемы, желе. Этот сорт отличается несомненными декоративными качествами. Прежде всего, следует отметить яркую красную осеннюю окраску листвы. Также этот кустарник отличается красивым цветением в мае-июне [Исаченко, 2002].

Шаровидные черные плоды покрыты восковым налетом, кисло-сладкие, с вяжущим вкусом, сочные, собраны в гроздья. Зрелые плоды практически не осыпаются, благодаря плотной кожице сохраняют сочность и свежесть долгое время (рис. 13).



Рис. 13. Плодовая кисть аронии черноплодной «Hugin»

В озеленении арония «Hugin» может использоваться в составе древесно-кустарниковых групп, для одиночной посадки на газоне, для создания плотных живых изгородей, укрепления склонов и озеленения городских территорий.

5. Арония древовидная «Brilliant» (рис. 14).

Декоративный сорт неизвестного происхождения. Кустарник высотой до 1,5-2 м с блестящими листьями. Сорт с компактной формой куста, листья эллиптические до продолговато-обратнояцевидных, зеленые, блестящие,

осенью очень ярко окрашенные, огненно шарлахово-красные [Исаченко 2002; Виноградова, Куклина, 2014].



Рис. 14. Плодоношение аронии древовидной «Brilliant»

Очень мало растений может сравниться с аронией по яркости осенней окраски. Можно выращивать как солитер; весной она декоративна за счет обильного белого цветения – и может использоваться как элемент в составе древесно-кустарниковых композиций [Куминов, 2005]. Зимой аронию украшают ярко-красные плоды (рис. 15).



Рис. 15. Плодовая кисть аронии древовидной «Brilliant»

Из этого сорта аронии можно формировать плотные живые изгороди – растения хорошо переносят стрижку.

2.1.2. Определение сортов аронии, наиболее богатых ценными элементами

Арония становится популярной и перспективной культурой еще и благодаря ценному составу биологически активных веществ в соке (табл. 1). Свежевыжатый сок аронии темно-рубинового цвета с вяжущим кисло-сладким вкусом [Тимофеева и др., 2007].

Таблица 1

Состав сока аронии

Массовая доля, %		Макроэлементы, мг%		Витамины, мг%	
Вода	86,0	Натрий	8,0	β-каротин, мкг%	360,0
Белки	0,1	Калий	24,0	Ретиноловый эквивалент, мкг%	60,0
Жиры	0,1	Кальций	26,0	Токоферол эквивалент	0,8
Сумма моно- и дисахаридов	11,4	Магний	15,0	Ниациновый эквивалент	0,2
Пищевые волокна	1,0	Фосфор	41,0	В ₂	0,02
Органические кислоты	1,2	Железо	1,6	С	10,0

В черноплодной рябине (аронии) содержится много витаминов (β-каротин, С, А, В1, В2, В6, К, Р, РР, Е) и полезных веществ (пектинов, антоцианатов, органических кислот, дубильных веществ). А также микро- и макроэлементы: марганец, медь, кобальт, йод, магний, железо. Мякоть ягод содержит кумарин, амигдалин и другие соединения [Камзолова, 2002; Дорошина, Ерёмина, 1998].

В 100 г ягод черноплодной рябины содержится: 0,1 г крахмала, 10,8 г моно- и дисахаридов, 80,5 г воды, 3 г органических кислот, 4,1 г клетчатки, 1,5 г золы, 10,9 г углеводов, 0,2 г жиров, 1,5 г белков [Камзолова, 2002; Шишкина, 1973].

Благодаря повышенному содержанию йода, плоды ягоды рябины черноплодной полезно употреблять людям с такими заболеваниями

щитовидной железы, как диффузный и токсический зоб. Благодаря дубильным веществам, органическим кислотам и пектину, арония стимулирует пищеварительные процессы, тонизирует и очищает кишечник.

Пектиновые вещества, входящие в состав черноплодной рябины, тонизируют стенки кишечника и способствуют очищению организма. Эти вещества устраняют застойные процессы в толстой кишке, сглаживают спазмы и выводят излишки желчи [Мусич, 1986; Дорошина, Еремина, 1998].

Систематическое потребление аронии оказывает положительное влияние на работу сердечно-сосудистой и дыхательной системы. Сок рябины применяется в качестве профилактического и лечебного средства при гипертонии и атеросклерозе [Шишкина, 1973].

Плоды аронии считаются эффективным иммуностимулятором, они улучшают общее состояние организма и повышают его сопротивляемость к различным инфекциям. Черноплодная рябина назначается при атеросклерозе, кровотечениях, аллергиях и сахарном диабете. Многие ученые пришли к выводу, что регулярное употребление рябины улучшает работу печени, нормализует работу эндокринной системы и повышает иммунитет. Свежеприготовленный сок рябины можно использовать как первую помощь при отравлениях мышьяком содержащими препаратами [Дорошина, 1998].

Одно из наиболее полезных свойств рябины – это ее способность избавлять организм от тяжелых металлов, радиоактивных веществ, продуктов распада, поэтому ее рекомендуют включать в меню людям, проживающим в экологически неблагоприятных районах.

Арония это кладовая витаминов. Наиболее ценным источником витаминов являются высушенные плоды рябины, в 50 г этого продукта содержится суточная доза витамина Р [Мусич, 1986].

Употребление черноплодной рябины помогает бороться с ожирением. Благодаря большому содержанию антоцианинов, регулирующих массу тела и поддерживающих оптимальный уровень глюкозы в крови, арония блокирует рост жировой ткани и борется с возникновением ложного чувства голода.

Энергетическая ценность рябины черноплодной 55 ккал на 100 г – ее смело можно есть всем, набором лишнего веса это не грозит.

Из-за большого содержания органических кислот, черноплодную рябину не рекомендуется употреблять при обострениях язвы желудка и двенадцатиперстной кишки, а также гиперацидном гастрите, низком давлении, тромбозе, и при повышенной свертываемости крови [Шишкина, 1973].

Плоды аронии также являются источником антоцианов. Антоцианы являются гликозидами, содержащими в качестве агликона-антоцианидина гидрокси- и метоксизамещённые соли флавилия (2-фенилхроменилия), у некоторых антоцианов гидроксилы ацетилированы. Углеводная часть связана с агликоном обычно в положении 3, у некоторых антоцианов – в положениях 3 и 5, при этом в роли углеводного остатка могут выступать как моносахариды (глюкоза, рамноза, галактоза), так и ди- и трисахариды [Дорошина, Еремина, 1998; Дейнека и др., 2006].

Синтезируются данные соединения в цитоплазме и депонируются в клеточные вакуоли при помощи глутатионового насоса. Антоцианы обнаружены в специальных везикулах – антоцианопластах, хлоропластах, а также в кристаллическом виде в плазме некоторых видов лука и клеточном соке плодов апельсина.

Общеизвестный факт активации биосинтеза антоцианов у растений в стрессовых условиях ещё не получил глубокого физиолого-биохимического обоснования. Возможно, что антоцианы не несут никакой функциональной нагрузки, а синтезируются как конечный продукт насыщенного флавоноидного пути, получившего вакуолярное ответвление с целью конечного депонирования ненужных растению фенольных соединений [Сорокопудов и др., 2005].

С другой стороны, антоциановая индукция, вызванная определёнными факторами окружающей среды, а также предсказуемость появления антоцианинов из года в год в периоды специфических этапов развития листа,

их яркая выраженность в особых экологических нишах, возможно, способствуют адаптации растительных организмов к тем или иным стрессовым условиям [Танчев, 1980].

Антоцианы очень часто определяют цвет лепестков цветков, плодов и осенних листьев. Они обычно придают фиолетовую, синюю, розовую, коричневую, красную окраску. Эта окраска зависит от кислотности клеточного содержимого. Раствор антоцианов в кислой среде имеет красный цвет, в нейтральной среде – сине-фиолетовый, а в щелочной – жёлто-зелёный [Lee et al., 2014].

Окраска, обусловленная антоцианами, может меняться при созревании плодов, отцветании цветков – процессах, сопровождающихся изменением pH клеточного содержимого. Например, бутоны медуницы мягкой имеют розовый оттенок, а цветки – сине-фиолетовый цвет [Чуб, 2008].

Многие антоцианы достаточно хорошо растворимы, например, при экстракции виноградного сока из кожуры плодов они переходят в красные вина. К наиболее распространённым антоцианам относится цианидин. Антоцианы рассматривают как вторичные метаболиты [Танчев, 1980].

