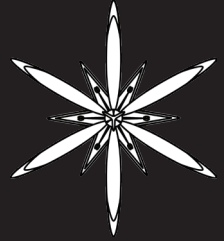


MODERN PHYTOMORPHOLOGY



ISSN 2226-3063
e-ISSN 2227-9555



Volume 10

2016

Editor-in-Chief
Editorial Assistant
Executive Editor

TASENKEVICH L.O. *Ivan Franko National University of Lviv, Lviv, Ukraine*
KONDRATYUK S.YA. *M.G. Kholodny Institute of Botany NASU, Kyiv, Ukraine*
NOVIKOFF A.V. *State Natural History Museum NASU, Lviv, Ukraine*

Editorial Board

BERKO YO.M.	<i>S.Z. Gzlytskyj Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies, Lviv, Ukraine</i>
BUDZHAK V.V.	<i>Yuriy Fedkovich Chernivtsi National University, Chernivtsi, Ukraine</i>
BUKHTIYAROVA L.N.	<i>Institute for Evolutionary Ecology NASU, Kyiv, Ukraine</i>
DANYLUK K.M.	<i>State Natural History Museum NASU, Lviv, Ukraine</i>
DEROIN T.	<i>National Museum of Natural History, Paris, France</i>
EBERWEIN R.	<i>Carinthian Botanic Center, Klagenfurt am Woerthersee, Austria</i>
KALINOVYCH N.O.	<i>Ivan Franko National University of Lviv, Lviv, Ukraine</i>
KLYMYSHYN O.S.	<i>State Natural History Museum NASU, Lviv, Ukraine</i>
KORZHENEVSKY V.V.	<i>Nikitsky Botanical Gardens – National Scientific Centre, Yalta, Ukraine</i>
KORZENIAK J.	<i>Institute for Nature Conservation PAS, Cracow, Poland</i>
LOBACHEVSKA O.V.	<i>Institute of Ecology of the Carpathians of NAS of Ukraine, Lviv, Ukraine</i>
MAMCHUR Z.I.	<i>Ivan Franko National University of Lviv, Lviv, Ukraine</i>
MITKA J.	<i>Institute of Botany Jagiellonian University, Cracow, Poland</i>
ODINTSOVA A.V.	<i>Ivan Franko National University of Lviv, Lviv, Ukraine</i>
OSTASH B.O.	<i>Ivan Franko National University of Lviv, Lviv, Ukraine</i>
PERUZZI L.	<i>University of Pisa, Pisa, Italy</i>
TEREK O.I.	<i>Ivan Franko National University of Lviv, Lviv, Ukraine</i>
TIEZZI A.	<i>Tuscia University, Viterbo, Italy</i>
FEDORENKO V.O.	<i>Ivan Franko National University of Lviv, Lviv, Ukraine</i>
TSARYK YO.V.	<i>Ivan Franko National University of Lviv, Lviv, Ukraine</i>
CHERNOBAY YU.M.	<i>State Natural History Museum NASU, Lviv, Ukraine</i>
CHORNEJ I.I.	<i>Yuriy Fedkovich Chernivtsi National University, Chernivtsi, Ukraine</i>
SHIPUNOV A.	<i>Minot State University, Minot, USA</i>
SHEVCHENKO S.V.	<i>Nikitsky Botanical Gardens – National Scientific Centre, Yalta, Ukraine</i>
SZCZEPANEK K.	<i>Institute of Botany Jagiellonian University, Cracow, Poland</i>

Approved for publication by Scientific Council of the State Natural History Museum NAS Ukraine

Modern Phytomorphology. – Lviv, 2016. – Vol. 10 – 134 p.

Indexed/abstracted in algaeBASE, CABI, CiteFactor, CNKI Scholar, CORE, DOAJ, DRJI, EBSCO, E-journals, EZB, Genamics JournalSeek, Global Impact Factor, Google Scholar, Index Copernicus, IPNI, JIFactor, JournalRate, OAlib, PBN, POL-index, PubAg (Agricola), Ulrichsweb, Vifabio, WorldCat, WorldWideScience.

www.phytomorphology.org

© Modern Phytomorphology
© State Natural History Museum NAS Ukraine

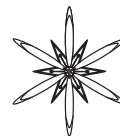
Technical Editor
Layout
Design
Cover photo

NOVIKOFF A.V.
NOVIKOFF A.V.
NOVIKOFF-SUPP M.R., NOVIKOFF A.V.
NOVIKOFF-SUPP M.R.

CONTENTS

TEIXEIRA DA SILVA J.A. <i>Cyclamen</i> caulogenesis, rhizogenesis and microtuberization	3
TEIXEIRA DA SILVA J.A. The <i>in vitro</i> culture of <i>Holostemma</i> species: a critical analysis	11
ÇOBANOĞLU G., SESAL C., AÇIKGÖZ B., KARALTI İ. Evaluation of antimicrobial activity of the lichens <i>Physcia aipolia</i> , <i>Xanthoria parietina</i> , <i>Usnea florida</i> , <i>Usnea subfloridana</i> and <i>Melanohalea exasperata</i>	19
ABBASIAN S., KESHAVARZI M. Macro- and micromorphological studies of <i>Clypeola</i> species (Brassicaceae) in Iran.....	25
KESHAVARZI M., BEHZADIFAR M., NAZEM BOKAEE Z. Pollen morphology of some <i>Geranium</i> subgenus <i>Robertium</i> species of Iran.....	39
НУЖИНА Н.В., БАГЛАЙ К.М. Анатомічна будова стебла та посухостійкість <i>Aylostera flavistyla</i> , <i>Mammillaria bocasana</i> та <i>Echinocactus grusonii</i>	47
NUZHNYA N., BAGLAY K. Anatomical structure of the stem and drought resistance of <i>Aylostera flavistyla</i> , <i>Mammillaria bocasana</i> and <i>Echinocactus grusonii</i>	47
КАЛАШНИК Г.В., ГАЙДАРЖИ М.М. Рід <i>Rebutia</i> (Cactaceae): зміна анатомо-морфологічних ознак в прегенеративний період	53
KALASHNYK G.V., GAJDARZHU M.M. The genus <i>Rebutia</i> (Cactaceae): change of the anatomical and morphological characteristics during the pregenerative period	53
КОТЮК Л.А. Особливості мікроморфологічної будови гісопу лікарського	59
KOTYUK L.A. Features of micromorphological structure of medicinal hyssop.....	59
ІВАЩЕНКО І.В., РАХМЕТОВ ДЖ.Б. Біоморфологічні особливості <i>Serratula coronata</i> L. (Asteraceae) за умов інтродукції в ботанічному саду ЖНАЕУ.....	69
IVASHCHENKO I.V., RAKHMETOV DZ.B. Biomorphological features of <i>Serratula coronata</i> L. (Asteraceae) introduced in ZHNAEU' s Botanical Garden.....	69
РУДИК Г.О. Морфоструктура суцвіть <i>Agastache breviflora</i> (A. Gray) Epling, <i>A. rugosa</i> (Fisch. & C.A. Mey.) Kuntze та <i>A. rupestris</i> (Greene) Standl. (родина Lamiaceae) <i>ex situ</i>	81
RUDIK G.O. Morphological structure of inflorescences of <i>Agastache breviflora</i> (A. Gray) Epling, <i>A. rugosa</i> (Fisch. & C.A. Mey.) Kuntze, and <i>A. rupestris</i> (Greene) Standl. (family Lamiaceae) <i>ex situ</i>	81
ЦАРЕНКО О.М. Морфолого-анатомічні особливості горішків видів <i>Anemone</i> L. (Ranunculaceae Juss.) флори України.....	87
TSARENKO O.M. Morphological and anatomical features of achenes of <i>Anemone</i> L. (Ranunculaceae Juss.) of the flora of Ukraine.....	87
ДРЕМЛЮГА Н.Г., ФУТОРНА О.А. Морфологічна характеристика насінин видів підсекції <i>Heterophylla</i> (Nym.) Fed. роду <i>Campanula</i> L. флори України	95
DREMLIUGA N.G., FUTORNA O.A. Morphological characteristics of the seeds of species from subsection <i>Heterophylla</i> (Nym.) Fed. of the genus <i>Campanula</i> L. in the flora of Ukraine.....	95
ГНАТЮК А.М. Морфологічні особливості листків <i>Delphinium sergii</i> Wissjul. в онтогенезі	103
GNATIUK A.M. Morphological features of <i>Delphinium sergii</i> Wissjul. leaves in ontogeny.....	103

Жук О.І. Ріст і продуктивність колоса <i>Triticum aestivum</i> L. за різних умов мінерального живлення	111
ZHUK O.I. The ear growth and productivity of <i>Triticum aestivum</i> L. under different mineral nutrition	111
Жук І.В., Дмитрієв О.П., Лісова Г.М. Специфіка дії еліситорів на макроморфогенез у <i>Triticum aestivum</i> за умов одночасного ураження <i>Septoria tritici</i> та <i>Puccinia recondita</i>	117
ZHUK I.V., DMITRIEV A.P., LISOVA G.M. The specifics of elicitor effect on <i>Triticum aestivum</i> L. macromorphogenesis under simultaneous lesion by <i>Septoria tritici</i> and <i>Puccinia recondita</i>	117
ШКУРАТОВА Н.В. Анатомія кори <i>Populus tremula</i> L. и <i>P. davidiana</i> Dode в зв'язи с их систематикой	125
SHKURATOVA N.V. Anatomy of bark of <i>Populus tremula</i> L. and <i>P. davidiana</i> Dode in relation with their systematics	125
Азизов И., Шамилов Э., Абдуллаев А. Влияние новосинтезированных комплексов цинка с аминокислотами на энергию прорастания семян и содержание хлорофилла в проростках пшеницы.....	129
AZIZOV I., SHAMILOV E., ABDULLAYEV A. Influence of newly synthesized complexes of zinc with amino acids on seed vigor and chlorophyll content in wheat seedlings	129



CYCLAMEN CAULOGENESIS, RHIZOGENESIS AND MICROTUBERIZATION

JAIME A. TEIXEIRA DA SILVA

Abstract. The tissue culture of *Cyclamen persicum* Mill. of the Primulaceae family, and a popular ornamental pot plant, is well explored. This synopsis review provides an overview of the induction of shoots (caulogenesis), roots (rhizogenesis) and microtubers (microtuberization) *in vitro* as viable routes for the tissue culture of clonal material, primarily from the English literature.

Key words: *Cyclamen*, biotechnology, media, microtuber, plant growth regulator, tissue culture

P.O. Box 7, Miki-cho post office, Ikenobe 3011-2, Kagawa-ken, 761-0799, Japan; jaimetex@yahoo.com

Abbreviations

2,4-D – 2,4-dichlorophenoxyacetic acid
2iP – N⁶-(2-isopentenyl) adenine
AdS – adenine sulphate
BA – 6-benzyladenine
IAA – indole-3-acetic acid
Kin – kinetin
MS – Murashige and Skoog medium
NAA – α -naphthaleneacetic acid
N-69 – Nitsch & Nitsch basal medium
PGR – plant growth regulator
SIM – shoot induction media
TDZ – thidiazuron
TCLs – thin cell layers

Introduction

The tissue culture of members of the genus *Cyclamen* L. (Primulaceae), geophytes (perennial, herbaceous, with a over- or underground storage organs) that are widespread in countries surrounding the Mediterranean, is well explored (JALALI *et al.* 2012). This mini-review aims to look at three *in vitro* processes related to the tissue culture of *Cyclamen* species, focusing primarily on *C. persicum* Mill., or Persian cyclamen: shoot induction (caulogenesis), root induction (rhizogenesis), and microtuber formation (microtuberization). These processes are examined in detail, but explored from a historical perspective. Callogenesis and somatic

embryogenesis, which are closely related, but which were recently covered elsewhere (TAGIPUR *et al.* 2016), will not be discussed in this manuscript.

The first two decades (1950s – 1970s)

The earliest known study on the *in vitro* culture of *C. persicum* was published by MAYER-HÖRSTER (1956) in which cubes from tubers (but referred to incorrectly as corms) including cambial tissue were induced to form callus in the presence of 0.08 mg/L α -naphthaleneacetic acid (NAA) or 40 mg/L adenine sulphate (AdS) and 0.2 mg/L NAA on WHITE'S (1963) basal medium or only roots in the presence of 1 mg/L NAA. STICHEL (1959) capitalized upon those initial findings, showing how only NAA up to 0.3 mg/L could induce shoots while an initial pulse of 0.3-0.5 mg/L NAA, followed by transfer onto medium with AdS induced both adventitious shoots and roots. LOEWENBERG (1969) also used tubers to prepare 4 mm³ explants after surface disinfecting whole tubers in 0.03% mercuric chloride (HgCl₂) overnight, rinsing in 1% sodium hypochlorite (NaOCl) and then trimming away the outer layers. Using modified White's medium with 10 mg/L NAA, Loewenberg induced callus in the dark at 25 °C although indole-3-acetic acid (IAA) or 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) could also induce callus. Tuber explants formed only

a very small amount of callus on medium free of plant growth regulators (PGRs). LOEWENBERG (1969) also found that White's medium was more conducive to callus induction than Heller (GAUTHERET 1954), MILLER (1961), NITSCH (1969), and MURASHIGE & SKOOG (1962) basal media. The 1969 Loewenberg *in vitro* trials also revealed that 6% sucrose produced more callus than 0.7% or 2% sucrose, and that sucrose induced more callus than fructose, galactose, glucose, maltose, glycerol or mannitol as a carbon source. Finally, Loewenberg showed that while AdS stimulated callus, asparagine and glutamic acid inhibited its formation. Curiously, in the same year, but on the other side of the world, OKUMOTO & TAKABAYASHI (1969) surface disinfected two-year old tubers that had just completed flowering by rinsing them in lukewarm water, dipping them in a solution of 14% NaOCl for 30 min, repeating the entire process, peeling away outer layers, and using explants 10 mm in diameter and 10 mm long from the core of surface disinfected tubers to induce root or shoots in the presence of 1 or 0.1 mg/L NAA, respectively when cultured in MS basal medium at 20 °C/10 °C (day/night). At this temperature, contamination and explant necrosis were reduced by about 10% relative to untreated (i.e., not surface disinfected) controls. Shoot buds could also be induced to form from tuber tissue when 1 mg/L NAA was combined with 20 or 100 mg/L AdS. As many as 30 shoot buds/explant could be induced. The surface disinfection process negatively affected organ formation (OKUMOTO & TAKABAYASHI 1969; PIERIK 1975). Even the use of achromycin, an antibiotic, by STICHEL (1959) was able to control bacterial infection. GEIER (1977), however, controlled 75% or 100% contamination when 50 and 100 mg/L achromycin were used in medium. Prior to that, Geier surface disinfected tubers, leaves, petioles and closed flower buds from 12-18 month old plants by immersing them in 3% NaOCl for 5-10 min, rinsing three times with sterile water, peeling outer tissues then leaving explants to soak in 0.03% HgCl₂ overnight, as suggested by LOEWENBERG (1969). After three rinses with sterile water, tubers were cut into 8 mm³ explants, anthers

were excised from closed buds and plated intact, 40 mm² (8 × 5 mm) leaf explants with midrib tissue were placed abaxial side down on medium while 8 mm long petioles were also plated on Nitsch basal medium. This protocol resulted in 100% contamination-free cultures. Although all cultures were initially placed in the dark at 24 °C, when roots or shoots formed, cultures were placed in a 15-h photoperiod at 10000-15000 lux. When tubers served as the explant, NAA at 0.5 or 2.5 mg/L with 0.5 or 1 mg/L kinetin (Kin) formed primarily callus, IAA at 0.1 or 0.5 mg/L with 0.5 mg/L Kin formed shoot buds, or shoot buds and roots when 2.5 mg/L IAA and 0.5 or 1 mg/L Kin were applied, while 0.1 mg/L 2,4-D with 0.5 mg/L Kin induced shoot buds. In several of these cases, organogenesis was possible in 100% of explants. Leaves, petioles and anthers were not as responsive as tuber tissue, although shoots could be induced from anthers with 1-5 mg/L IAA and 1-2.5 mg/L 6-benzyladenine (BA; see notes in TEIXEIRA DA SILVA 2012) in 25% of explants, but also formed petaloid organs and anther-like structures. In the same study, callus could be induced from somatic anther tissue by 1 mg/L each of NAA and Kin, while organogenesis from leaves was always indirect, i.e., via intermediate callus formation. Although GEIER (1977) claimed to test three varieties, he did not describe the response of each variety *in vitro*.

The first two decades thus showed that *in vitro* cultures could be established, albeit with difficulties in the control of infection, and that primarily corm tissue was responsive *in vitro*, when placed in suitable basal medium with carefully selected PGRs.

The 1980s

Many important basic findings of the response of different explants to *in vitro* culture were examined in the first three decades of *Cyclamen* tissue culture, focusing primarily on disinfection and explant responses to PGRs, but the 1980s and 1990s saw a few additional new ideas and progress in this field. Most likely the most obvious one was the discovery

by WICART *et al.* (1984), following a detailed histological analysis, that microtubers do not share any vascular continuity with the explant tissue, similar to somatic embryos (i.e., bipolar structures), and unlike shoot buds or adventitious roots (unipolar structures). Given the variable terminology that has emerged to describe different structures that have formed from *Cyclamen* explants *in vitro*, histological verification in *in vitro* studies is essential. ANDO & MURASAKI (1983) induced shoots of cv. 'Vuurbaak' from ~75% of etiolated petioles (distal half of 10-cm long petioles) in the dark on third-strength MS medium ($\frac{1}{3}$ MS) containing 500 μM adenine hydrochloride and 10 μM each of NAA and BA although the number of shoots formed per explant was not quantified. Despite the use of a simple explant disinfection procedure that involved rinsing in running tap water and dipping in 1% NaOCl for 15 min, the authors reported 0% contamination unlike 12.5% and 83% contamination in normal petioles and tubers, respectively. Expanding on that earlier protocol, MURASAKI & TSURUSHIMA (1988) transferred shoots that formed from etiolated petioles on $\frac{1}{3}$ MS with 0.037 mg/L NAA and 0.23 mg/L BA to a 16-h photoperiod at 2500 lux. Cv. 'Vuurbaak' was more receptive than cv. 'Victoria', with 74% vs 63% of explants forming shoots, respectively. Roots formed on 70% of explants and 95% of resulting plantlets that were transferred to the greenhouse survived. FUKUI *et al.* (1988), without providing any surface disinfection protocol, and also using cv. 'Vuurbaak', induced most and largest microtubers (which the authors referred to as tuber-like-organs) on $\frac{1}{2}$ MS medium supplemented with 10 μM NAA or BA from shoot tips, pedicels and apical tuber sections, the latter referred to incorrectly as bulbs, although the range of 0.1 to 1 μM of either NAA or BA also resulted in the formation of microtubers; even the control treatment, i.e., the lack of any PGRs, resulted in the formation of microtubers. However, the authors also claimed the formation of callus and somatic embryos at the same concentrations and from the same explants, but did not provide any histological proof. SCHWENKEL & GRUNEWALDT (1988)

surface disinfected leaves, petioles and peduncles by dipping them for 1 min in ethanol, 20 min in 2.6% NaOCl, and then washed them with autoclaved tap water. Cutting leaves into 8 mm² explants and petioles and peduncles into 6 mm long explants, the authors claimed the formation of shoots and callus from peduncles, and even the formation of plantlets, but many aspects of the study were unclear, and high levels of contamination (as much as 50% of explants) occurred. Using the WAINWRIGHT & HARWOOD (1985) protocol for establishing tissue culture from aseptic seedlings, HAWKES & WAINWRIGHT (1987) induced more adventitious leaves from cotyledons and tubers than from petioles and root explants derived from aseptic cv. 'Rosamunde' seedlings (0.62, 0.53, 0.22, 0.16 leaves/explant for cotyledons, tubers, petioles and roots, respectively) when cultured in light on $\frac{1}{2}$ MS medium supplemented with 1 mg/L BA and 1 mg/L NAA. Subculture of leaves on $\frac{1}{2}$ MS medium with 1 or 2.5 mg/L BA could not induce adventitious shoots.

The 1990s

ISHIZAKA & UEMATSU (1992) ushered in the 1990s with a study in which ovules derived from interspecific hybrids of *C. persicum* and *C. hederifolium* Aiton 30 days after pollination were cultured on either MS, White's or NITSCH (1951) basal media at 25°C in the light (16-h photoperiod, 3000 lux). In their study, ovaries were first disinfected with 70% ethanol for 60 s, 2% NaOCl for 30 min, then rinsed twice in sterilized water. After peeling off the ovary wall, the ovules with placenta attached served as the explants. Plantlets were obtained in 17.8% of excised ovules when 6% sucrose was used in MS medium although 3-10% sucrose also supported lower levels of plant regeneration (0.4-16.5%) while plantlets could not form on White's or Nitsch basal media containing any sucrose concentration, nor could the addition of coconut milk improve regeneration percentage. The technique of ovule culture by ISHIZAKA & UEMATSU (1992) is very important because the authors showed that all embryos in the ovules had degenerated by 43 days after

pollination when diploid *C. persicum* was used in the cross (and by 35 days when tetraploid *C. persicum* was used), with 0% seed set, so ovule culture serves as a valuable method to rescue valuable hybrid *Cyclamen* material when hybridizations are unsuccessful. TAKAMURA *et al.* (1993) established callus and shoot cultures from seedling tissues of an F₂ cross between cv. 'Pure White' and a yellow variety. Seeds were washed in 2% NaOCl for 10 min, rinsed three times with sterile distilled water (SDW), then plated on PGR-free 1/3 MS with 3% sucrose for 21 days in the dark and then a further 21 days in light (12-h photoperiod; 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; TAKAMURA & MIYAJIMA 1997). Cotyledons, leaf petioles, tubers and roots were isolated from seedlings and plated on 1/3 MS with 1 μM BA and 0.1 μM NAA in the dark for 35 days and then in a 16-h photoperiod. At most, 70% of cotyledons formed shoots (3.8/explant) while 93.8% of petioles or tubers formed shoots (6.0 or 6.8/explant, respectively) but no photographic evidence of *in vitro* organogenesis was provided. DILLEN *et al.* (1996) induced callus from young leaf explants after surface disinfecting 45 mm \times 60 mm leaves in 70% ethanol (brief dip), 1.5% NaOCl for 15 min and four rinses in sterile water. Leaf explants (1 cm²), when plated on MS basal medium with 3-4 mg/L BA, 3-4 mg/L Kin and 2 mg/L NAA, callus formed after 17 weeks in the dark. Callus was cut into 1 cm³ pieces and subcultured three times on the same medium for 8, 9 and 10 weeks, then subcultured five times (6-7 weeks each subculture) on MS basal medium with 4 mg/L BA, 4 mg/L Kin and 3 mg/L NAA, forming etiolated shoots (12/explant). In Nitsch-based medium, 88% of shoots rooted after 4 weeks while only 53% of shoots rooted on MS medium in the light (5000-6000 lux), but the latter needed 6% sucrose. DILLEN *et al.* (1996) then conducted a scaled-up trial, acclimatizing 1200 rooted shoots (i.e., plantlets) from 18 genotypes, showing 90% rooting and 78% acclimatization, although the substrate used was not defined. Also, in a bid to assess the cytological stability of regenerants after two-year callus culture, as much as 10-20% of plants in three genotypes showed variations in ploidy. BACH *et al.* (1998) were able to

induce shoots directly from 35-38% of leaves and hypocotyls derived from aseptic seedlings of *C. persicum* F₁ cv. 'Medium' in the presence of 50 μM 2,4-D and 4 μM N⁶-(2-isopentenyl) adenine (2iP) when placed on MS basal medium and maintained at 25 °C in the dark. When basal medium contained 2.5 μM NAA and 25 μM 2iP, 75% of leaf explants, 30% of hypocotyls and 45% of root explants formed shoots.

The 2000s

KARAM & AL-MAJATHOUB (2000a) regenerated shoots directly from the leaves of wild Jordanian *C. persicum in vitro* seedlings on 1/2 MS medium with 0.22 mg/L thidiazuron (TDZ) and 0.1 mg/L NAA in the dark. The authors also tested different explant sizes and locations of *in vitro*-derived leaves (wounded blades, blades with midrib, blades without midrib, central lamina, and petiolated lamina), noting that blades with a midrib showed the highest shoot induction ability (88% vs 81%, 44%, 34% and 0% from wounded blades, central lamina, petiolated lamina, and blades without midrib, respectively), forming a maximum of 2.9 shoots/explant. Also within the same study, the authors studied the influence of explant type (*in vitro* seedling-derived tuber, petiole, cotyledon, and root) on the outcome of microtuberization, noting that root explants showed highest tuberization (42% of explants) in response to 1 mg/L BA in 1/2 MS medium (relative to 4% in cotyledons and 0% tuberization from tubers and petioles). Optimal sucrose concentration was 3%, decreasing when 6, 9 or 12% were tested, forming microtubers in 100% of explants and 6 microtubers/explant with roots in response to 3% sucrose, and 37.5% of explants and 1.63 microtubers/explant when 6% sucrose was used). In a separate paper by the same authors (KARAM & AL-MAJATHOUB 2000b), the shoot inductive ability of other explants (leaf discs, petioles, petals, and peduncles) derived from wild *ex vitro* plants at the flowering stage was tested. Unlike their other study (KARAM & AL-MAJATHOUB 2000a), here they used 1/3 MS with 3% sucrose and 0.1 mg/L NAA as the basal medium, noting that

peduncles formed most shoots (2.13 shoots/explant in 54% of explants) in this basal medium supplemented with 0.022 or 0.22 mg/L TDZ while petals formed most shoots (1.07 shoots/explant in 38% of explants) when 0.022 mg/L TDZ was applied; the values for petioles were 0.16 shoots/explant in 7% of explants while leaf discs did not form any shoots, in sharp contrast to their previous findings (KARAM & AL-MAJATHOUB 2000a) where *in vitro*-derived shoots from seedlings were found to be most productive. Callus formed in peduncles, petals and petioles at all concentrations of TDZ tested. A separate trial in that study showed that etiolated leaf petioles formed more shoots (0.86 shoots/explant in 32% of explants) than non-etiolated leaf petioles (0.16 shoots/explant in 7% of explants).

The explant disinfection protocols used in the KARAM & AL-MAJATHOUB (2000a, 2000b) studies deserve special mention due to their precision and detail. In KARAM & AL-MAJATHOUB (2000a), seeds were extracted from mature fruits, washed with water for 15 min, dipped in 70% ethanol for 1 min, added to 20% NaOCl for 20 min, then rinsed in SDW. Surface-disinfected seeds were plated in the dark at 15 °C until germination, and then transferred to light conditions (16-h photoperiod and 50-60 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) at 22 °C. In their other study (KARAM & AL-MAJATHOUB 2000b), they first washed explants in water for 10 min, dipped them in 70% ethanol for 30 s, added them to 4% NaOCl for 15 min, then rinsed them in SDW. All explants were placed in the dark at 22 °C. Unlike most *Cyclamen in vitro* studies from the 1950s – 1990s, these two studies did not (regrettably) report on the level of explant or culture contamination. Using the same surface disinfection procedure as KARAM & AL-MAJATHOUB (2000a), MOHANNAD & KARAM (2000) tested the shoot induction ability of *in vitro* seedling-derived tubers, petioles, cotyledons, and roots in response to BA when placed on MS basal medium. Most shoots formed from tuber segments in response to 2 mg/L BA and 0.1 mg/L NAA (3.4 shoots/explant in 54% of explants) although both shoots and roots also formed from the other

three explant types, but with lower shoot induction ability. Shoots were proliferated in the presence of 2 mg/L BA, forming 7.4 shoots/shoot, and individual shoots were rooted in 0.5 or 1 mg/L NAA in 80-100% of explants, although IBA was just as effective as NAA. Plantlets were acclimatized in a peat + perlite (1:1, v/v) substrate and no visible abnormalities were observed.