Богаты антоцианами такие растения, как, например, Сицилийский апельсин (красный апельсин), черника, клюква, малина, ежевика, чёрная смородина, вишня, баклажаны, чёрный рис, виноград Конкорд и мускатный виноград, красная капуста, и некоторые виды перцев, как жгучих, так и сладких. В медицине широко применяются антоцианы черники [Чуб, 2008].

В жгучих перцах также замечено несколько видов, у которых антоциан присутствует не только в плодах, но и в листьях. Причём, в данном случае, антоциан синтезируется тем больше, чем ярче солнечный свет, падающий на растение. К таким перцам можно отнести «Black Pearl», «Pimenta da Neyde» и другие. Но в «Black Pearl» созревший плод полностью лишается антоциана, и плод-ягода краснеет, а у «Pimenta da Neyde» плод-стручок на солнце всегда остаётся тёмным [Чуб, 2008].

Антоцианы способствуют снижению воспалительных реакций и оксидативного стресса в кишечнике, при потреблении избыточного количества жиров и углеводов и улучшают барьерные функции кишечника.

Основными компонентами антоцианового комплекса аронии являются:

- 1) Цианидин-3-глюкозид;
- 2) Цианидин-3-галактозид;
- 3) Цианидин-3-арабинозид;
- 4) Цианидин-3-ксилозид;
- 5) Цианидин-3,5-диглюкозид.

Для определения антоцианов в сортах аронии Ботанического сада НИУ «БелГУ» была проведена исчерпывающая экстракция, измерения на спектрометре и расчет содержания антоцианов по формуле.

2.2. Методика проведения исследования

Для микроклонального размножения сортов рода Арония были использованы модификации питательной среды Мурасиге и Скуга [Murashige, Skoog, 1962] с добавлением мезоинозитола – 100 мг/л, агара – 7 г/л и витаминного комплекса по прописи Мурасиге и Скуга [Murashige, Skoog, 1962]. Источником углевода была сахароза в концентрации 30 г/л.

Для индукции морфогенеза использовали цитокинин: 6-бензиламинопурин (6-БАП); ауксины: индолил-3-масляную кислоту (ИМК), индолил-3-уксусную кислоту (ИУК); гиббереллины: гибберелловую кислоту (ГК) [Решетова, 2013; Litwinczuk, 2002].

Для укоренения были использованы микрочеренки, достигшие 1,5–2 см на среде размножения. На этапе укоренения побегов концентрация углевода и макросолей была снижена вдвое. Применяли безгормональные питательные среды или в среду укоренения добавляли β -индолилмасляную кислоту (ИМК) и β -индолилуксусную кислоту (ИУК) в концентрации 0,5-1,0

мг/л [Brand, Cullina, 1992; Chalupa, 1983]. Состав питательной среды представлен в таблице 3.

Таблица 3

Состав среды Мурасиге и Скуга

Группа веществ	Вещество	Концентрация, мг/л	Навеска в-ва на заданный объем маточного р-ра, мг		Объем маточного р-ра на 1 л среды, мл
Макроэлементы	NH_4NO_3	1650	16500	Разводят на 1 л	100
	KNO_3	1900	19000		
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	3700		
	KH_2PO_4	170	1700		
Источник кальция	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	4400	На 100 мл	10
Микроэлементы	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3	2230	Разводят на 100 мл	1
	H_3BO_3	6,2	620		
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6	860		
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	25		
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	2,5		
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	2,5		
	KI	0,83	83		
Хелат железа	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8	557	На 100 мл каждый	10
	$\text{Na}_2\text{ЭДТА} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37,3	745		
Углеводы	Сахароза	30000	Добавляют в сухом виде		
	Агар	7000			

Применялись общепринятые методики и специальные руководства Р. Г. Бутенко (1983), С.А. Муратовой и др. (2008). Особое внимание уделяли стерильности на всех этапах работы. Посуду и инструменты тщательно мыли в теплой воде с моющим средством, промывали несколько раз под проточной водой, а затем дистиллированной. Вымытую посуду и инструменты стерилизовали сухим жаром в сухожаровом шкафу в течение 3 часов при температуре 160–180°C.

Все манипуляции по пересадке растительного материала проводили с соблюдением строгой асептики в ламинар-боксах БАВп-01-«Ламинар-С» (Россия).

В процессе приготовления питательной среды рН устанавливали в пределах 5,6–5,7 с помощью децинормального раствора гидроксида натрия. Стерилизация сред проводилась автоклавированием при температуре 120°C, давлении 1 атм. в течение 20 мин. Все регуляторы роста и витамины стерилизовали ультрафильтрацией через фильтры Millipore (диаметр пор 0,22 μm) и добавляли в среды после автоклавирования.

Культивирование растений проводили в пробирках 20 мм с 7 мл среды, конических колбах емкостью 250 мл с 50 мл среды и широкогорлых банках емкостью 500 мл с 80 мл среды. Колбы закрывали алюминиевой фольгой и герметизировали прозрачной стрейч пленкой, банки закрывали винтовыми крышками из жести с ватной вставкой для облегчения адаптирования к нестерильным условиям среды.

Культивирование проводилось в специальной культуральной комнате, которая оборудована световыми стеллажами, при режиме 16 часов день – 8 часов ночь, с освещенностью 2000–2500 люкс, температуре воздуха 25°C и влажностью воздуха 55–65%. Экспланты пассировали на свежую питательную среду через каждые 3–4 недели.

По окончании культивирования растений в стерильных условиях, укорененные растения аронии переносили в отделение адаптации растений *in vitro* в теплице. Там они пересаживались в кассеты с минерализованным торфом. Парник с кассетами закрывался темной пленкой и агроспаном. Температура воздуха в адаптационной комнате составляла 25°C, влажность под парником составляла 80–90%.

2.3. Учет результатов

В экспериментах по клональному микроразмножению растений учитывали число развивающихся, погибших и инфицированных эксплантов, а также число вновь образовавшихся побегов и почек, выход побегов длиной 1,5–2 см, число и длину укоренившихся побегов, число и длину корней укорененных побегов, количество растений после адаптации в нестерильных условиях.

Для определения коэффициента размножения определяли отношение общего количества вновь образованных побегов за пассаж к количеству эксплантов, образовавших, как минимум один дополнительный побег. Среднее число корней определяли как отношение числа образовавшихся корней к числу побегов, образовавших, как минимум один корень. Средние значения и ошибки выборочной средней определяли для каждой повторности эксперимента отдельно, затем определяли средние значения для всех повторностей эксперимента. На каждый вариант опыта отбирали по 25–30 эксплантов. Все эксперименты по размножению и укоренению побегов были повторены не менее трех раз.

Глава 3. Полученные результаты и их обсуждение

3.1. Определение содержания антоцианов в сортах рода *Aronia L.* из коллекции Ботанического сада НИУ «БелГУ»

Для определения содержания антоцианов в сортах аронии в августе 2017 года были собраны созревшие ягоды выбранных для сортов и проведены исследования на базе лаборатории аналитической химии БАВ НИУ «БелГУ».

Взвешенная на аналитических весах навеска (около 1г) исследуемого сырья помещалась в ступку. К навеске приливалось 15 мл 0,1 М раствор HCl. Растирали ягоды в ступке под слоем экстрагента. Экстракт порционно фильтровался через складчатый фильтр в мерную колбу на 100 мл. Проводилась исчерпывающая экстракция. Экстракция повторялась до обесцвечивания растворителя, общий объём в колбе доводился раствором экстрагента.

Спектрофотометрические характеристики измерялись в интервале длин волн 400-700 нм (нулевой раствор – используемый растворитель). При необходимости проводилось разбавление ($A > 0,9$). По полученным данным строился спектр поглощения (рис. 16).