ABU-QAOD (2004) tested the ability of tuber sections and petioles from *in vitro* cv. 'Concert' seedlings to form shoots. Seeds were initially surface disinfected in 5% NaOCl for 10 min, rinsed three times in SDW, then germinated on MS basal medium at 22-24 °C and cultured in a 16-h photoperiod at 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. While no shoots formed on petioles, 58.3% of tuber explants formed shoots (10.8/explant) in response to 5.4 μM NAA and 4 μM TDZ. Even though the author claimed successful acclimatization with 30% normal flowering, no visual or quantitative proof was provided.

PRANGE *et al.* (2008) were determined to induce shoots from *C. mirabile* Hildebrand, *C. coum* Miller, *C. graecum* Link and *C. hederifolium* from three explant types (cotyledons, tubers and roots) derived from aseptic seedlings using two shoot induction media (SIM): SIM I, with 0.5 mg/L NAA and 1 mg/L BA; SIM II, with 0.5 mg/L IAA, 1 mg/L BA, 1 mg/L 2iP and 1 mg/L Kin. Seed germination and shoot induction were conducted in the dark at 20 °C. After 8 weeks, *C. mirabile* tubers formed shoots in 22% of explants on SIM I, 20% of *C. coum* cotyledons in SIM II, 58% of *C. graecum* cotyledons on SIM I, and 43% of *C. hederifolium* cotyledons on SIM I. Values pertaining to the success of shoot induction differed considerably depending on whether explants were rated after 4, 8 or 16 weeks, an important issue in plant tissue culture (TEIXEIRA DA SILVA & DOBRÁNSZKI 2013a).

YAMANER & ERDAG (2008) were able to induce shoots from *in vitro* tubers of *C. mirabile* Hildebr., an endemic Turkish species, on a wide range of basal media (BOURGIN & NITSCH 1967, MS, ½ MS, LINSMAIER & SKOOG 1965, AND LOEWENBERG 1969) containing

0.1 mg/L IAA or 0.5 mg/L NAA and 0.5 mg/L Kin. Initially, seeds from mature fruits were washed in running tap water for 1 h, dipped in 70% ethanol for 10 min, added to 4.5% NaOCl for 25 min, then rinsed in SDW 3-4 times for 10 min. Disinfected seeds were germinated in the dark at 15 °C on PGR-free ½ MS or MS medium with 3% sucrose, and once seedlings had germinated, these were transferred to light conditions (16-h photoperiod) at 24 °C. A maximum of 53.3% of seeds germinated on ½ MS medium after 10 weeks, while only 41.6% at most germinated on MS medium in the same period. Leaf lamina, petioles, roots, intact tubers and tuber segments were prepared from 8-week-old seedlings. Callus was induced from petioles in ½ MS medium with 2 mg/L NAA, but callus could not be induced to differentiate and no regeneration was possible from leaf or root explants. The most responsive explant were intact tubers, forming 12.2 shoots/explant and 6 microtubers/explant in the presence of 1 mg/L BA with 0.1 mg/L NAA and 2 mg/L BA with 0.1 mg/L NAA, respectively. No additional plantlet formation beyond microtuberization was reported.

BÜRÜN & ŞAHİN (2009) germinated *C. alpinum* Sprenger seeds *in vitro* that had been stored for 8 months by surface disinfection in 4.5% NaOCl for 10 min, 5-6 rinses with SDW, and then plating on PGR-free MS medium. Seeds stored in capsules at 15 °C or 20 °C showed a lower germination percentage than seeds that were first excised from capsules prior to storage (60% vs 70%, respectively), but *in vivo* germination in Petri dishes was superior to *in vitro* germination trials (92% from seeds stored in capsules, 54% of seeds excised from capsules prior to storage).

SEYRING *et al.* (2009) attempted to induce shoots in several *Cyclamen* species (*C. africanum* Boiss. et Reut., *C. cilicium* Boiss. et Heldr., *C. coum* Mill., *C. hederifolium* Ait., *C. persicum* Mill., and *C. purpurascens* Mill.). In all cases, explants were derived from young leaves, petioles, flower buds and peduncles of adult greenhouse-derived plants. Leaves with petioles were disinfected for 3 min in 0.8% AgNO₃ (silver nitrate) and rinsed three times (5 min each time)

in SDW while peduncles and flower buds were dipped for 30 s in 70% alcohol, for 20 min in 3% NaOCl, and three rinses (5 min each time) in autoclaved tap water. However, shoots formed only in 12.5% of *C. africanum* petioles and in 20-25% of peduncles, leaves and petioles of *C. purpurascens* when explants were cultured on MS with 9.05 µM 2,4-D and 3.94 µM 2iP in the dark at 25°C. The authors also devised a second, more complex, protocol that involved NITSCH & NITSCH (N-69; 1969) basal medium that included 6.66 µM BA, 5.71 µM indolyl-3-acetic acid (IES) and 888.24 µM adenine for 6 weeks at 20 °C in the dark. This was followed by 2 weeks under a 16-h photoperiod (46 µmol · m⁻² · s⁻¹) then transfer to N-69 with 4.44 µM BA, 5.71 µM IES and 10.74 µM 1-naphthylacetic acid. It is unclear if IES and 1-naphthylacetic acid refer to IAA and NAA, respectively. Using this second protocol, the following percentage of explants formed shoots: *C. africanum* (placenta: 8.3%; peduncle: 6.3%; leaf: 75%; petiole: 18.8%), *C. hederifolium* ssp. *confusum* (leaf: 40%; petiole: 36.8%), *C. hederifolium* cv. 'Perlentepich' (leaf: 25%; petiole: 5%), *C. hederifolium* cv. 'Rosentepich' (peduncle: 12.5%; leaf: 8.3%; petiole: 6.3%), *C. persicum* (peduncle: 18.8%; leaf: 25%; petiole: 7.1%), pink *C. persicum* (placenta: 50%; peduncle: 45%; leaf: 25%), and *C. purpurascens* (peduncle: 20%; leaf: 50%; petiole: 5.3%). Shoots did not form in *C. cilicium* or in *C. coum*, or in any explant of the other genotypes listed above.

NHUT *et al.* (2012) used thin cell layers (TCLs) 1 mm thick derived from peduncles to induce callus in 100% of explants when cultured on MS medium supplemented with 0.2 mg/L TDZ and 1.0 mg/L 2,4-D. The transfer of 8-week old callus to MS medium containing 0.5 mg/L BA and 0.7 mg/L IBA resulted in the formation of adventitious shoots (39.4/explant). Shoots could also be induced from callus in the presence of 0.5 mg/L Kin and 0.1 to 0.7 mg/L IAA or NAA, but the numbers were significantly lower than the BA+IBA combination. These shoots (2-3 cm long), when cut off at the base of the callus and transferred to MS medium with 1.0 mg/L IBA, formed a robust root system. TCLs are showing great promise for new plant crops and for species

for which no effective tissue culture or *in vitro* regeneration system exists (TEIXEIRA DA SILVA & DOBRÁNSZKI 2015a; TEIXEIRA DA SILVA *et al.* 2015).

Conclusions

Although the production of callus or shoots directly *in vitro* may be an attractive developmental model, for practical purposes, the production of pathogen-free microtubers for pot, greenhouse or field production is desirable. Such material can then be used to derive new microtubers that are free of infection which is a desirable form of clonal propagation since the initial tissue disinfection process of *in vivo*-derived tubers or other material can still result in heavy contamination of tissue cultures. Even though *Cyclamen* micropropagation (JALALI *et al.* 2012) and somatic embryogenesis (TAGIPUR *et al.* 2016) are well studied and have a rich history, several aspects still need to be explored, such as *in vitro* flowering (TEIXEIRA DA SILVA *et al.* 2014), the use of ultrasound or sonication to induce organogenesis (TEIXEIRA DA SILVA & DOBRÁNSZKI 2014), the use of TCL to maximize organogenic output (TEIXEIRA DA SILVA & DOBRÁNSZKI 2013b), or the use of magnetic fields to study growth and development (TEIXEIRA DA SILVA & DOBRÁNSZKI 2015b).

Acknowledgements

The author thanks Dr. Neda Jalali, Dr. Roohangiz Naderi and Dr. Ali Shahi-Gharahlar (Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Iran) and Dr. Tolga İzgü and Prof. Yesim Yalcin Mendi (Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, University of Cukurova Balcali, Turkey) for providing difficult-to-access literature related to *Cyclamen*. The author also thanks Prof. Andrzej Joachimiak, Editor-in-Chief of *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, for providing a copy of BACH *et al.* (1998), and Prof. Margrethe Serek and Prof. Traud Winkelmann (Institute of Horticultural Production Systems, Leibniz University, Hannover, FR Germany) for providing a copy of PRANGE *et al.* (2008).

References

- ABU-QAOD H. 2004. Direct regeneration in *Cyclamen persicum* Mill. using seedling tissues. *An-Najah Univ. J. Res. (Nat. Sci.)* **18**: 147–156.
- ANDO T., MURASAKI K. 1983. *In vitro* propagation of *Cyclamen* by the use of etiolated petioles. *Tech. Bull. Fac. Hort. Chiba Univ.* **32**: 1–5.
- BACH A., MALIK M., ZOLNECZKO B. 1998. Organogenesis and embryogenesis in cultures of *Cyclamen persicum* Mill., F-1 'Medium'. *Acta Biol. Cracov. Ser. Bot.* **40**: 47–51
- BOURGIN J.P., NITSCH J.P. 1967. Production of haploid *Nicotiana* from excised stamens. *Ann. Physiol. Veg.* **9**: 377–382.
- BÜRÜN B., ŞAHİN O. 2009. *In vitro* and *in vivo* germination of *Cyclamen alpinum* seeds. *Turk. J. Bot.* **33**: 277–283. doi: 10.3906/bot-0709-8.
- DILLEN W., DIJKSTRA I., OUD J. 1996. Shoot regeneration in long-term callus cultures derived from mature flowering plants of *Cyclamen persicum* Mill. *Plant Cell Reports* **15**: 545–548. doi: 10.1007/BF00232991.
- FUKUI H., YAMAMOTO T., ASANO T., NAKAMURA M. 1988. Effect of plant growth regulators on *in vitro* organogenesis of cyclamen (*Cyclamen persicum* Mill.). *Res. Bull. Faculty Agricult. Gifu Univ.* **53**: 139–145.
- GAUTHERET J. 1954. Catalogue des cultures de tissus vegetaux. *Rev. Gen. Bot.* **61**: 672–702.
- GEIER T. 1977. Morphogenesis and plant regeneration from cultured organ fragments of *Cyclamen persicum*. *Acta Hortic.* **78**: 167–174. doi: 10.17660/ActaHortic.1977.78.20.
- HAWKES H.Y., WAINWRIGHT H. 1987. *In vitro* organogenesis of *Cyclamen persicum* Mill. seedling tissue. *Acta Hortic.* **212**: 711–714. doi: 10.17660/ActaHortic.1987.212.122.
- ISHIZAKA H., UEMATSU J. 1992. Production of interspecific hybrids of *Cyclamen persicum* Mill and *C. hederifolium* Aiton by ovule culture. *Jpn. J. Breed.* **42** (2): 354–366. doi: 10.1270/jsbbs1951.42.353.
- JALALI N., NADERI R., ALI S.-G., TEIXEIRA DA SILVA J.A. 2012. Tissue culture of *Cyclamen* spp. *Sci. Hortic.* **137**: 11–19. doi: 10.1016/j.scienta.2012.01.015.
- KARAM N.S., AL-MAJATHOUB M. 2000a. Direct shoot regeneration and microtuberization in wild *Cyclamen persicum* Mill. using seedling tissue. *Sci. Hortic.* **86**: 235–246. doi: 10.1016/S0304-4238(00)00146-1.
- KARAM N.S., AL-MAJATHOUB M. 2000b. *In vitro* shoot regeneration from mature tissue of wild *Cyclamen persicum* Mill. *Sci. Hortic.* **86**: 323–333. doi: 10.1016/S0304-4238(00)00160-6.
- LINSMAIER E.M., SKOOG F. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **18**: 100–127. doi: 10.1111/j.1399-3054.1965.tb06874.x.

- LOEWENBERG J.R. 1969.** Cyclamen callus culture. *Can. J. Bot.* **47** (12): 2065–2067. doi: 10.1139/b69-298
- MAYER-HÖRSTER L. 1956.** Wachstum und Organbildung an *in vitro* kultivierten Segmenten von *Pelargonium zonale* und *Cyclamen persicum*. *Planta* **47**: 401–446. doi: 10.1007/BF01911864.
- MILLER C.O. 1961.** A kinetin like compound in maize. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **47** (2): 170–174.
- MOHANNAD A.M., KARAM N.S. 2000.** *In vitro* propagation of wild *Cyclamen persicum* Mill. from seedling tissue. *Acta Hort.* **530**: 243–252. doi: 10.17660/ActaHortic.2000.530.29.
- MURASAKI K., TSURUSHIMA H. 1988.** Improvement on clonal propagation of cyclamen *in vitro* by the use of etiolated petioles. *Acta Hort.* **226**: 721–724. doi: 10.17660/ActaHortic.1988.226.105.
- MURASHIGE T., SKOOG F. 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* **15**: 473–497.
- NHUT D.T., THU H.T.M., VINH B.V.T., BINH N.V., LUAN V.Q. 2012.** Thin cell layer technology in regeneration and micropropagation of *Cyclamen persicum* Mill. *Propag. Orn. Plants* **12** (2): 89–95.
- NITSCH J.P. 1951.** Growth and development *in vitro* of excised ovaries. *Amer. J. Bot.* **38**: 566–577.
- NITSCH J.P. 1969.** Experimental androgenesis in *Nicotiana*. *Phytomorphol.* **19**: 389–404.
- NITSCH J.P., NITSCH C. 1969.** Haploid plants from pollen grains. *Science* **163** (3862): 85–89.
- OKUMOTO H., TAKABAYASHI S. 1969.** Aseptic culture of cyclamen tuber tissue. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* **38** (2): 178–187. doi: 10.2503/jjshs.38.178.
- PIERIK R.L.M. 1975.** Vegetatieve vermeerdering van *Cyclamen*. *Vakblad voor Bloemisterij* **30** (28): 13.
- PRANGE A.N.S., SEREK M., WINKELMANN T. 2008.** Vegetative propagation of different cyclamen species via adventitious shoot formation from seedling tissue. *Propag. Orn. Plants* **8** (4): 204–209.
- SCHWENKEL H.G., GRUNEWALDT J. 1988.** *In vitro* propagation of *Cyclamen persicum* Mill. *Acta Hort.* **226**: 659–662. doi: 10.17660/ActaHortic.1988.226.92.
- SEYRING M., EWALD A., MUELLER A., HAENSCH K.-T. 2009.** Screening for propagation suitability *in vitro* of different *Cyclamen* species. *Electron. J. Biotechnol.* **12** (4). doi: 10.2225/vol12-issue4-fulltext-7.
- STICHEL E. 1959.** Gleichzeitige Induktion von Sporossen und Wurzeln und *in vitro* Kultivierten Gewebestücken von *Cyclamen persicum*. *Planta* **53**: 293–317. doi: 10.1007/BF01881794.
- TAGIPUR E.M., SEKER G., TEIXEIRA DA SILVA J.A., YELCIN MENDI Y. 2016.** Somatic embryogenesis, cryopreservation and *in vitro* mutagenesis in *Cyclamen*. In: MUJIB A. (ed.), *Somatic embryogenesis in ornamentals and its applications*: 155–167. Springer, India. doi: 10.1007/978-81-322-2683-3_10.
- TAKAMURA T., MIYAJIMA I., MAEHARA T. 1993.** Seedling selection and micropropagation for the breeding of yellow-flowered *Cyclamen* cultivars. *J. Fac. Agric. Kyushu Univ.* **37** (3/4): 265–271.
- TAKAMURA T., MIYAJIMA I. 1997.** Micropropagation of *Cyclamen persicum* Mill. In: Bajaj Y.P.S. (ed.), *High-tech and micropropagation VI. Biotechnology in Agriculture and Forestry* **40**: 96–112. Springer, Berlin. doi: 10.1007/978-3-662-03354-8_8.
- TEIXEIRA DA SILVA J.A. 2012.** Is BA (6-benzyladenine) BAP (6-benzylaminopurine)? *Asian Australas. J. Plant Sci. Biotechnol.* **6** (Special Issue 1): 121–124.
- TEIXEIRA DA SILVA J.A., ALTAMURA M.M., DOBRÁNSZKI J. 2015.** The untapped potential of plant thin cell layers. *J. Hortic. Res.* **23** (2): 127–131. doi: 10.2478/johr-2015-0024.
- TEIXEIRA DA SILVA J.A., DOBRÁNSZKI J. 2013a.** How timing of sampling can affect the outcome of the quantitative assessment of plant organogenesis. *Sci. Hortic.* **159**: 59–66. doi: 10.1016/j.scienta.2013.05.001.
- TEIXEIRA DA SILVA J.A., DOBRÁNSZKI J. 2013b.** Plant thin cell layers: a 40-year celebration. *J. Plant Growth Regul.* **32** (4): 922–943. doi: 10.1007/s00344-013-9336-6.
- TEIXEIRA DA SILVA J.A., DOBRÁNSZKI J. 2014.** Sonication and ultrasound: impact on plant growth and development. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **117** (2): 131–143. doi: 10.1007/s11240-014-0429-0.
- TEIXEIRA DA SILVA J.A., DOBRÁNSZKI J. 2015a.** Plant thin cell layers: update and perspectives. *Folia Hort.* **27** (2): 183–190. doi: 10.1515/fhort-2015-0029.
- TEIXEIRA DA SILVA J.A., DOBRÁNSZKI J. 2015b.** How do magnetic fields affect plants *in vitro*? *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* **51** (3): 233–240. doi: 10.1007/s11627-015-9675-z.
- TEIXEIRA DA SILVA J.A., KERBAUY G.B., ZENG S.-J., CHEN Z.-L., DUAN J. 2014.** *In vitro* flowering of orchids. *Crit. Rev. Biotechnol.* **34** (1): 56–76. doi: 10.3109/07388551.2013.807219.
- WAINWRIGHT H., HARWOOD A.C. 1985.** *In vitro* organogenesis and plant regeneration of *Cyclamen persicum* Mill. using seedling tissue. *J. Hortic. Sci.* **60**: 397–403. doi: 10.1080/14620316.1985.11515644.
- WHITE P.R. 1963.** The cultivation of animal and plant cells. Ronald Press, New York.
- WICART G., MOURAS A., LUTZ A. 1984.** Histological study of organogenesis and embryogenesis in *Cyclamen persicum* Mill. tissue culture: evidence for a single organogenesis pattern. *Protoplasma* **119**: 159–167. doi: 10.1007/BF01288870.
- YAMANER Ö., ERDAG B. 2008.** Direct shoot formation and microtuberization from aseptic seedlings of *Cyclamen mirabile* Hildebr. *Biotechnol.* **7**: 328–332. doi: 10.3923/biotech.2008.328.332.



THE IN VITRO CULTURE OF HOLOSTEMMA SPECIES: A CRITICAL ANALYSIS

JAIME A. TEIXEIRA DA SILVA

Abstract. The taxonomic status of *Holostemma* R.Br (Apocynaceae (formerly Asclepiadaceae), Asclepiadoideae) has recently (2014) been revised, allowing for biotechnology on this genus to assume a new and focused direction. This mini-review aims to cover what is known thus far about the tissue culture of *Holostemma* species, which includes medicinal species with ornamental potential. A post-publication peer review of the literature is provided, a critical assessment is made of the faults and weaknesses of the literature, and advice is offered as to how better to improve the research objectives to benefit researchers of *Holostemma* species.

Key words: *Holostemma*, Apocynaceae, biotechnology, medicinal properties, plant growth regulator, tissue culture

P.O. Box 7, Miki-cho post office, Ikenobe 3011-2, Kagawa-ken, 761-0799, Japan; jaimetex@yahoo.com

Abbreviations

2,4-D – 2,4-dichlorophenoxyacetic acid
2iP – N⁶-(2-isopentenyl) adenine
BA – 6-benzyladenine
IAA – indole-3-acetic acid
IBA – indole-3-butyric acid
Kin – kinetin
MS – Murashige and Skoog medium
NAA – α -naphthaleneacetic acid
PGR – plant growth regulator

Introduction.

A new taxonomy, a new vision

There is still considerable debate about the taxonomy within the genus *Holostemma* R.Br (Apocynaceae, Asclepiadoideae) even though it was recently revised by SURVESWARAN *et al.* (2014; Tab. 1) using molecular markers (plastid sequences of *rbcL*, *rps16*, *trnL* and *trnLF* regions), and thus serving as an update of the last revision which only employed morphological characters (SWARUPANANDAN *et al.* 1996). In West Bengal, *H. adakodien* Schult. is used as a febrifuge (DEY & DE 2012), the ethanolic extract of the roots of *H. annulare*, (Roxb.) K. Schum. commonly used in Ayurvedic medicine,

showed antidiabetic activity in Wistar rats with diabetes mellitus (SHIRWAIKAR *et al.* 2007). REDDY *et al.* (2010) reached the same conclusion when C57BL/6J *ob/ob* diabetic mice were used. Both the ethanolic extract and the ethyl acetate extract of dried and powdered *H. adakodien* leaves were able to paralyze and kill adult Indian earthworms (*Pheretima posthuma*) at 200 and 400 $\mu\text{g/mL}$, i.e., they displayed anthelmintic activity (SADASIVAM *et al.* 2014). The hexane, ethyl acetate and methanolic extracts of *H. adakodien* root tubers showed antioxidant and radical (DPPH, superoxide, nitric oxide) scavenging activity (MALLIKARJUNA *et al.* 2011). The ethanolic and methanolic extracts of *H. adakodien* leaves and stems were able to exert antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and to a lesser extent *Salmonella typhimurium*, when compared with the control antibiotic gentamicin, but were ineffective against *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* (IRIMPAN *et al.* 2011). Older texts in somewhat obscure or difficult-to-access textbooks (e.g., WARRIER *et al.* 1995) point towards the use of *H. adakodien* as an antidiabetic, rejuvenative, aphrodisiac, expectorant, galactagogue, stimulant, and to treat ophthalmic disorders in traditional Indian

Tab. 1. Taxonomy of *Holostemma* R.Br (modified from SURVESWARAN *et al.* 2014).

Species	Currently accepted name
<i>H. ada-kodien</i> Schult. * ¹	<i>H. annularium</i> (Roxb.) K. Schum.
<i>H. annularium</i> (Roxb.) K. Schum.	<i>H. annularium</i> (Roxb.) K. Schum.
<i>H. brunonianum</i> Royle	<i>H. annularium</i> (Roxb.) K. Schum.
<i>H. candolleianum</i> Spreng.	<i>Fischeria scandens</i> DC.
<i>H. chilense</i> Phil.	<i>Diplolepis mucronata</i> (Decne.) Hechem & C. Ezcurra
<i>H. fragrans</i> Wall.	<i>H. fragrans</i> Wall.
<i>H. laeve</i> Blume	<i>Cynanchum ovalifolium</i> Wight ²
<i>H. muricatum</i> Blume	<i>Cynanchum muricatum</i> (Blume) Boerl.
<i>H. pictum</i> Champ. ex Benth.	<i>Graphistemma pictum</i> (Champ. ex Benth.) Benth. & Hook. f. ex Maxim.
<i>H. rheedei</i> Wall.	<i>H. annularium</i> (Roxb.) K. Schum.
<i>H. rheedianum</i> Spreng.	<i>H. annularium</i> (Roxb.) K. Schum.
<i>H. sinense</i> Hemsl.	<i>Metaplexis hemsleyana</i> Oliv.
<i>H. tuberculatum</i> Blume	<i>Cynanchum tuberculatum</i> (Blume) Boerl.

* Claimed on the Plant List (<http://www.theplantlist.org/tpl1.1/search?q=Holostemma>) and Wikipedia (<https://en.wikipedia.org/wiki/Holostemma>) to be the only species within this genus, while other species names listed by SURVESWARAN *et al.* (2014) are considered to be synonyms of *H. ada-kodien* (The Plant List, updated in 2012).

¹ Common names (according to <http://flowersofindia.net/catalog/slides/Holostemma%20Creeper.html>). *Holostemma* creeper or adapathiyam; Hindi: Chhirvel; Marathi: Dudruli, Shidodi; Tamil: Palay kirai; Malayalam: Ada kodien; Telugu: Palagurugu; Sanskrit: Jivanti, Arkapushpi.

² Confirmed by LIEDE & KUNZE (2002).

Ayurvedic medicine (according to GEETHA *et al.* (2009) and IRIMPAN *et al.* (2011), and local references therein).

Are *Holostemma* species rare or endangered?

In 1997, the Foundation for Revitalisation of Local Health Traditions listed *H. ada-kodien* as being rare due to over collection (FRLHT 1997), although the IUCN does not red list any *Holostemma* species (<http://www.iucnredlist.org/>), thus bringing into question any claim of rare or endangered by several of the authors of the tissue culture studies covered next (Tab. 2) as one of the supporting claims of “novelty” of their study. For example, DECRUSE & SEENI (2002) describe *H. annulare* as being rare yet two years later, in DECRUSE *et al.* (2004), they describe the plant as being endangered, without any supporting evidence. One common tactic used by authors publishing studies on medicinal and aromatic plants to increase their chances of acceptance to a journal is by exaggerating (or inventing) the rare or endangered status of that

plant, to sway the editors and reviewers opinions regarding the importance and originality of the study. Although I am not suggesting that this may be the case in any of the studies listed in Tab. 2, readers should be aware of this unpalatable issue when they assess the novelty of such studies.

In the light of this new taxonomic revision, and the questionable claims of the rarity or endangered status of several *Holostemma* species, this mini-review aims to revise what work exists on the tissue culture of this genus – in fact very few studies – with the objective of giving some direction for future experiments, and, based on a critique of the already published literature, advice on what should or should not be done in future research to make results more meaningful and robust, thus increasing confidence in the reported outcomes.

The tissue culture of *Holostemma* species

The earliest known study on the tissue culture of *Holostemma* species that could be identified in the published literature, after consulting at least

Tab. 2. Classification of the rarity of *Holostemma* species in different tissue culture studies *.