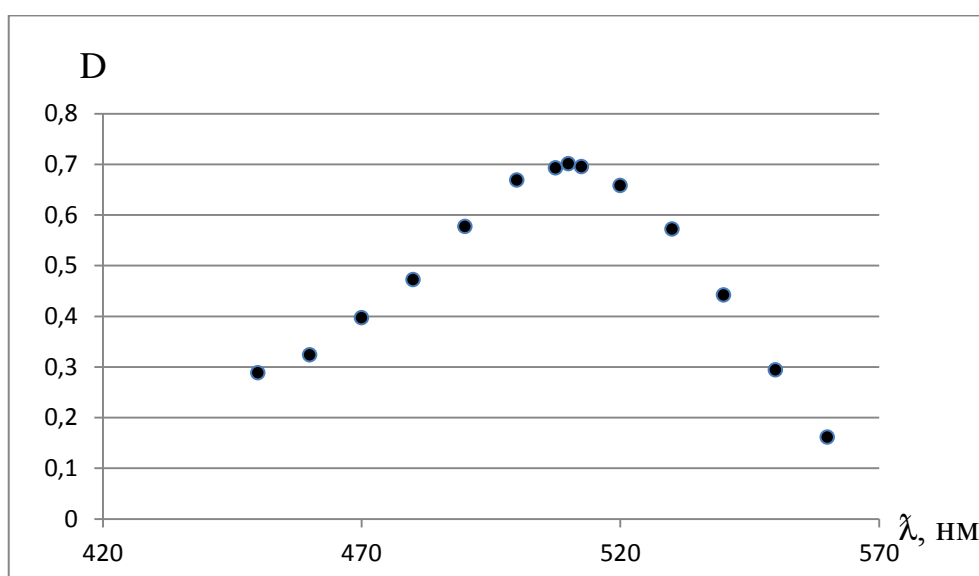


Рис. 16. Спектр поглощения

По спектру выбиралась оптическая плотность при λ максимальном и рассчитывалось содержание антоцианов в образцах аронии по формуле (3.1):

$$C = \frac{A}{\varepsilon \cdot l} * V * p * \frac{M}{m} * 100, \quad (3.1)$$

где C – концентрация;

$\varepsilon = 26900$;

V – объем, л;

P – разбавление, (V_k/V_a);

M = 484, г/моль;

m – навеска, г.

В таблице 4 представлены результаты, полученные в ходе выполнения исследования.

Таблица 4

Содержание антоцианов в сортах аронии Ботанического сада НИУ
«БелГУ»

№	Название	Содержание антоцианов, г/100г
1	Арония древовидная «Brilliant»	1,42
2	Арония черноплодная «Hugin»	2,07
3	Арония сливолистная «Nero»	0,69
4	Арония сливолистная «Viking»	0,61
5	Арония Мичурина «Amit»	0,70

В результате исследования были выявлены сорта наиболее богатые антоцианами: арония черноплодная «Hugin» и арония древовидная «Brilliant», в них содержание антоцианов больше чем в остальных сортах почти в два и три раза соответственно.

Для получения разноцветных форм антоцианов отбиралась аликвота исследуемого экстракта, переносилась в мерную колбу на 25 мл, доводилась до метки 0,1 н раствором HCl. Раствор переносился в стакан и измерялся pH.

Снова отбиралась аликвота экстракта в мерную колбу на 25 мл, доводилась до метки дистиллированной водой. Раствор переносился во второй стакан, измерялся рН. Отбиралась аликвота в третий стакан, приливалась дистиллированная вода примерно до объёма 20 мл. Стакан помещался на магнитную мешалку и одновременно измерялся рН. С помощью дозатора по каплям добавлялся раствор NaOH, приготовленный заранее для доведения рН до 4. Содержимое стакана переносилось в колбу на 25 мл и доводилось до метки дистиллированной водой. Раствор снова переливался в стакан и фиксировался рН. Повторялся третий пункт несколько раз, чтобы рН примерно соответствовало следующим значениям: 6, 8, 10, 12. Измерялись спектральные характеристики полученной серии растворов. На основании полученных данных были построены спектры поглощения (рис. 17).

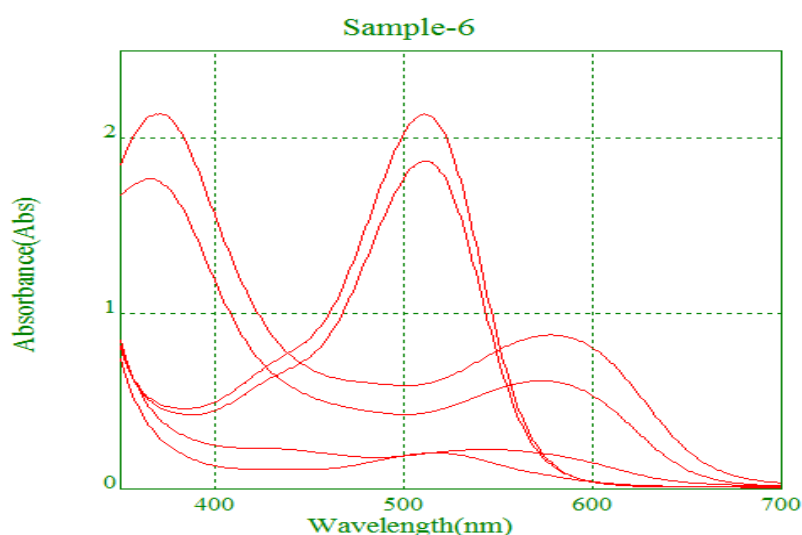


Рис. 17. Спектры аронии черноплодной при разных значениях рН

Кроме того определялся экстрагент для количественного определения содержания антоцианов в аронии черноплодной. Для этого взвешивалось три навески исследуемого сырья на аналитических весах. Навески переносились в три ступки, к ним приливалось по 15 мл выбранных растворителей – экстрагентов: этанол, 0,1 М раствор HCl и дистиллированная вода. Ягоды растирались в ступке под слоем экстрагента. Экстракт фильтровался через складчатый фильтр в мерную колбу на 100 мл. Повторялась экстракция до

тех пор, пока экстракт не станет бесцветным. Общий объем экстракта должен был составлять 100 мл.

Спектры снимались в интервале длин волн 400–700 нм (нулевой раствор – используемый растворитель). При необходимости проводилось разбавление ($A > 0,9$). По полученным данным определялась оптическая плотность при максимальном светопоглощении и рассчитывалось содержание антоцианов при использовании разных экстрагентов по формулам (3.2, 3.3., 3.4):

1. Экстракт 0,1 М HCl:

$$m = 2,100 \text{ г}$$

$$A = 0,737$$

$$P = 10$$

$$C = \frac{0,737}{26900 \cdot 1} * 0,1 * 10 * \frac{484}{2,100} * 100 = 0,631 \text{ г/100 г сырья} \quad (3.2)$$

2. Водный экстракт:

$$m = 2,270 \text{ г}$$

$$A = 0,968$$

Нет разбавления

$$C = \frac{0,968}{26900 \cdot 1} * 0,1 * \frac{484}{2,270} * 100 = 0,077 \text{ г/100 г сырья} \quad (3.3)$$

3. Спиртовой экстракт:

$$m = 0,495 \text{ г}$$

$$A = 0,476$$

Нет разбавления

$$C = \frac{0,476}{26900 * 1} * 0,1 * 1 * \frac{484}{0,495} * 100 = 0,173 \text{ г/100г} \quad (3.4)$$

В ходе исследования было выявлено, что лучшим экстрагентом для извлечения антоцианов из ягод аронии является 0,1 М HCl.

3.2. Этап введения сортов рода *Aronia* L. в культуру *in vitro*

Первым этапом клонального микроразмножения является введение в культуру *in vitro* сортов разных видов рода *Aronia* L. Эффективность этого этапа зависит от таких факторов как:

- 1) тип стерилизующего агента;
- 2) время экспозиции;
- 3) видовые и сортовые особенности растения;
- 4) тип экспланта;
- 5) возраст и качество маточного растения;
- 6) сезон проведения работ.

В качестве первичных эксплантов для введения в культуру были использованы закрытые почки аронии. Черенки аронии были срезаны в январе 2017 года и помещены в воду для прорастания.

При анализе литературных данных, в качестве стерилизующего агента, чаще всего используется сулема (HgCl_2) – токсичное вещество, первого класса опасности. Ещё одним популярным стерилизатором является гипохлорит натрия (NaOH) или бытовой препарат «Белизна», действующее вещество которого также гипохлорит натрия [Майорова, 2009]. Нами был использован препарат «Белизна», разбавленный водой в соотношении 1:1.