Reported species	Status	Status supported by sources?	Reference
<i>H. annulare</i>	Rare	Yes **	SUDHA <i>et al.</i> 1998, 2000
<i>H. annulare</i>	Not indicated		DECRUSE & SEENI 2002 ***
<i>H. ada-kodien</i>	Rare + endangered	Yes ** (2002); No (2003)	MARTIN 2002, 2003
<i>H. annulare</i>	Endangered	No	DECRUSE <i>et al.</i> 2004
<i>H. ada-kodien</i>	Endangered	No	GEETA <i>et al.</i> 2009
<i>H. ada-kodien</i>	Rare	Yes **	PUSHPARAJAN & SURENDRAN 2014
<i>H. ada-kodien</i>	Endangered	Yes **/No	JAYA CHANDRA <i>et al.</i> 2015

* As indicated in the text, the IUCN Red List does not list any *Holostemma* species as being either rare, or endangered.

** Only local, old, impossible-to-access, or anonymous sources provided.

*** Fails to cite SUDHA *et al.* 1998 in the text, constituting a case of snub publishing (TEIXEIRA DA SILVA 2013).

7 data-bases/web-sites (Elsevier's sciencedirect.com/Scopus; Springer-Nature's SpringerLink; Taylor & Francis Online; Wiley Online; Oxford University Press; NIH's PubMed; Google and Google Scholar), was from 1998.

In that first study, SUDHA *et al.* (1998) claimed that tissue culture of *H. annulare* was necessary for three reasons: 1) conventional vegetative propagation through stem or root cuttings is impeded by herbivores and insects who are attracted to the sweet latex during monsoon months, but without providing proof; 2) since roots are used for Ayurvedic medicine, the use of roots for propagation is impractical; 3) flowering takes place once a year and little fruit is set, but no evidence was provided. With this set of limitations in hand, the authors propagated mother plants by nodal cuttings or shoot tips. Although the authors attempted liquid culture, they observed hyperhydricity. Although basal nodes regenerated more shoots than shoot tips (3.8 and 1.0 per explant, respectively) in optimized conditions specified in Tab. 3, the former explant showed higher levels of contamination, although contamination levels were not quantified. Although most shoots per explant and longest shoots formed in the 6-benzyladenine (BA; see notes in TEIXEIRA DA SILVA 2012) + α -naphthaleneacetic acid (NAA) combination, shoots could also be induced in the presence of BA + indole-3-butyric acid (IBA) / indole-3-acetic acid (IAA), N^6 -(2-isopentenyl) adenine (2iP) + NAA / IBA / IAA, or kinetin (Kin) +

NAA / IBA / IAA. After the first subculture of shoots, shoot production could be increased to 7.6 shoots/explant. A maximum of 75% of shoots could root when IBA was used as the auxin and a maximum of 82% of rooted plants could be successfully acclimatized in the greenhouse without any visible morphological changes. SUDHA *et al.* (2000) followed up their 1998 study with the induction of shoots from chlorophyllous roots with as high as 82% response without callus induction.

MARTIN (2002) was able to induce shoots from 100% of *H. ada-kodien* nodes, forming at most 8.1 shoots/explant. Although shoots could also form in the presence of coconut water without any plant growth regulators (PGRs), with BA or Kin alone, with BA + IAA / NAA, the ideal shoot induction medium involved BA + IBA (Tab. 3). When 1.5 mg/L BA was used, callus could be induced from leaves, nodes and internodes and subsequently shoots (i.e., indirect callogenesis), forming a maximum of 15.5 shoots/node and 5.2 shoots/internode. Even though leaf abscission could be avoided by adding $AgNO_3$ or $CoCl_2$ to medium, shoot number was compromised. The authors claimed 90% survival of acclimatized plants. Even though MARTIN (2003) claimed to have induced somatic embryos from roots, internodes and leaves, with as many as 43.8/10 mg of callus, no histological or cytological proof was provided. The author also claimed 90% plantlet survival, an identical value to the 2002 study. GEETHA *et al.* (2009) claimed

Tab. 3. Basic culture conditions for the tissue culture of *Holostemma* species.

Species	Disinfection process	Culture conditions *	Optimal medium **	Reference
<i>H. annulare</i>	Shoots with 6-8 nodes removed from 6-8 week-old mother plants. Shoots stripped of leaves; the remaining fourth to sixth nodes from the apex were cut and washed in detergent (1% Labolene) for 10 min then rinsed in RTW until the detergent had been thoroughly removed. Terminal cuttings and older basal nodes were immersed in 1.5% bleach for 7-10 min or 12-15 min, respectively, then in 0.1% HgCl ₂ for 5-7 or 8-10 min, respectively, each step followed by five rinses with SDW. After trimming damaged termini, explants were cut into 0.5-0.8 cm (shoot tips) or 1.0-1.5 cm (basal nodes). One final rinse in SDW before plating on medium.	PP, light source, LI, and temp. NR. Subcultured every 5-6 w. pH 5.8. 3% sucrose (RIM). 0.5% agar. Plants acclimatized in sand : soil : CD (1:1:1).	MS + 0.54 µM NAA + 4.43 µM BA (SIM). MS + 0.27 µM NAA + 2.21 µM BA (SMM). ½ MS + 1.48 µM IBA + 556.06 µM myo-inositol + 0.05% AC (RIM).	SUDHA <i>et al.</i> 1998
<i>H. annulare</i>	Chlorophyllous roots (3-4 cm) of <i>in vitro</i> plants.	12-h PP. CWFT. 50 µmol · m ⁻² · s ⁻¹ . 24 ± 2°C. Other conditions as for SUDHA <i>et al.</i> (1998).	½ MS + 0.3 mg/L IBA (RIM). MS + 0.2 mg/L BA (SIM). MS + 0.5 mg/L BA + 0.05 mg/L NAA (SMM).	SUDHA <i>et al.</i> 2000
<i>H. annulare</i>	Seeds were germinated (substrate and conditions NR) and nodes from seedlings were disinfected using the SUDHA <i>et al.</i> (1998) protocol.	12-h PP. 30-50 µmol · m ⁻² · s ⁻¹ . 25 ± 2 °C. 87.7 mM sucrose. Other conditions as for SUDHA <i>et al.</i> (1998).	MS + 2.22 µM BA + 2.6 mM NH ₄ H ₂ PO ₄ and without NH ₄ ⁺ NO ₃ (cryopreservation and shoot tip recovery media). Recovery medium also contained 1.44 µM GA ₃ .	DECRUSE & SEENI 2002; DECRUSE <i>et al.</i> 2004
<i>H. ada-kodien</i>	Leaf, internode and node explants from tender parts of mature plants washed under RTW, then 5% Extran (detergent) for 5-10 min, then rinsed in SDDW. Explants placed in 0.5% HgCl ₂ for 12-14 min then rinsed in SDDW.	16-h PP. CWFT: 2000 lux. 25 ± 2 °C. pH 5.8. 3% sucrose. 0.8% agar. Plants acclimatized in solrite : sand (1:1).	MS + 1.5 mg/L BA (CIM) → SIM; all explants). MS + 2 mg/L BA + 0.5 mg/L IBA (SIM; nodes). ½ MS + 0.05 mg/L IBA (RIM).	MARTIN 2002
<i>H. ada-kodien</i>	Leaf, internode and root explants from tender parts of mature plants surface disinfected as for MARTIN (2002). Leaves cut into 1 cm ² and internodes and roots 1 cm explants.	16-h PP. 25 µmol · m ⁻² · s ⁻¹ . 25 ± 2 °C. pH 5.8. 3% sucrose. 0.8% agar. Plants acclimatized in solrite : sand (1:1).	MS + 1 mg/L 2,4-D (CIM). ¼ MS + 0.1 mg/L 2,4-D (SEIM).	MARTIN 2003

<i>H. ada-kodien</i>	Shoots washed in RTW for 15 min. After removing leaves, naked stem washed in dilute Tween-20 (2 drops in 100 mL) and cut into 3-4 cm long explants which are treated with 4% NaOCl and Tween-20 (2 drops/100 mL) for 2 min and rinsed 4-5x with SDW. Trim to 1.5 cm long segments, treat with 4% NaOCl for 2 min under constant agitation, and wash 5-6 times in SDW.	PP, LI, temp. NR ***. pH 5.8. 2% (SIM) or 3% (SMM) sucrose. 0.7% (SIM) or 0.8% (SMM) agar. Plants acclimatized in sand.	PGR-free MS (SIM, RIM). MS + 4.90 μ M IBA + 0.46 μ M Kin (SMIM).	GEETHA <i>et al.</i> 2009
<i>H. ada-kodien</i>	Leaves, shoot tips and nodal segments collected from fresh, young, healthy mother plants were washed thoroughly in RTW then with Salvon for 5 min. Explants treated with 5% Teepol for 5-10 min and thoroughly washed with DW. Explants immersed in 70% EtOH for 1 min, washed with SDW 3x, then treated with 0.1% HgCl ₂ for 1-10 min. Washed with autoclaved DW 5x and cut into 0.5-1.0 cm explants.	16-h PP. 3000 lux. 25 \pm 2 °C. 55 \pm 5% RH, pH 5.8. 3% sucrose. 0.8% agar. Plants acclimatized in sterile soil : sand (1:1).	MS + 2.0-2.5 mg/L BA + 1 mg/L NAA or 2.5 mg/L Kin + 1 mg/L NAA (CIM). MS 1.5 mg/L Kin + 0.5 mg/L NAA (SIM).	PUSHPARAJAN & SURENDRAN 2014
<i>H. ada-kodien</i>	Stem cuttings with three apical nodes treated with 5% detergent + Tween-20 for 5 min, 3-4 rinses in SDW, 70% EtOH for 30 s, 0.1% HgCl ₂ for 5 min and 4x with SDW after each step.	16-h PP. 2500 lux. 25 \pm 3 °C. pH 5.8. 3% sucrose. 0.8% agar. Plants acclimatized in garden soil : forest humus (1:1) (<i>in vivo</i> cuttings) or soil : vermicompost : sand (1:1:1) for <i>in vitro</i> -derived plantlets.	MS + 11.09 μ M BA (SIM). MS + 8.87 μ M BA + 4.92 μ M IBA + 2.32 μ M Kin (SMIM). MS + 4.92 μ M IBA (RIM), <i>ex vitro</i> .	JAYA CHANDRA <i>et al.</i> 2015

2,4-D – 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; **AC** – activated charcoal; **BA** – *N*⁶-benzyladenine (BA is used throughout even though BAP (6-benzylamino purine) may have been used in the original, according to TEIXEIRA DA SILVA 2012); **CD** – cow dung; **CJM** – callus induction medium; **CWFT** – white fluorescent tubes; **DW** – distilled water; **EtOH** – ethyl alcohol (ethanol); **HgCl₂** – mercury chloride; **IBA** – indole-3-butyric acid; **Kin** – kinetin (6-furfuryl aminopurine); **LI** – light intensity; **MS** – MURASHIGE & SKOOG (1962) medium; **NAA** – α -naphthaleneacetic acid; **NaOCl** – sodium hypochlorite; **NR** – not reported in the study; **PGR** – plant growth regulator; **PP** – photoperiod; **RH** – relative humidity; **RIM** – root induction medium; **RTW** – running tap water; **SDW** – sterilized (by autoclaving) distilled water; **SDDW** – sterilized (by autoclaving) double distilled water; **SEIM** – somatic embryo induction medium; **SIM** – shoot induction medium; **SMM** – multiplication induction medium; **w** – week(s).

* The original light intensity reported in each study has been represented since the conversion of lux to $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ is different for different illumination (main ones represented): for fluorescent lamps $1 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} = 80 \text{ lux}$; for the sun $1 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} = 55.6 \text{ lux}$; for high voltage sodium lamp $1 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} = 71.4 \text{ lux}$ (THIMIYAN & HEINS 1983).

** Percentage values of solids as w/v (weight/volume) and of liquids as volume/volume (v/v).

*** <https://pubpeer.com/publications/19521837>. Claims of somatic embryogenesis without sufficient proof (cytological, histological, genetic), i.e., only photos of macromorphology.

the ability to produce “300,000 plantlets from a single explant after 10 subculture cycles of 4 to 5 wk intervals with 90% field establishment.”

PUSHPARAJAN & SURENDRAN (2014) induced callus and shoots from shoot tips and leaves of *H. ada-kodien* with a roughly 50% callus induction response in both explants when the BA + NAA combination was used, or closer to 60% when Kin was used with NAA (Tab. 3). The shoot induction response was 68% when Kin + NAA were employed. JAYA CHANDRA *et al.* (2015) showed that 700 mg/L IBA could induce roots in 88% of shoots in a greenhouse when rooted in vermiculite. *In vitro*, these authors induced shoots from nodes in 84% of explants, and multiplies to 8.14 shoots/shoot when subcultured (Tab. 3).

The ability to cryopreserve important medicinal plant germplasm has advantages, but only if the material can be regenerated post storage in liquid N₂. DECRUSE *et al.* (1999) noted that when NH₄NO₃ was removed from MS medium and replaced with 2.6 mM NH₄H₂PO₄, *H. annulare* shoot tips could be successfully cryopreserved using encapsulation-dehydration. Moreover, when NH₄NO₃ was omitted from post-cryopreservation shoot tip regeneration medium, no callus formed (DECRUSE & SEENI 2002; DECRUSE *et al.* 2004). In their experiment, DECRUSE & SEENI (2002) and DECRUSE *et al.* (2004) first subcultured shoot tips derived from seedling six times on MS medium with 0.2 M sucrose and 2.85 μM IBA for a total of 30 days (preconditioning period). Shoot tips 1-3 mm long were dissected then encapsulated in 2.5% sodium alginate and precultured in liquid medium containing 0.5 and 0.75 M sucrose for one day each at 25±2 °C and 0.75 M sucrose + 3% DMSO for 3 days at 4 °C. Precultured beads were dehydrated for 4 h in a sterile airflow hood until dry weight was 0.17-0.2 g water/g, based on DECRUSE *et al.* (1999) and stored in LN overnight. Encapsulated shoot tips (i.e., within synseeds, an essential tool in cryopreservation; SHARMA *et al.* 2013) were then rewarmed at 40 °C. Only 56.8% of cryopreserved shoot tips could regenerate, but without callus formation

while control (uncryopreserved) shoot tips showed 90% recovery, but 8.3% formed callus (DECRUSE & SEENI 2002). DECRUSE *et al.* (2004) observed highest percentage recovery (90%) when MS medium free of NH₄NO₃ was used for pre- and post-cryopreservation procedures.