Проросшие почки очищались от верхних кроющих чешуй, промывались в слабом растворе перманганата калия (KMnO_4) и помещались в ламинар-бокс. Экспланты помещались в стерильный стакан и обрабатывались «Белизной» в течение 4 минут. После чего промывались стерильной дистиллированной водой три раза по 5 минут. Стерильные экспланты помещались в пробирку на питательную среду с содержанием солей и витаминов по прописи Мурасиге и Скуга. Закрытые фольгой и пленкой пробирки помещались в световую комнату для дальнейшего прорастания.

Анализ полученных данных говорит о том, что «Белизна» может быть использована для стерилизации эксплантов аронии. Данный стерилизатор оказал жесткое воздействие на меристему аронии сливолистной сорта «Nero», погибло 36,36% эксплантов. Однако остальные сорта показали достаточно высокую жизнеспособность (табл. 5).

Таблица 5

Влияние стерилизующего агента на экспланты сортов рода *Aronia*

Сорт	Эффективность стерилизации, %	
		Жизнеспособные
Арония древовидная «Brilliant»	Инфицированные	28,57±0,24
	Некроз	14,29±0,16
	Жизнеспособные	92,31±0,36
Арония черноплодная «Hugin»	Инфицированные	23,08±0,45
	Некроз	7,69±0,61
	Жизнеспособные	54,55±0,17
Арония сливолистная «Nero»	Инфицированные	27,27±0,29
	Некроз	36,36±0,27
	Жизнеспособные	85,71±0,19
Арония сливолистная «Viking»	Инфицированные	14,29±0,47
	Некроз	7,14±0,10
	Жизнеспособные	66,67±0,47
Арония Мичурина «Amit»	Инфицированные	40,00±0,28
	Некроз	6,67±0,61
	Жизнеспособные	66,67±0,47

Наибольший процент жизнеспособных эксплантов после обработки стерилизующим агентом «Белизна» в разведении 1:1 составил 92,31±0,36% у сорта аронии черноплодной «Hugin» и 85,71±0,19% у сорта аронии сливолистной «Viking». Наибольший процент зараженных эксплантов 40,00±0,28% у аронии Мичурина «Amit», при $p < 0,05$.

Для определения коэффициента размножения на этапе введения был произведен учет образовавшихся новых побегов и измерена их длина. Данные эксперимента представлены в таблице 6.

Выход стерильных эксплантов сортов аронии после этапа введения

	Сорт				
	Арония древовидная «Brilliant»	Арония черноплодная «Hugin»	Арония сливолистная «Nero»	Арония сливолистная «Viking»	Арония Мичурина «Amit»
Количество побегов, шт	1,30±0,41	1,88±0,71	2,30±1,79	5,08±2,57	2,10±1,65
Длина побега, см	0,45±0,22	0,75±0,35	0,43±0,21	0,82±0,55	1,38±0,76

Наибольшее число вновь образовавшихся побегов выявлено у аронии сливолистной «Viking» – 5,08±2,57 шт. при средней длине побега 0,82±0,55 см, при $p < 0,05$. На рисунке представлены введенные в культуру экспланты аронии сливолистной «Viking» (рис. 18).



Рис. 18. Введенные в культуру экспланты аронии сливолистной «Viking»

Для дальнейшего эксперимента были отобраны и размножены экспланты ароний, свободные от грибных и бактериальных инфекций.

3.3. Влияние концентрации цитокинина на эффективность размножения и рост микропобегов сортов аронии

Как и для многих культур морфогенез аронии в культуре тканей остается открытым вопросом, что обусловлено видо- и сортоспецифичностью. Включенные в наши исследования генотипы требуют индивидуального подбора солевого и гормонального состава питательной среды.

В ходе анализа литературных данных было установлено, что для клонального микроразмножения растений различных сортов разных видов рода *Aronia* может подойти несколько вариантов сред, с различным содержанием фитогормонов [Милехин, Рубцов, 2015; Куклина и др., 2003; Шипунова, 2001]. В результате поставленного эксперимента были выбраны варианты сред, на которых наблюдалось активное побегообразование и вытягивание побега. На рисунке 19 представлены растения аронии сливолистной «Nero» на разных вариантах сред.

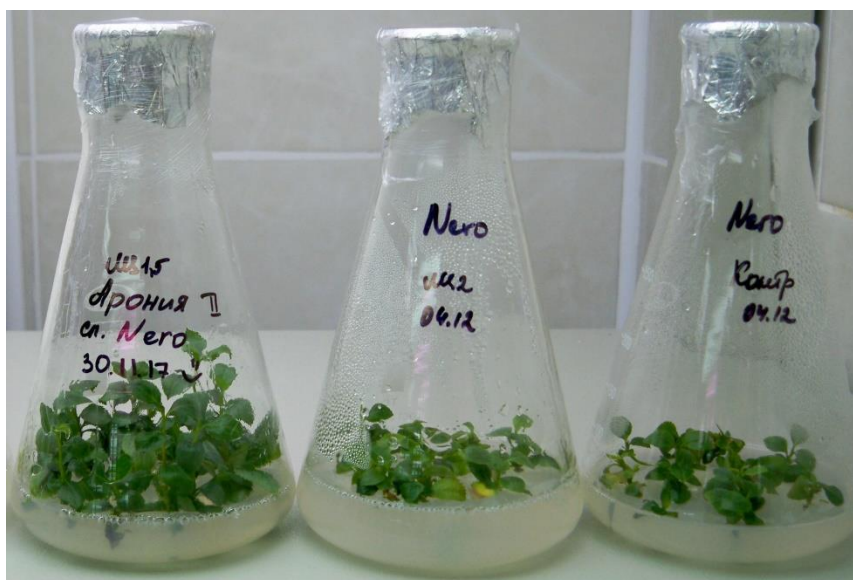


Рис. 19. Клональное микроразмножение аронии сливолистной «Nero»

Наиболее важным моментом, обеспечивающим образование побегов, является правильный выбор регулятора роста и его концентрации. Из

фитогормонов цитокининового ряда нами был выбран 6-бензиламинопурин, как один из наиболее активных и успешно применяемых при культивировании растений *in vitro* цитокининов.

В ходе исследования был подобран состав питательной среды для наиболее активного побегообразования. Полученные результаты представлены в таблице 7.

Таблица 7

Влияние цитокинина на эффективность размножения (количество образовавшихся побегов) сортов ароний

Сорт	Минеральный состав среды и концентрация цитокинина, мг/л							
	½ MS 0,5	½ MS 1	½ MS 1,5	MS 0,5	MS 1	MS 1,5	MS 2	MS 0 (Контроль)
«Brilliant», шт.	1,12± 0,33	1,18± 0,39	1,24± 0,44	1,06± 0,24	1,17± 0,39	1,53± 0,71	2,06± 1,60	1,06± 0,24
«Hugin», шт.	1,24± 0,44	1,41± 0,51	1,06± 0,24	1,71± 0,77	1,41± 0,71	1,35± 0,70	1,18± 0,53	1,06± 0,25
«Nero», шт.	1,05± 0,25	1,24± 0,56	1,18± 0,39	1,18± 0,53	1,41± 0,62	1,47± 0,62	1,24± 0,43	1,05± 0,26
«Viking», шт.	1,21± 0,54	1,10± 0,31	1,26± 0,45	1,11± 0,31	1,53± 0,70	1,74± 0,93	2,00± 0,88	1,16± 0,38
«Amit», шт.	1,26± 0,45	1,79± 0,92	1,16± 0,37	1,16± 0,37	2,05± 1,03	1,37± 0,60	1,53± 0,77	1,74± 0,99

В ходе анализа полученных данных было выявлено, что при использовании среды Мурасиге и Скуга с полным составом макро- и микросолей и содержанием цитокинина 6-БАП 2 мг/л число вновь образовавшихся побегов у аронии древовидной «Brilliant» составила 2,06±1,60 шт., у аронии сливолистной «Viking» 2,00±0,88 шт. У аронии Мичурина «Amit» на среде с содержанием 6-БАП 1 мг/л число побегов составило 2,05±1,03 шт. У аронии сливолистной «Nero» на среде с содержанием 6-БАП 1,5 мг/л – 1,47±0,62 шт. и у аронии черноплодной «Hugin» на среде с содержанием 6-БАП 0,5 мг/л – 1,71±0,77 шт. Данные обрабатывали статистически, через программу Excel 2010. Для определения достоверности различий полученных результатов использовали t-критерий

Стьюдента. Различия достоверны при $p < 0,05$. На рисунке 20 представлены растения аронии сливолистной «Viking» на разных вариантах сред.