There are only two studies on the genetic transformation of *H. ada-kodien* conducted by KARMARKAR & KESHAVACHANDRAN (2001) and KARMARKAR *et al.* (2001). In those studies, 25% of hypocotyls could be induced to form hairy roots in the dark in response to *Agrobacterium rhizogenes* strain PcA4, although hairy root induction was also possible when strains 15834 and A4, in both darkness and light conditions, and using either shoots or hypocotyls, albeit at lower levels. Strains 8196 and 2659 could not induce hairy roots. However, apparent figure duplication and/or manipulation undermines the validity of these results.

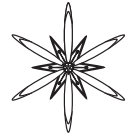
Conclusions

To date, even though the number of studies on the tissue culture of *Holostemma* species is limited, the following has already been achieved: callus induction, shoot induction, root induction and cryopreservation. These processes from the basic steps for additional *in vitro* studies which should examine a much wider range of factors, both biotic and abiotic, to increase shoot production. Even though there are two studies on genetic transformation, the results are doubtful and thus more comprehensive trials are needed. The genetic stability of *in vitro*-derived plants needs to be tested with molecular markers. If *in vitro* flowering (TEIXEIRA DA SILVA *et al.* 2014) can be achieved, then floral tissue for novel *in vitro* studies can be developed. Ultrasound or sonication (TEIXEIRA DA SILVA & DOBRÁNSZKI 2014), the use of thin cell layers (TEIXEIRA DA SILVA & DOBRÁNSZKI 2013), or the use of magnetic fields (TEIXEIRA DA SILVA & DOBRÁNSZKI 2015) to study growth and development or to maximize organogenesis are recommended.

References

- DECRUSE S.W., SEENI S. 2002.** Ammonium nitrate in the culture medium influences regeneration potential of cryopreserved shoot tips of *Holostemma annulare*. *CryoLetters* **23** (1): 55–60.
- DECRUSE S.W., SEENI S., NAIR G.M. 2004.** Preparative procedures and culture medium affect the success of cryostorage of *Holostemma annulare* shoot tips. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **76** (2): 179–182. doi: 10.1023/B:TICU.0000007283.28280.a3.
- DECRUSE S.W., SEENI S., PUSHANGADAN P. 1999.** Cryopreservation of alginate coated shoot tips of *in vitro* grown *Holostemma annulare* (Roxb.) K. Schum, an endangered medicinal plant: influence of preculture and DMSO treatment on survival and regeneration. *CryoLetters* **20**: 243–250.
- DEY A., DE J.N. 2012.** Traditional use of medicinal plants as febrifuge by the tribals of Purulia district, West Bengal, India. *Asian Pac. J. Trop. Dis.* **2** (Suppl. 2): S800–S803.
- FRLHT 1997.** Medicinal plants of India. Guidelines for National Policy and Conservation Programmes: 15. Foundation for Revitalisation of Local Health Traditions, Bangalore.
- GEETHA S.P., RAGHU A.V., MARTIN G., GEORGE S., BALACHANDRAN I. 2009.** *In vitro* propagation of two tuberous medicinal plants: *Holostemma ada-kodien* and *Ipomoea mauritiana*. In: SAXENA P.K., MOHAN JAIN S. (eds), Protocols for *in vitro* cultures and secondary metabolite analysis of aromatic and medicinal plants; methods in molecular biology (Vol. 547, Chapter 7): 81–92. Humana Press, Germany. doi: 10.1007/978-1-60327-287-2_7.
- IRIMPAN M.T., JOLLY C.I., SHEELA D. 2011.** A study of the phytochemical composition and antibacterial activity of *Holostemma adakodien* Schultes. *Int. J. PharmTech Res.* **3** (2): 1208–1210.
- JAYA CHANDRA K., ADILAKSHMI D., BEBI P., DANIEL G.S. 2015.** Macro and micro propagation of *Holostemma ada-kodien*. *Intl. J. Curr. Sci. Technol.* **3** (9): 70–74
- KARMARKAR S.H., KESHAVACHANDRAN R. 2001.** Genetic transformation and hairy root induction in *Holostemma ada-kodien* K. Schum – a vulnerable medicinal plant. *Indian J. Exp. Biol.* **39** (12): 1263–1267.
- KARMARKAR S.H., KESHAVACHANDRAN R., NAZEEM P.A., GIRIJA D. 2001.** Hairy root induction in adapathiyani (*Holostemma ada-kodien* K. Schum.). *J. Trop. Agric.* **102**: 102–107.
- LIEDE S., KUNZE H. 2002.** *Cynanchum* and the Cynanchinae (Apocynaceae – Asclepiadoideae): a molecular, anatomical and latex triterpenoid study. *Org. Divers. Evol.* **2** (3): 239–269. doi: 10.1078/1439-6092-00045.
- MALLIKARJUNA B., USHA NAGALAKSHMI R., GAYATHRI D., RAMA GOPAL G. 2011.** *In vitro* antioxidant and free radical scavenging potential of *Holostemma ada-kodien* K. Schum., an important rare medicinal plant. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **2** (9): 2413–2418.
- MARTIN K. 2002.** Rapid propagation of *Holostemma ada-kodien* Schult., a rare medicinal plant, through axillary bud multiplication and indirect organogenesis. *Plant Cell Reports* **21** (2): 112–117. doi: 10.1007/s00299-002-0483-7.
- MARTIN K.P. 2003.** Plant regeneration through somatic embryogenesis on *Holostemma ada-kodien*, a rare medicinal plant. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **72** (1): 79–82. doi: 10.1023/A:1021229422172.
- MURASHIGE T., SKOOG F. 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* **15**: 473–497.
- PUSHPARAJAN G., SURENDRAN S. 2014.** Studies on medicinal plants. 4. Micropropagation of *Holostemma ada-kodien* Schult. – a rare medicinal plant. *Int. J. Advanced Res.* **2** (8): 394–399.
- REDDY D.S., MUCHANDI I.S., SRINIVASA R.A., PRADEEP H.A., RAVIKUMAR K., RAO M.S., IBRAHIM M. 2010.** Effect of *Holostemma annularis* on the progression of diabetes induced by a high fructose diet in rats and in diabetic C57BL/6J *ob/ob* mice. *Diabetes Metab. Syndr. Obes. Target Ther.* **3**: 87–94. doi: 10.2147/DMSO.S9099.
- SADASIVAM R.K., SRIDHAR C., JAYAVEERA K.N. 2014.** *In vitro* anthelmintic activity of leaf extracts of *Shorea tumbuggaia* Roxb. and *Holostemma ada-kodien* Schult. on (*Pheretima posthuma*) Indian earthworm. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* **7** (Suppl. 2): 95–97
- SHARMA S., SHAHZAD A., TEIXEIRA DA SILVA J.A. 2013.** Synseed technology – A complete synthesis. *Biotech. Advances* **31** (2): 186–207. doi: 10.1016/j.biotechadv.2012.09.007.
- SHIRWAIKAR A., PUNITHA I.S.R., UPADHYE M., DHIMAN A. 2007.** Antidiabetic activity of alcohol root extract of *Holostemma annulare* in NIDDM rats. *Pharm. Biol.* **45** (6): 440–445. doi: 10.1080/13880200701388989.
- SUDHA C.G., KRISHNAN P.N., PUSHANGADAN P. 1998.** *In vitro* propagation of *Holostemma annulare* (Roxb.) K. Schum., a rare medicinal plant. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* **34** (1): 57–63. doi: 10.1007/BF02823124
- SUDHA C.G., KRISHNAN P.N., SEENI S., PUSHANGADAN P. 2000.** Regeneration of plants from *in vitro* root segments of *Holostemma annulare* (Roxb.) K. Schum, a rare medicinal plant. *Current Sci.* **78**: 503–506.
- SURVESWARAN S., SUN M., GRIMM G.W., LIEDE-SCHUMANN S. 2014.** On the systematic position of some Asian enigmatic genera of Asclepiadoideae (Apocynaceae). *Bot. J. Linn. Soc.* **174** (4): 601–619. doi: 10.1111/boj.12156.

- SWARUPANANDAN K., MANGALY J. K., SONNY T.K., KISHOREKUMAR K., BASHA S.C. 1996.** The subfamilial and tribal classification of the family Asclepiadaceae. *Bot. J. Linn. Soc.* **120**: 327–369. doi: 10.1111/j.1095-8339.1996.tb00486.x.
- TEIXEIRA DA SILVA J.A. 2012.** Is BA (6-benzyladenine) BAP (6-benzylaminopurine)? *Asian Australas. J. Plant. Sci. Biotechnol.* **6 (Special Issue 1)**: 121–124.
- TEIXEIRA DA SILVA J.A. 2013.** Snub publishing: theory. *Asian Australas. J. Plant. Sci. Biotechnol.* **7 (Special Issue 1)**: 35–37.
- TEIXEIRA DA SILVA J.A., DOBRÁNSZKI J. 2013.** Plant thin cell layers: a 40-year celebration. *J. Plant Growth Regul.* **32 (4)**: 922–943. doi: 10.1007/s00344-013-9336-6.
- TEIXEIRA DA SILVA J.A., DOBRÁNSZKI J. 2014.** Sonication and ultrasound: impact on plant growth and development. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **117 (2)**: 131–143. doi: 10.1007/s11240-014-0429-0.
- TEIXEIRA DA SILVA J.A., DOBRÁNSZKI J. 2015.** How do magnetic fields affect plants *in vitro*? *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* **51 (3)**: 233–240. doi: 10.1007/s11627-015-9675-z
- TEIXEIRA DA SILVA J.A., KERBAUY G.B., ZENG S.-J., CHEN Z.-L., DUAN J. 2014.** *In vitro* flowering of orchids. *Crit. Rev. Biotechnol.* **34 (1)**: 56–76. doi: 10.3109/07388551.2013.807219
- THIMIYAN R.W., HEINS R.D. 1983.** Photometric, radiometric, and quantum light units of measure: a review of procedures for interconversion. *HortScience* **18**: 818–822.
- WARRIER P.K., NAMBIAR V.P.K., RAMANKUTTY C. 1995.** Indian medicinal plants: A compendium of 500 species. **Vol. 3**: 167–171. Orient Longman.



EVALUATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF THE LICHENS *PHYSICIA AIPOLIA*, *XANTHORIA PARIETINA*, *USNEA FLORIDA*, *USNEA SUBFLORIDANA* AND *MELANOHALEA EXASPERATA*

GÜLŞAH ÇOBANOĞLU¹, CENK SESAL^{1*}, BIRKAN AÇIKGÖZ¹, İSKENDER KARALTI²

Abstract. The present study aimed to evaluate the antimicrobial activity of methanol and chloroform extracts of five lichen species, *Melanohalea exasperata*, *Physcia aipolia*, *Usnea florida*, *U. subfloridana* and *Xanthoria parietina*. Antimicrobial activity in culture assays of these foliose and fruticose lichen extracts were examined against two Gram-negative bacteria (*Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*), two Gram-positive bacteria (*Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*), and the yeast *Candida albicans* using the paper disc method through determination of minimal inhibitory concentrations (MICs). The obtained results indicated the existence of different levels of antibiotic substances in the chloroform and the methanol extracts of the examined lichen species. The chloroform extracts of *Usnea subfloridana* showed the highest activity against *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* while the methanol extracts of this species were not active against these microorganisms. The chloroform extracts of the examined species exhibited more significant antimicrobial activity than the methanol extracts. None of the species were active against *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*. Most of the lichen extracts indicated a moderate antifungal activity against *Candida albicans*, except for *Physcia aipolia*, which was not active.

Key words: antimicrobial activity, lichen, MIC

¹ Marmara University, Science and Art Faculty, Department of Biology, Goztepe Campus, TR-34722 Istanbul, Turkey;

* csesal@marmara.edu.tr

² Yeditepe University, Faculty of Health Sciences, Nutrition and Dietetics Department, Ataşehir, Istanbul, Turkey

Introduction

Lichens are successful symbiotic associations between fungi and algae, usually an ascomycete as a mycobiont partner and a green alga or a cyanobacterium as a photosynthetic partner, so called “lichenized fungi”, and includes over 20,000 species all over the world. These unique organisms are able to produce lichen-specific secondary metabolites, which comprise phenolic compounds, anthraquinones, dibenzofurans, depsides, depsidones, depsones, γ -lactones, and pulvinic acid derivatives, with currently about 1,000 substances identified (MUGGIA *et al.* 2009). The potential of secondary lichen metabolites in pharmaceutical sciences is derived from their traditional uses. Lichens have been utilized in folk medicine, food, cosmetics, dyes, and for other ethnobotanical purposes for more than five millennia in several civilizations (LLANO 1950; ROMAGNI

& DAYAN 2002; MALHOTRA *et al.* 2007; YAVUZ & ÇOBANOĞLU 2010). Through their synthesis of biologically-active substances, the lichens as much as plant materials have potential healing power and continue to play a major role in herbal medicine for both traditional and modern treatments (INGOLFSDOTTIR 2002; ROMAGNI & DAYAN 2002; YAVUZ 2013).

In recent years there has been a rising interest in the discovery of new antibiotic compounds to control bacterial diseases. The antimicrobial activity of many lichens have been reported (ASLAN *et al.* 2001; CROCKETT *et al.* 2003; ÇOBANOĞLU *et al.* 2010; SANTIAGO *et al.* 2010; RANKOVIĆ *et al.* 2011; AÇIKGÖZ *et al.* 2013). A number of lichens also have antifungal effects (HALAMA & VAN HALUWYN 2004; SCHMEDA-HIRSCHMANN *et al.* 2008), antioxidant capacity (WEISSMAN *et al.* 2005; LUO *et al.* 2006, 2009; KEKUDA *et al.* 2009; ATALAY *et al.* 2011), antiviral, cytotoxic and antigenotoxic activity

(MANOJLOVIĆ *et al.* 2010; TURKEZ *et al.* 2012; AÇIKGÖZ *et al.* 2013), as well as anticancer and anti-inflammatory effects (SULEYMAN *et al.* 2002; RUSSO *et al.* 2008; TRIGGIANI *et al.* 2009).

The following study presents the *in vitro* antimicrobial activity of chloroform and methanol extracts of five lichen species: *Melanohalea exasperata* (De Not.) O. Blanco, A. Crespo, Divakar, Essl., D. Hawksw. & Lumbsch, *Physcia aipolia* (Ehrh. ex Humb.) Fürnr., *Usnea florida* (L.) Weber ex F.H. Wigg., *U. subfloridana* Stirt. and *Xanthoria parietina* (L.) Th.Fr. Each has potential medicinal and economic value as a candidate for contribution to pharmacological use of secondary lichen metabolites. For instance, *Xanthoria parietina* was reported as being used to cure jaundice (HUNECK 1999). A strong anticancer activity was stated for *Xanthoria parietina* by TRIGIANI *et al.* (2009). Various colours were obtained from *Xanthoria parietina* as well as some other lichen species in natural dying by ŞEN *et al.* (2014). A number of studies showed that many *Usnea* species have strong antimicrobial activity (İNGOLFSDOTIR 2002; FRANCOLINI 2004; THIPPESWAMY 2011). *Usnea* has often been mentioned in the history of ethno-medicine (LLANO 1950; MALHOTRA *et al.* 2007; YAVUZ & ÇOBANOĞLU 2010; YAVUZ 2013). However, the biological activities of the other species contained in the present study have not been previously investigated.

Material and methods

Lichen samples. Lichen materials for the present antimicrobial tests were collected from the provinces of Isparta and Bolu in Turkey. Five lichen species were identified by examination under a stereomicroscope (Olympus SZ40; Olympus Medical Systems Corp., Tokyo, Japan) by G. Çobanoğlu (SMITH *et al.* 2009). These species, including *Melanohalea exasperata*, *Physcia aipolia*, *Usnea florida*, *U. subfloridana* and *Xanthoria parietina*, are epiphytic-living (on tree bark) and morphologically foliose and fruticose.

Preparation of lichen extracts. Air-dried thalli of the samples were finely ground by means of a mortar and a pestle. Powdered lichen

materials from samples of *Physcia aipolia* (5 g), *Xanthoria parietina* (5 g), *Usnea subfloridana* (5 g), *Melanohalea exasperata* (3 g) and *Usnea florida* (3 g), were extracted in a Soxhlet extractor apparatus using 270 ml of methanol and chloroform as solvents. The extracts were filtered through Whatman No. 1 filter paper (Whatman, Maidstone, England). The solvents were then evaporated by a rotary evaporator. In this way, the dry methanol extracts; 135 mg for *Melanohalea exasperata*, 351 mg for *Physcia aipolia*, 237 mg for *Usnea florida*, 417 mg for *Usnea subfloridana*, 252 mg for *Xanthoria parietina* and the dry chloroform extracts for the same species; 10 mg, 20 mg, 10 mg, 15 mg, 10 mg, respectively, were obtained. The extracts were sterilized by membrane filtration using 0.45 µm pore-sized Millipore filters (MF-Millipore, Billerica, MA, USA), and were kept at -20 °C until assay.

Microorganisms and media. The following microorganisms were used as test organisms in this study: *Escherichia coli* ATCC 2592 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 (Gram-negative bacteria), *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Gram-positive bacteria), and *Candida albicans* ATCC 90028 (Fungus). All the bacteria and fungus were provided by the Medical Microbiology Department of the Medicine Faculty of Yeditepe University, Istanbul, Turkey.

The test microorganisms were grown in nutrient broth medium (NB-No. 3, for microbiology, 70149 Fluka, Munich, Germany) at 37 °C for 24 h, adjusted to a 0.5 McFarland standard, approximately 10⁸ cfu/ml for bacteria and 10⁶ cfu/ml for *Candida albicans*.

Antimicrobial activity assay. A paper disc test was used to test microorganisms that were grown in nutrient broth (NB-No. 3, as above) in incubators at 37 °C, overnight for bacterial strains and for 48 h for the yeast strain. For the disc diffusion assay, the samples were diluted to 0.5 McFarland standards, and then the bacteria and *Candida albicans* were spread on nutrient agar plates (Salubris, Istanbul, Turkey) and Muller Hinton agar (MHA) (Sigma-Aldrich, Munich, Germany), respectively. At the same time, methanol and chloroform

Tab. 1. Antimicrobial activities of extracts of *Melanohalea exasperata*, *Physcia aipolia*, *Usnea florida*, *U. subfloridana*, and *Xanthoria parietina* in the disc diffusion assay.

Lichen species ^a		<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
<i>M. exasperata</i>	M	-	-	7 ± 0.58	-	13 ± 0.58
	C	17 ± 0.58	19 ± 0.58	-	10 ± 0.58	-
<i>P. aipolia</i>	M	-	-	-	-	-
	C	23 ± 0.58	12 ± 0.58	-	-	-
<i>U. florida</i>	M	-	-	7 ± 0.57	10 ± 0.00	13 ± 0.58
	C	13 ± 0.00	9 ± 0.00	9 ± 0.00	10 ± 0.00	7 ± 0.58
<i>U. subfloridana</i>	M	-	-	-	10 ± 0.58	11 ± 0.00
	C	32 ± 0.58	31 ± 0.00	-	10 ± 0.58	-
<i>X. parietina</i>	M	-	-	-	-	10 ± 0.57
	C	9 ± 0.58	21 ± 0.00	-	8 ± 0.58	-
Antibiotics ^b						
C					26 ± 0.58	
FLU						25 ± 0.58
TZP		26 ± 1.53	26 ± 1.52			
Va				17 ± 1.15		

Values are mean inhibition zones ± SD (in mm) of three replicates.

- - no inhibition observed.

^a Extracts: **C** – chloroform extract; **M** – methanol extract.

^b Antibiotics used as positive reference standards: **C** – chloramphenicol (30 µg/disc); **FLU** – fluconazole (25 µg/disc); **TZP** – piperacillin/tazobactam (110 µg/disc); **Va** – vancomycin (30 µg/disc).

extracts were diluted in the respective solvents. The final concentrations of the methanol extracts were 13.5 mg/ml for *Melanohalea exasperata*, 35.1 mg/ml for *Physcia aipolia*, 23.7 mg/ml for *Usnea florida*, 41.7 mg/ml for *U. subfloridana* and 25.2 mg/ml for *Xanthoria parietina*. Alike for the same species 1 mg/ml, 2 mg/ml, 1 mg/ml, 1.5 mg/ml and 1 mg/ml final concentrations were obtained from the chloroform extracts, respectively. The solutions were sterilized by filtration through 0.45-µm Millipore filters. Finally methanol extracts of 270 µg for *Melanohalea exasperata*, 702 µg for *Physcia aipolia*, 474 µg for *Usnea florida*, 834 µg for *Usnea subfloridana* and 504 µg for *Xanthoria parietina*, and respectively, 20 µg, 40 µg, 20 µg, 30 µg, and 20 µg chloroform extracts of the same species were added onto Whatman filter paper discs (6 mm diameter) allowing the solvent to evaporate during application (BAUER *et al.* 1966). The respective solvents employed to dissolve the lichen extracts were

used as negative controls. Also, for the bacteria; chloramphenicol (C), piperacillin/tazobactam (TZP), vancomycin (Va) and for the yeast; fluconazole (FLU) were preferred as positive reference standards. A bacterial colony counter, Colony Star (Funke-Gerber, Berlin, Germany), was used to measure bacterial inhibition zones on the test plates. A large antibiotic control panel recommended by CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) was used for all microbiological tests, which were done in triplicate at laboratories with an International Quality Certification (ISO-15189).

To determine minimal inhibitory concentrations (MIC), the final concentrations of *Usnea subfloridana* chloroform solution that exhibited relatively larger zones of inhibition than antibiotics, were diluted serially from one-to ten-fold. The serial dilutions were tested on the *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* during overnight incubation.

Results, discussion and conclusions

The antimicrobial activities of five lichen extracts against four tested microorganisms were evaluated in this study. The diameters of growth inhibition zones in the disc diffusion assay are shown in the Tab. 1. Antimicrobial activity was compared with antibiotics that were used as positive reference standards: chloramphenicol, piperacillin/tazobactam, vancomycin for bacteria and fluconazole for fungi.

Maximum antimicrobial activity manifested in the chloroform extracts of the lichen *Usnea subfloridana* against Gram-negative bacteria *Escherichia coli* (MIC = 3 µg/ml) and *Pseudomonas aeruginosa* (MIC = 27 µg/ml). This lichen showed stronger activity than standard antibiotics (Tab. 1). In comparison, the methanol extracts of the same lichen species were not active against any bacteria. Both extracts of the other *Usnea* species, *U. florida*, were not as active against the tested microorganisms as *U. subfloridana*. Similarly, the chloroform extracts of *Physcia aipolia* and *Melanohalea exasperata* markedly inhibited these two Gram-negative bacteria (in concentrations close to the activity of the standard antibiotics) (Tab. 1), but not the Gram-positive bacteria (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*) and the fungus. Except for *Usnea subfloridana*, which had the highest activity, the chloroform extract of *Physcia aipolia* was more active against *Escherichia coli* in diameter of the growth inhibition zone at 23 mm than the other lichen species, while the chloroform extract of *Xanthoria parietina* exhibited higher antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa* in terms of the diameter of an inhibition zone at 21 mm (Tab. 1).

The methanol extracts of the lichen species had no or weak effects on the tested bacteria compared to the chloroform extracts. In contrast, the results of antifungal activity showed that the tested methanol extracts of the lichens had moderate effects on *Candida albicans*, except for *Physcia aipolia*, which had no effect. The methanol extracts of *Melanohalea exasperata* and *Usnea florida* were more active against *Candida albicans* than the other lichen

species, with a smaller diameter inhibition zone (13 mm) compared to fluconazole (25 mm). In the negative controls, there was no observed growth inhibition.

The results of the present study demonstrated that the chloroform extracts of five lichen species (but not their methanol extracts) exhibited strong antimicrobial activity against Gram-negative bacteria, particularly *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* (Tab. 1). The findings are in line with a part of the results from earlier papers. While the chloroform extracts of *Physcia aipolia* and *Xanthoria parietina* significantly inhibited two Gram-negative bacteria *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* in this study, ASLAN *et al.* (2001) reported that neither acetone nor chloroform extracts of lichen *Physcia aipolia* exhibited activity against these Gram-negative bacteria. Also, in another study by KARAGÖZ *et al.* (2009), aqueous extracts of *Xanthoria parietina* were inactive against *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, but active against *Staphylococcus aureus*. In comparison, DÜLGER *et al.* (1997) determined antimicrobial effects in *Usnea florida* and found that chloroform, ethanol, acetone and ethyl acetate extracts were all active against *Escherichia coli* to a degree greater than a standard antibiotic. Our findings, particularly on the antimicrobial activity of the chloroform extracts of the same lichen species in the present study coincide with their results. Moreover, the acetone and chloroform extracts of some lichen species were reported as active against these two Gram-negative bacteria by a previous study of ÇOBANOĞLU *et al.* (2010). KARTHIKAIDEVI *et al.* (2009) also reported on the antimicrobial activity of the chloroform extracts of lichens against these two Gram-negative bacteria, while the methanol extracts were inactive. It is concluded that solvent types and their concentrations are very effective on the level of activity of the same lichen species.

Although the antimicrobial activities of crude lichen extracts have been examined in many studies (KARTHIKAIDEVI *et al.* 2009; ÇOBANOĞLU *et al.* 2010; SANTIAGO *et al.* 2010; RANKOVIĆ *et al.* 2011; AÇIKGÖZ *et al.* 2013; BASILE *et al.* 2015), the chemical constituents

of the lichen species need to be analysed more specifically to determine the antibiotic activity of an individual lichen substance. Diversity at the level of antimicrobial activity of lichen species may be related to where the species are collected, the type of solvent, and the tested organisms. However, expressive results in many recent studies encourage further studies that concentrate on lichen substances.

Thus, the highest antibiotic activity was reported in lichens extracted with a chloroform solvent. The chloroform extract of *Usnea subfloridana* showed the maximum inhibitory effect against *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, which is a significant finding in this study and is reported here for the first time. In addition, chloroform was found to be a more effective solvent than methanol in the present study. With respect to this, one finding is that solvent type is important to the level of activity of the same lichen species. Further, the grade of activity or effectiveness depends on species of the lichen in relation to the kinds of secondary metabolites involved. A range of different results in biological activity studies may be due to different habitat conditions and neighbouring species of the collected lichen material, which may affect the production of secondary metabolites in a lichen body. The other variables influencing outcomes of the studies included: type of the solvent, concentration of the extract and the tested microorganism.

Acknowledgements

This study is part of a research project supported by The Research Fund of Marmara University with project number FEN-A-200611-0208.