Рис. 20. Клональное микроразмножение аронии сливолистной «Viking»

Учет высоты побега в дальнейшем исследовании позволяло делить экспланты на микрочеренки, что влияет на дальнейшую адаптацию растений к нестерильным тепличным условиям. Полученные результаты представлены в таблице 8.

Таблица 8

Влияние цитокинина на высоту образовавшихся побегов сортов рода Арония

Сорт	Минеральный состав среды и концентрация цитокинина, мг/л							
	½ MS 0,5	½ MS 1	½ MS 1,5	MS 0,5	MS 1	MS 1,5	MS 2	MS 0 (Контроль)
«Brilliant», см	2,46± 0,37	2,51± 0,55	3,38± 0,99	3,23± 0,41	3,27± 0,37	4,23± 0,73	3,56± 1,10	2,79± 0,46
«Hugin», см	1,39± 0,47	1,19± 0,21	1,59± 0,27	3,26± 0,61	1,73± 0,66	3,68± 0,95	1,54± 0,32	1,39± 0,20
«Nero», см	1,74± 0,35	1,42± 0,46	1,78± 0,21	2,42± 0,56	2,60± 0,30	3,27± 0,43	1,84± 0,27	1,73± 0,39
«Viking», см	2,07± 0,41	2,46± 0,64	3,03± 0,37	1,84± 0,18	2,41± 0,48	4,04± 0,87	2,07± 0,38	2,57± 0,53
«Amit», см	3,03± 0,68	3,02± 0,62	2,75± 0,39	2,63± 0,37	4,18± 0,59	3,40± 0,28	2,49± 0,38	3,51± 0,79

При использовании стандартной среды Мурасиге и Скуга с полным составом макро- и микроэлементов и концентрацией цитокинина 6-БАП 1,5 мг/л высота аронии древовидной «Brilliant» составила $4,23 \pm 0,73$ см, у аронии черноплодной «Hugin» $3,68 \pm 0,95$ см, у аронии сливолистной «Nero» $3,27 \pm 0,43$ см, аронии сливолистной «Viking» $4,04 \pm 0,87$ см. У аронии Мичурина «Amit» высота побегов составляла в среднем $4,18 \pm 0,59$ см на среде Мурасиге и Скуга с содержанием 1 мл/л цитокинина 6-БАП. На рисунке 21 представлено влияние 6-БАП на высоту образовавшихся побегов сортов рода Арония.

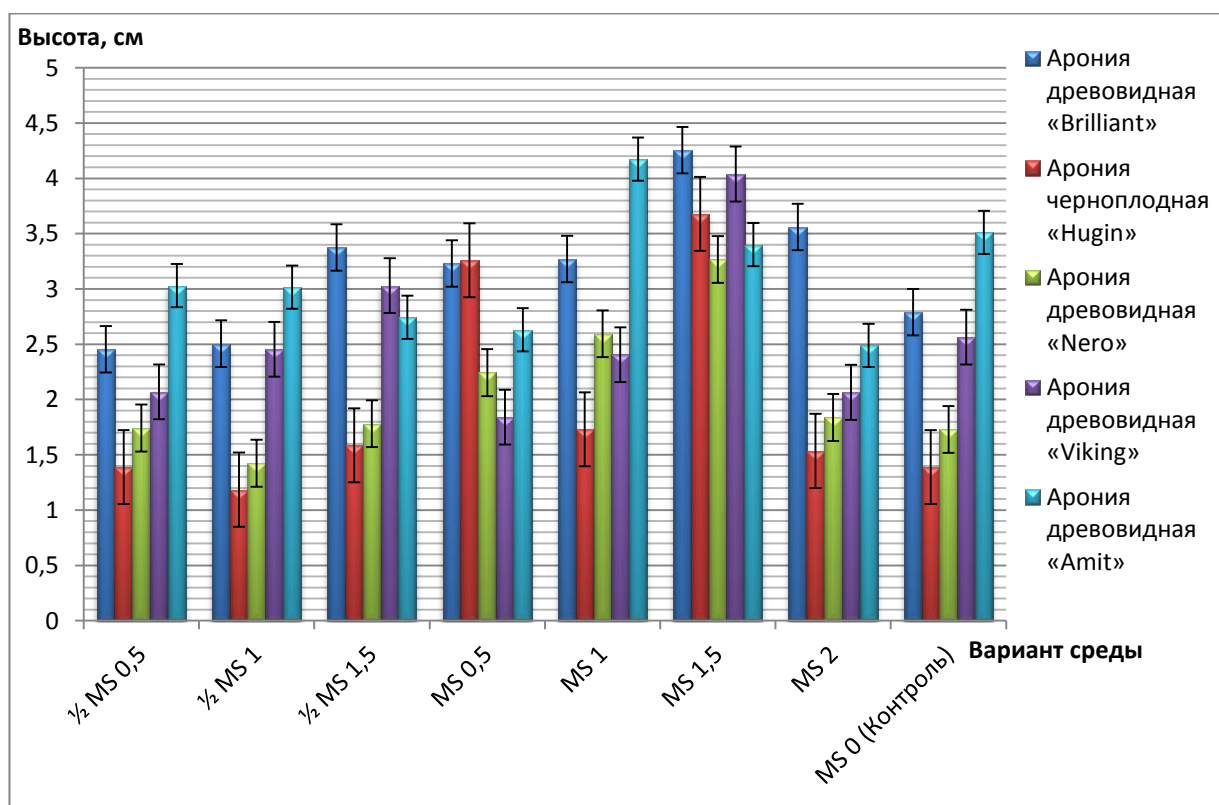


Рис. 21. Влияние цитокинина на высоту образовавшихся побегов сортов рода *Aronia*

Каллусообразования и спонтанного корнеобразования на данных вариантах сред у сортов не наблюдалось.

3.4. Влияние типа и концентрации ауксина на эффективность ризогенеза сортов аронии

Результаты многочисленных исследований показывают, что одним из обязательных условий, необходимых для эффективного укоренения и роста побегов *in vitro*, является грамотное использование экзогенных гормональных препаратов. Регуляторы роста растения – малые органические молекулы, которые синтезируются в отдельных органах или тканях, и вызывают определенные отклики либо непосредственно в месте, где они синтезированы, либо после транспортировки в другие органы и ткани.

Природный ауксин в растениях представлен в основном в виде β-индолил-3-уксусной кислоты (гетероауксином) – ИУК. Наиболее выраженный эффект ауксина проявляется в стимуляции роста. Ауксин играет важную роль в процессах регенерации при размножении каллусных клеток; в процессе образования придаточных и боковых корней, луковиц, при заложении вегетативных почек [Chalupa, 1987; Калинин и др., 1992].

Для практических целей в сельском хозяйстве часто применяют не ИУК, а синтетические ауксины, так как они в растениях не разрушаются ИУК-оксидазой. Молекулы синтетических ауксинов имеют разную структуру, они содержат ароматическое или гетероциклическое кольцо, боковая часть которого представлена остатком алифатической кислоты. Это – индолил-3-масляная кислота (ИМК); α-нафтил-1-уксусная кислота (НУК); 2,4 - дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д); фенилуксусная кислота (ФУК); фенилмасляная (ФМК). 2,4-Д применяют для индукции каллуса, для роста суспензионных культур, в сочетании с другими фитогормонами для индукции соматического эмбриогенеза. ИУК, ИМК, НУК, ФУК и ФМК применяют в качестве индукторов образования корней, а в сочетании с цитокининами эти фитогормоны могут быть использованы для развития проростков при культивировании изолированных зародышей и клональном микроразмножении побегов [Джигадло, 2005].

Поскольку фитогормоны типа ауксинов существенно стимулируют корнеобразование, этот процесс можно значительно активизировать, вводя в черенки вещества с аналогичным действием.

В результате исследований было выявлено, что близкие в систематическом отношении генотипы могут отличаться по способности к ризогенезу микрочеренков *in vitro*.

Анализ полученных в ходе выполнения экспериментов данных, показывают, что сорта рода Арония на гормональных средах укореняются в среднем на 81,5–90,6%. На рисунке 22 представлены укорененные микрорастения аронии Мичурина «Amit».



Рис. 22. Укорененные экспланты аронии Мичурина «Amit»

В ходе исследования для каждого сорта были подобраны среды с определенным количеством фитогормонов для наиболее активного укоренения микрорастений. Результаты исследования по определению количества образовавшихся корней на этапе укоренения представлены в таблице 9.

Влияние фитогормонов на количество образовавшихся корней у
микрочеренков сортов рода Арония.

Сорт	Концентрация фитогормонов, мг/л						
	ИУК 0,5 + ГК 0,5	ИУК 0,5	ИУК 1	ИМК 0,5 + ГК 0,5	ИМК 0,5	ИМК 1	Контроль
«Brilliant», шт.	2,25± 0,66	3,88± 1,03	2,50± 0,75	1,23± 0,55	1,56± 0,76	2,30± 0,94	1,25± 0,69
«Hugin», шт	2,50± 1,00	1,75± 0,66	1,13± 0,67	2,06± 1,33	1,81± 1,16	3,06± 1,15	1,31± 0,64
«Nero», шт	1,63± 0,47	2,32± 0,86	1,79± 0,85	1,58± 0,86	1,58± 0,76	1,42± 0,64	1,58± 0,71
«Viking», шт	1,95± 0,78	2,26± 0,86	2,05± 0,80	1,84± 0,62	1,74± 0,65	2,11± 0,87	1,84± 0,71
«Amit», шт	2,00± 0,56	3,50± 1,33	2,50± 1,11	2,11± 0,91	2,33± 0,89	4,17± 1,52	1,67± 0,59

В ходе анализа полученных результатов исследования среда Мурасиге и Скуга с содержанием ауксина ИУК 0,5 мг/л рекомендована для сортов «Brilliant» 3,88±1,03 шт., «Nero» 2,32±0,86 шт., «Viking» 2,26±0,86 шт. Среда Мурасиге и Скуга с содержанием ауксина ИМК 1 мг/л рекомендована для сортов «Hugin» 3,06±1,15 шт. и «Amit» 4,17±1,52 шт. Данные обрабатывали статистически, через программу Exel 2010. Для определения достоверности различий полученных результатов использовали t-критерий Стьюдента. Различия достоверны при $p < 0,05$.

Для сортов, принадлежащих к одному виду аронии, также необходимо подбирать индивидуальный фитогормональный состав и индивидуальные условия культивирования, для получения максимального числа укорененных растений.

Кроме этого, было изучено влияние различных концентраций фитогормонов в питательной среде на рост образовавшихся корней, что имеет влияние на дальнейшую адаптацию микрорастений к нестерильным условиям. Результаты опыта представлены в таблице 10.

Влияние фитогормонов на длину образовавшихся корней сортов рода Арония

Сорт	Концентрация фитогормонов, мг/л						
	ИУК 0,5 + ГК 0,5	ИУК 0,5	ИУК 1	ИМК 0,5 + ГК 0,5	ИМК 0,5	ИМК 1	Контроль
«Brilliant», см	3,31± 1,80	2,65± 2,20	3,00± 2,84	1,28± 0,99	3,59± 2,44	2,99± 1,26	2,68± 1,26
«Hugin», см	2,98± 1,23	2,88± 0,92	3,08± 1,20	2,34± 0,86	2,87± 2,10	1,79± 1,28	2,86± 1,80
«Nero», см	2,16± 1,44	3,51± 1,94	2,88± 1,20	1,54± 1,07	2,43± 1,54	2,57± 1,68	2,80± 1,53
«Viking», см	3,44± 1,68	2,02± 1,22	3,32± 1,79	2,45± 1,49	5,95± 2,97	2,56± 1,39	3,52± 1,42
«Amit», см	3,05± 1,54	3,59± 1,57	3,50± 1,89	2,61± 2,14	4,39± 2,48	3,43± 1,41	2,61± 1,63

При анализе полученных данных во время исследования влияния типа и концентрации ауксинов на длину образовавшихся корней было выявлено, что для сортов «Brilliant» (3,59±2,44 см), «Viking» (5,95±2,97 см) и «Amit» (4,39±2,48 см) рекомендована среда Мурасиге и Скуга с содержанием ауксина ИМК 0,5 мг/л. Для сорта аронии «Hugin» (2,98±1,23 см) – Мурасиге и Скуга с ИУК 1 мг/л. Для сорта аронии «Nero» (3,51±1,94 см) – Мурасиге и Скуга с ИУК 0,5 мг/л. Данные обрабатывали статистически, через программу Excel 2010. Для определения достоверности различий полученных результатов использовали t-критерий Стьюдента. Различия достоверны при $p < 0,05$.

В ходе выполнения эксперимента при подборе различных концентраций ауксинов было установлено, что для оптимизации процесса ризогенеза разных сортов ароний необходимо использовать различные типы и концентрации ауксинов: для сорта «Nero» – ИУК 0,5 мг/л; «Brilliant» и «Viking» – ИМК 0,5 мг/л или ИУК 0,5 мг/л; «Hugin» – ИМК 1 мг/л или ИУК 1 мг/л; «Amit» – ИМК 0,5 мг/л или 1 мг/л (рис. 23).

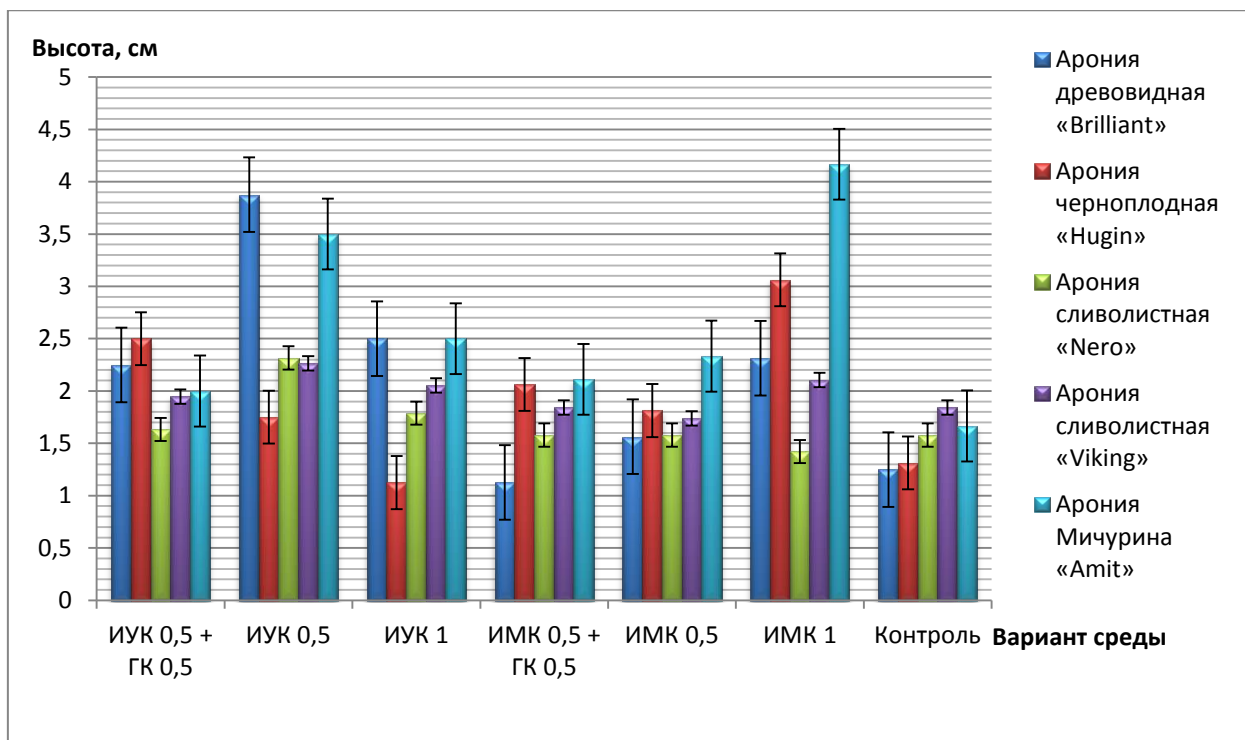


Рис. 23. Влияние типа и концентрации ауксина на эффективность ризогенеза сортов рода *Aronia*

Подбор оптимальных концентраций ауксинов для их использования при культивировании растений в условиях *in vitro* позволяет добиться ускоренного образования корней и интенсифицировать процесс ризогенеза.

3.5. Перевод растений в нестерильные условия культивирования

Этап адаптации пробирочных растений к нестерильным условиям среды является завершающим и зачастую критическим этапом клонального микроразмножения растений. Из-за неправильного выбора условий возможно полное выпадение адаптируемых растений. Кроме того, адаптация данных растений затруднена вследствие таких причин, как:

1) слабый или недостаточный контроль растением процессов транспирации на стадии адаптации;

2) пониженная способность к фотосинтезу из-за гетеротрофного способа питания на предыдущих адаптации стадиях культивирования растений.

На рисунке 24 представлены сорта аронии после адаптации к нестерильным условиям в тепличных условиях.



Рис. 24. Сорта аронии после адаптации к нестерильным условиям в теплице

При клональном микроразмножении влажность воздуха в колбе достигает почти 100%, поэтому растения очень чувствительны к снижению содержания влаги в воздухе и при ее понижении может произойти быстрое высыхание листьев. Помимо этого, дополнительная гибель может происходить благодаря высокой инфекционной нагрузке, при использовании нестерильного торфяного субстрата.

Результативность этапа адаптации и выбор схемы перевода растений *ex vitro* определяется, прежде всего, биологическими особенностями культуры. Разные виды растений существенным образом отличаются по способности без потерь переходить из условий *in vitro* в условия *in vivo*. Кроме того, на эффективность адаптации влияет способ укоренения микрочеренков и

условия развития микрорастений на предшествующем высадке в грунт этапе, срок высадки в нестерильные условия и другие факторы.

Лучшим сроком пересадки микрорастений в почву на адаптацию в теплицы, после укоренения их в стерильных условиях, является весенний период.

В нашем случае, в начале весны высаживали укорененные микрорастения из культуральных сосудов в почвенный субстрат на основе минерализованного торфа в кассеты на 96 ячейки (рис. 25, 26).

Кассеты с растениями помещали в пленочную теплицу. В солнечные дни теплицу затеняли. Под пленочным покрытием растения находились в течение 1,5 месяцев, а затем пленку постепенно полностью снимали.



Рис. 25. Арония древовидная «Brilliant» после адаптации в теплице



Рис. 26. Арония черноплодная «Hugin» после адаптации в теплице

Как показали результаты нашей работы, при хороших условиях адаптации, сорта аронии переходят в условия *in vivo* с высокой частотой и хорошо развиваются на этапе адаптации, что делает все сорта аронии весьма перспективными культурами для тиражирования методом клонального микроразмножения.

Выводы

1. В результате исследования были выявлены сорта аронии наиболее богатые антоцианами, которые могут быть успешно размножены биотехнологическими методами. К ним относятся арония черноплодная «Hugin» – 2,07 г/100г и арония древовидная «Brilliant» – 1,42 г/100г, в них содержание антоцианов больше, чем в остальных сортах почти в два и в три раза соответственно.

2. Стерилизация сортов аронии на стадии введения в культуру *in vitro*, проведенная с помощью бытового стерилизатора «Белизна», позволяет добиться достаточно высокой жизнеспособности эксплантов, которая составила 55-92%. Наибольшее число вновь образовавшихся побегов выявлено у аронии сливолистной «Viking» – $5,08 \pm 2,57$ шт. при средней длине побега $0,86 \pm 0,55$ см.;

3. Для размножения эксплантов всех изученных сортов аронии рекомендована среда Мурасиге и Скуга с разным содержанием цитокинина 6-БАП: для сортов «Brilliant», «Nero» и «Viking» – 1,5 мг/л; сорта «Amit» – 1 мг/л; «Hugin» – 0,5 мг/л для максимального побегообразования или 1,5 мг/л – для максимального вытягивания эксплантов.

4. Установлено, что для оптимизации процесса ризогенеза разных сортов ароний необходимо использовать различные типы и концентрации ауксинов: для сорта «Nero» – ИУК 0,5 мг/л; «Brilliant» и «Viking» – ИМК 0,5 мг/л или ИУК 0,5 мг/л; «Hugin» – ИМК 1 мг/л или ИУК 1 мг/л; «Amit» – ИМК 0,5 мг/л или 1 мг/л.

5. Адаптация растений сортов аронии, полученных при использовании разработанных сред и режимов культивирования характеризуется высокой степенью выживаемости (97-99%) к нестерильным условиям, что делает их перспективными объектами для массового тиражирования методом клонального микроразмножения.

Список использованных источников

1. Андреев Л.Н., Горбунов Ю.Н. Роль ботанических садов России в сохранении биологического разнообразия растений // Тезисы III-й Международной научной конференции «Биологическое разнообразие. Интродукция растений». СПб. 2003. С. 5–7.
2. Барабаш Т.П. Черноплодная рябина – перспективная культура // Садоводы-мичуринцы Горного Алтая. Горно-Алтайск. 1960. С. 67–73.
3. Белокурова Е.В., Листван П.Д., Майстров Й.Й. и др. Использование методов биотехнологии растений для сохранения и изучения биоразнообразия мировой флоры // Цитология и генетика. 2005. № 1. С. 41–51.
4. Блюднева Е.А. Т.А. Крицкая, А.С. Кашин Использование клонального микроразмножения для массового получения посадочного материала декоративных и плодово-ягодных культур в ботаническом саду СГУ // Интродукция растений // Бюллетень Ботанического сада Саратовского государственного университета. 2016. Т. 14, № 1. С. 99–105.
5. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе. М.: Наука. 1999. 279 с.
6. Васильченко Г.В., Проценко В.И. Черноплодная рябина. М.: Колос. 1967. 95 с.
7. Ветчинкина Е.М. Биологические особенности культивирования *in vitro* семян и зародышей редких видов растений: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2010. 41 с.
8. Виноградова Ю.К., Горбунов Ю.Н., Макридин А.И. и др. Разработка принципов сохранения и воспроизводства генетических фиторесурсов // Фундаментальные основы управления биологическими ресурсами. М.: Наука, 2005. С. 343–351.
9. Виноградова Ю.К., Куклина А.Г. Арония Мичурина: от создания до натурализации. М.: ГЕОС, 2014. 137 с.

10. Воробьев Б.И. Черноплодная рябина // Флора. 2001. №1. С. 40–42.
11. Высоцкий В.А. Биотехнологические методы в системе производства оздоровленного посадочного материала и селекции плодовых и ягодных растений: Автореф. дис ... докт. с.-х. наук. М., 1998. 30 с.
12. Высоцкий, В.А., Таришвили З.Т. Микроразмножение здорового посадочного материала ягодных культур // Садоводство. 1982. №2. С. 22–23.
13. Горбунов Е.Н., Ветчинкина Е.М., Мамаева Н.А. и др. Клональное микроразмножение как метод сохранения редких и ценных видов растений // Современные направления деятельности ботанических садов и держателей ботанических коллекций по сохранению биоразнообразия растительного мира. Материалы междунар. науч. конфер., посвященной 100-летию со дня рождения академика Н.В. Смольского. Минск. 2005. С. 204–207.
14. Дейнека, Л.А., Шапошников, А.А., Дейнека, В.И. и др. Антоцианы: природные антиоксиданты и не только // Научные ведомости БелГУ. Белгород. 2006. №2. С. 92–100.
15. Деменко В.И. Проблемы и возможности микроклонального размножения садовых растений. Введение в культуру // Известия ТСХА. 2005. В. 2. С. 48–58.
16. Джигадло Е.Н. Методические рекомендации по использованию биотехнологических методов в работе с плодовыми, ягодными и декоративными культурами. Орел: ГНУ ВНИИСПК. 2005. 51 с.
17. Дорошина О.Н., Ерёмина И.А. Биохимические характеристики плодов черноплодной рябины (аронии) в процессе длительного хранения в замороженном состоянии // Пищевые продукты и экология. Кемерово: Технологический институт. 1998. С. 125–126.
18. Жунгиету И.И. Арония черноплодная – ценный для Молдавии ягодный кустарник // Садоводство, виноградарство и виноделие Молдавии. 1975. №4. С. 24.
19. Игнатенко М.А. Арония черноплодная // Цветоводство. 1965. №6. С. 8–10.

20. Исаченко Л.М. Сорты аронии черноплодной // Плодоводство. 2002. Т 14. С. 156–158.
21. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микрклонального размножения растений. Киев: Наукова Думка. 1992. 232 с.
22. Калинин Ф.П., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев: Наукова думка. 1980. 486 с.
23. Камзолова О.И., Исаченко Л.М., Липская С.Л. Химический состав плодов аронии черноплодной // Плодоводство. 2002. Т. 14. С. 136–139.
24. Катаева Н.В., Бутенко Р.Г. Клональное микроразмножение растений. М.: Наука. 1983. 97 с.
25. Кашин В.И., Высоцкий В.А. Перспективы использования биотехнологических приемов в создании новых высокоадаптивных форм плодовых и ягодных растений // Использование биотехнологических методов для решения генетико-селекционных проблем. Мичуринск. 1998. С. 3–8.
26. Куклина А.Г., Семерикова Е.А., Молканова О.И. Опыт клонального микроразмножения голубых жимолостей // Бюллетень главного ботанического сада. 2003. № 185. С. 160–167.
27. Куминов Е.П. Нетрадиционные садовые культуры. Ростов н/Д: Феникс. 2005. 256 с.
28. Курьянов М.А. Рябина и арония черноплодная // Нетрадиционные садовые растения. Мичуринск: ВНИИС им. И.В.Мичурина. 1994. С. 264–289.
29. Кутас Е.Н. Научные основы клонального микроразмножения растений на примере интродуцированных сортов голубики высокой и брусники обыкновенной: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. М., 1997. 40 с.
30. Кухарчик Н.В., Семенов Н.В., Колбанова С.Э. Культура *in vitro* в размножении и оздоровлении плодовых и ягодных растений // Актуальные проблемы освоения достижений науки в промышленном плодоводстве. Самохваловичи: РУП «Института плодоводства». 2002. С. 107–113.
31. Майорова, Ю.А. Оптимизация этапов клонального микроразмножения гибридов вишни на основе применения новых

биологически активных веществ: Дис. ... канд. биол. наук. Краснодар, 2009. 133 с.

32. Милехин А.В., Рубцов С.Л. Технология микрклонального размножения хризантемы в условиях *in vitro* // Молодой ученый. 2015. №24. С. 335–338.

33. Москвитин С.А. Эколого-ботаническое изучение родов *Sorbus* L., *Aronia* коллекции Ботсада Кубанского агроуниверситета // Бюллетень Ботанического сада им. И.С. Косенко. 1994. №1. С. 50–54.

34. Муратова С.А., Шорников Д.Г., Янковская М.Б. Размножение садовых культур *in vitro*: методические рекомендации. Мичуринск-наукоград. 2008. 69 с.

35. Мусич Н.И., Алексеенко И.И. Биологические особенности роста, развития и плодоношения аронии черноплодной // Охрана, изучение и обогащение растительного мира. 1978. №5. С. 50–55.

36. Мусич Н.И., Андриенко М.В. Алексеенко И.И. Арония (рябина) черноплодная. Киев: Вища школа. 1986. 80 с.

37. Мятковский О.Н. О перспективах интродукции рябины черноплодной в Калужской области // 2-я краеведческая конференция Калужской области. Калуга-Обнинск. 1970. С. 60–64.

38. Мятковский О.Н., Телюков Л.Т. Черноплодная рябина // Садоводство. 1966. № 10. С. 20–21.

39. Новикова Т.И., Набиева А.Ю., Полубоярова Т.В. Сохранение редких и полезных растений в коллекции Центрального Сибирского ботанического сада // Вестник ВОГиС. 2008. Т.12, №4. С. 564–572.

40. Плохарски В., Смоляж К., Выращивание аронии черноплодной и ее пригодность для пищевой промышленности (пер.) // ВНИИТЭИ агропром. 1996. С. 14–19.

41. Решетова А.С., Кашин А.С. Особенности клонального микроразмножения рябины сорта «Гранатная» // Известия Саратовского университета. 2013. Т.13. С. 58–65.

42. Рыжков А.П. Биологические особенности рябины черноплодной в условиях юга лесостепи Омской области // Научные чтения памяти академика М.А. Лисавенко. Барнаул. 1973. С. 39–45.

43. Свитайло А.М., Бондаренко П.Е., Шевчук Н.С. Клональное микроразмножение подвоев и сортов плодовых культур // Биология культивируемых клеток и биотехнология. Новосибирск. 1988. Т.2. С. 346–151.

44. Сидорович Е.А., Кутас Е.Н. Клональное микроразмножение новых плодово-ягодных растений. Минск. 2011. 282 с.

45. Сковородников Д.Н., Райков И.А. Некоторые аспекты использования цитокининов различной природы на этапе введения в культуру *in vitro* эксплантов смородины черной // Плодоводство и ягодоводство России. 2009. Т. 22. С. 292–296.

46. Соловых Н.В. Использование биотехнологических методов в работе с ягодными культурами: методические рекомендации. Мичуринск-Наукоград. 2009. 47 с.

47. Сорокопудов В.Н., Дейнека В.И., Лукина И.П., Дейнека Л.А. Антоцианы плодов некоторых видов рода *Rubus* L. из коллекции Ботанического сада БелГУ // Химия растительного сырья. 2005. №4. С. 61–65.

48. Сорокопудов В.Н., Сорокопудова О.И., Мячикова Н.И. Редкие культуры в вашем саду: учебно-методическое пособие. Белгород: ИПК НИУ «БелГУ». 2012. 92 с.

49. Танчев С.С. Антоцианы в плодах и овощах. М.: Пищевая промышленность. 1980. 304 с.

50. Тимофеева В.Н., Саманкова Н.В., Исаченко Л.М. и др. Плоды аронии черноплодной – перспективное сырье для комплексной переработки // Плодоводство. 2007. Т. 19. С. 338–343.

51. Тимофеева О.А., Невмержицкая Ю.Ю. Клональное микроразмножение растений: учебно-методическое пособие. Казань: Казанский университет. 2012. 59 с.
52. Хабаров С.Н., Архипова Т.Н., Шишкина Е.Е. Черноплодная рябина: краткая история культуры, прогрессивные способы возделывания и переработки плодов // Состояние и проблемы садоводства России. Новосибирск: Сибирское отделение РАСХН, 1997. С. 139–147.
53. Чуб В.В. Для чего нужны антоцианы // Цветоводство. 2008. №6. С. 22–25.
54. Шипунова, А.А. Подбор минеральной основы питательных сред для клонального микрокразмножения жимолости в производственных условиях // Сборник научных работ ВСТИСП «Плодоводство и ягодоводство России». 2001. С. 158–163.
55. Шишкина Е.Е. Химический состав плодов рябины черноплодной и некоторых продуктов ее переработки // Научные чтения памяти академика М.А. Лисавенко. 1973. №4. С. 25–29.
56. Шорников Д.Г., Брюхина С.А., Муратова С.А. и др. Оптимизация условий культивирования *in vitro* ягодных и декоративных культур // Вестник ТГУ. 2010. Т.15, №. 2. С. 640–645.
57. Brand. M.H., Cullina W.G. Micropropagation of red and black chokeberry (*Aronia spp.*) // HortScience. 1992. V.27. P. 81–89.
58. Chalupa V. *In vitro* propagation of willows (*Salix spp.*), European mountain ash (*Sorbus aucuparia* L.) and black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) // Biol. Plant. 1983. V. 29. P. 305–307.
59. Chalupa V. Effect of benzylaminopurine and thidiazuron on *in vitro* shoot proliferation of *Tilia cordata* Mill., *Sorbus aucuparia* L. and *Robinia pseudoacacia* L. // Biol. Plant. 1987. V. 29. P. 425–429.
60. Giusti M., Wrolstad R.E. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-Visible spectroscopy // Current protocols in food analytical chemistry. 2001. P. 211–213.

61. Lee J.E., Kim G.S., Park S., Kim Y.H., Kim M.B. Determination of chokeberry (*Aronia melanocarpa*) polyphenol components using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Overall contribution to antioxidant activity // Food Chem. 2014. V. 146. P. 1–5.

62. Litwinczuk, W. Propagation of black chokeberry (*Aronia melanocarpa* Elliot) through *in vitro* culture // EJPAU. 2002. V.5, P. 2–7.

63. 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.

64. Strik B., Wrolstad R. Performance of Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) in Oregon, USA // Acta Hort. 2003. V. 626. P. 447–451.

Выпускная квалификационная работа выполнена мной самостоятельно.
Все использованные материалы опубликованной научной литературы и
других источников имеют ссылки на них.

« _____ » _____ 2017 г.

(подпись)

(Ф.И.О.)