References

- AÇIKGÖZ B., KARALTI İ., ERSÖZ M., COŞKUN M.Z., ÇOBANOĞLU G., SESAL C. 2013. Screening of antimicrobial and cytotoxic effects of two *Cladonia* species. *Z. Naturforsch. C.* **68** (5-6): 191–197.
- ASLAN A., GÜLLÜCE M., ATALAN E. 2001. A study of antimicrobial activity of some lichens. *Bull. Pure Appl. Sci.* **20** (1): 23–26.
- ATALAY F., HALICI M., MAVI A., ÇAKIR A., ODABAŞOĞLU F., KAZAZ C., ASLAN A., KÜFREVOĞLU I. 2011. Antioxidant phenolics from *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm. and *Usnea longissima* Ach. lichen species. *Turk. J. Chem.* **35**: 1–15.
- BASILE A., RIGANO D., LOPPI S., DI SANTI A., NEBBIOSO A., SORBO S., CONTE B., PAOLI L., RUBERTO F.D., MOLINARI A.M., ALTUCCI L., BONTEMPO P. 2015. Antiproliferative, antibacterial and antifungal activity of the lichen *Xanthoria parietina* and its secondary metabolite parietin. *Int. J. Mol. Sci.* **16**: 7861–7875.
- BAUER A.W., KIRBY W.M.N., SHERRIS J.C., TURCK M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized simple disc method. *Am. J. Clin. Pathol.* **45**: 493.
- CROCKETT M., KAGEYAMA S., HOMEN D., LEWIS C., OSBORN J., SANDER L. 2003. Antibacterial properties of four pacific northeast lichens. Oregon State University Press, Corvallis.
- ÇOBANOĞLU G., SESAL C., GÖKMEN B., ÇAKAR S. 2010. Evaluation of the antimicrobial properties of some lichens. *South-West J. Hortic. Biol. Environ.* **1**: 153–158.
- DÜLGER B., GÜCİN F., KARA A., ASLAN A. 1997. *Usnea florida* (L.) Wigg. likeninin antimikrobiyal aktivitesi. *Turkish J. Biol.* **21**: 103–108.
- FRANCOLINI I., NORRIS P., PIOZZI A., DONELLI G., STOODLEY P. 2004. Usnic acid, a natural antimicrobial agent able to inhibit bacterial biofilm formation on polymer surfaces. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48** (11): 4360–4365.
- HALAMA P., VAN HALUWYN C. 2004. Antifungal activity of lichen extracts and lichenic acids. *BioControl* **49**: 95–107.
- HUNECK S. 1999. The significance of lichens and their metabolites. *Naturwissenschaften* **86**: 559–570.
- INGOLFSDOTTIR K. 2002. Molecules of interest – usnic acid. *Phytochemistry* **61**: 729–736.
- KARAGÖZ A., DOĞRUÖZ N., ZEYBEK Z., ASLAN A. 2009. Antibacterial activity of some lichen extracts. *J. Med. Plants Res.* **3** (12): 1034–1039.
- KARTHIKAIDEVI G., THIRUMARAN G., MANIVANNAN K., ANANTHARAMAN P., KATHIRESAN K., BALASUBARAMANIAN T. 2009. Screening of the Antibacterial properties of lichen *Roccella belangeriana* (Awasthi) from Pichavaram Mangrove (*Rhizophora* sp.). *Adv. Biol. Res.* **3** (3-4): 127–131.
- KEKUDA T.R.P., VINAYAKA K.S., KUMAR S.V.P., SUDHARSAN S.J. 2009. Antioxidant and antibacterial activity of lichen extracts, honey and their combination. *J. Pharm. Res.* **2** (12): 1875–1878.
- LLANO G.A. 1950. Economic uses of lichens. Annual Report. Smithsonian Institution, Washington D.C.
- LUO H., REN M., LIM K., KOH Y.J., WANG L., HUR J. 2006. Antioxidative activity of lichen *Thamnomia vermicularis* in vitro. *Mycobiology* **34** (3): 124–127.

- LUO H., YAMAMOTO Y., KIM J.A., JUNG J.S., KOH Y.J., HUR S. 2009.** Lecanoric acid, a secondary lichen substance with antioxidant properties from *Umbilicaria antarctica* in maritime Antarctica (King George Island). *Polar Biol.* **32**: 1033–1040.
- MALHOTRA S, SUBBAN R., SINGH A. 2007.** Lichens-role in traditional medicine and drug discovery. *Internet J. Alternative Med.* **5**: 2.
- MANOJLOVIC N.T., VASILJEVIC P., JUSKOVIC M., NAJMAN S., JANKOVIC S., MILENKOVIC-ANDJELKOVIC A. 2010.** HPLC analysis and cytotoxic potential of extracts from the lichen, *Thamnolia vermicularis* var. *subuliformis*. *J. Med. Plants Res.* **4** (9): 817–823.
- MUGGIA L., SCHMITT I., GRUBE M. 2009.** Lichens as treasure chests of natural products. *Sim News May/June 2009*: 85–97.
- RANKOVIĆ B.R., KOSANIĆ M.M., STANOJKOVIĆ T.P. 2011.** Antioxidant, antimicrobial and anticancer activity of the lichens *Cladonia furcata*, *Lecanora atra* and *Lecanora muralis*. *BMC Complement. Altern. Med.* **11**: 97.
- ROMAGNI J.G., DAYAN F.E. 2002.** Structural diversity of lichen metabolites and their potential use. In: UPADHYAY R.K. (ed.), *Advances in microbial toxin research and its biotechnological exploitation*: 151–170. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA.
- RUSSO A., PIOVANA M., LOMBARDO L., GARBARINO J., CARDILE V. 2008.** Lichen metabolites prevent UV light and nitric oxide-mediated plasmid DNA damage and induce apoptosis in human melanoma cells. *Life Sci.* **83**: 468–474.
- SANTIAGO K.K.A., BORRICANO J.N.C., CANAL J.N., MARCELO D.M.A., PEREZ M.C.P., DE LA CRUZ T.E.E. 2010.** Antibacterial activities of fruticose lichens collected from selected sites in Luzon Island, Philippines. *Philippine Sci. Lett.* **3**: 18–29.
- SCHMEDA-HIRSCHMANN G., TAPIA A., LIMA B., PERTINO M., SORTINO M., ZACCHINO S., ARIAS A.R., FERESIN G.E. 2008.** A new antifungal and antiprotozoal depside from the Andean lichen *Protousnea poeppigii*. *Phytother. Res.* **22**: 349–355.
- SMITH C.W., APTROOT A., COPPINS B.J., FLETCHER A., GILBERT O.L., JAMES P.W., WOLSELEY P.A. 2009.** The lichens of Great Britain and Ireland. The British Lichen Society, London, UK.
- SULEYMAN H., YILDIRIM D., ASLAN A., GOCER F., GEPDIREMEN A., GUVENALP Z. 2002.** An investigation of the antiinflammatory effects of an extract from *Cladonia rangiformis* Hoffm. *Biol. Pharm. Bull.* **25**: 10–13.
- ŞEN H., AKSOY A., ÇOBANOĞLU G., SELVI S. 2014.** Natural dyeing works on some lichens species distributed in Ayvacık (Çanakkale) and İvrindi (Balıkesir/Turkey). *Biol. Divers. Cons.* **7** (3): 184–189.
- THIPPESWAMY B., NAVEENKUMAR K.J., BODHARTI J.G., SHIVAPRASAD S.R. 2011.** Antimicrobial activity of ethanolic extract of *Usnea longissima*. *J. Exp. Sci.* **2** (12): 1–3.
- TRIGGIANI D., CECCARELLI D., TIEZZI A., PISANI T., MUNZI S., GAGGI C., LOPPI S. 2009.** Antiproliferative activity of lichen extracts on murine myeloma cells. *Biologia* **64**: 59–62.
- TURKEZ H., AYDIN E., ASLAN A. 2012.** *Xanthoria elegans* (Link) (lichen) extract counteracts DNA damage and oxidative stress of mitomycin C in human lymphocytes. *Cytotechnology* **64**: 679–686.
- YAVUZ M. 2013.** Lichens in the prescriptions of Pliny the Elder. *Oltenia – Studii și comunicări. Științele Naturii* **29** (1): 115–119.
- YAVUZ M., ÇOBANOĞLU G. 2010.** Ethnological uses and etymology of the word usnea in Ebubekir Razi's "Liber Almansoris". *BLS Bulletin* **106**: 3–12.
- WEISSMAN L., GARTY J., HOCHMAN A. 2005.** Characterization of enzymatic antioxidants in the lichen *Ramalina lacera* and their response to rehydration. *Appl. Environ. Microbiol.* **71** (11): 6508–6514.



MACRO- AND MICROMORPHOLOGICAL STUDIES OF *CLYPEOLA* SPECIES (BRASSICACEAE) IN IRAN

SOUSAN ABBASIAN & MARYAM KESHAVARZI *

Abstract. *Clypeola* is an annual genus from Brassicaceae with four (*C. jonthlaspi*, *C. aspera*, *C. lappacea* and *C. dichotoma*) species in Iran. These are plants of different habitats and found as early spring therophytes in semiarid regions of Iran. In this study 63 populations of *Clypeola* genus have been studied by 49 macro- and micromorphological features. Results were analyzed by use of multivariate statistical methods. Cluster analysis, factor analysis and ordination methods were applied. The result showed that such characters as pedicle, trichome, stamen, petal features and sculpture of fruit surface have valuable diagnostic in separating of these species. In present study it was also found that the use of seed surface character in not effective alone for taxa delimitation except of some *C. jonthlaspi* subspecies. Among leaf features, trichome ornamentalions, their position and branching pattern are effective for species separation. Fruit hairs are of diagnostics importance in species separation too.

Key words: Brassicaceae, *Clypeola*, fruit, micromorphology, seed

Plant Science Dept, Faculty of Biological Science, Alzahra University, Tehran, Iran;

* neshat112000@yahoo.com, M.keshavarzi@alzahra.ac.ir

Introduction

Brassicaceae comprise of 338 genera and 3709 species (FRANZKE *et al.* 2010). In Brassicaceae, the importance of micro-morphological characters such as seed surface and hairs has been emphasized (AL-SHEHBAZ *et al.* 2006). Trichomes are divided into three groups based on their form, the branching pattern, types and number of cells. The trichome features are valuable in the classification of Brassicaceae on generic and specific levels. For example, ROLLINS & BANERJEE (1976) studied the leaf trichomes of *Lesquerella* S. Watson. ANCEW & GORANOVA (2006) studied the seed and leaf trichome morphology of eight taxa from Alyseae tribe. MUMMENHOFF *et al.* (1997) pointed to the characters convergence in fruit morphology during their studies on *Thlaspi* s.l. based on ITS analysis.

Based on early researches on seed surface features, characters of anticlinal and periclinal cell walls have been considered significant (ABDEL KHALIK *et al.* 2002; TANTAWY *et al.* 2004; EL NAGGAR *et al.* 2005; MOAZZENI *et al.* 2007; KASEM *et al.* 2011).

In particular, ABDEL KHALIK *et al.* (2002) studied morphological features of 45 taxa of Brassicaceae. They pointed on the diagnostic importance of leaf, flower, fruit, seed, embryo and trichome morphology. BOLOURIAN & PAKRAVAN (2011) mentioned that silicle and stamen features are valuable in separation of annual species.

Clypeola L., is an annual genus of Alyseae tribe. Distribution of this genus is limited to northern hemisphere. There are 9 species in this genus (CHAYTOR & TURILL 1935). RECHINGER (1968) mentioned 5 *Clypeola* species in Iran: *C. aspera* (Gruer) Turill, *C. lappacea* Boiss, *C. dichotoma* Boiss, *C. jonthlaspi* L. and *C. microcarpa* Morise. *C. jonthlaspi* is idely distributed in Iran and in some papers presence of varieties or subspecies of this taxon is mentioned (CHAYTOR & TURILL 1935; BREISTROFFER 1936). Due to the different description of *C. microcarpa* in literatures, it is mainly considered as a subspecies or a variety of *C. jonthlaspi*. In present study *C. microcarpa* as a separate species is rejected too.

The aim of this research is to evaluate the macro- and micromorphological variation

in *Clypeola* in order to find more diagnostic features and to realize a better separation of taxa.

Material and methods

The herbarium specimens and freshly collected plants from 63 populations belonging to 4 annual taxa (*C. jonthlaspi*, *C. aspera*, *C. lappacea*, *C. dichotoma*) from different localities in Iran were studied (Tab. 1). Vouchers of the collected plants are deposited in Alzahra University Herbarium (ALUH). Ten individuals were taken from each locality and used for morphological studies based on species distribution patterns. Totally 49 qualitative and quantitative morphological characters, consisting of vegetative and reproductive structures were assessed (Tabs 2 & 3). Characters were selected on the base of Floras and our own field studies. The fruit, seed and leaf surface were studied by use of scanning electron microscopy (SEM). Samples were fixed on aluminum stubs using double-sided adhesive and were coated with a thin layer of gold-palladium. The SEM micrographs were taken by Philips XL30. In text EL NAGGAR (2005) terminology is applied.

In phenetic analysis the mean of quantitative characters were used while qualitative characters were coded as binary/multistate characters. Variables were standardized (mean = 0, variance = 1) for multi-variant statistical analyses (NG *et al.* 1981). In order to find the species relationships cluster analyses using UPGMA (un-weighted paired group, mean average) and WARD (minimum variance, spherical clusters) as well as ordination based on principal component analysis (PCA) were performed. In order to determine the most variable morphological characters among the species/populations, factor analysis based on principal components analysis (PCA) was performed. Non-variant characters were omitted before factor analysis.

Results

Macromorphological studies

Form of pedicle show variation in studied species. The pedicle is recurved and this is

the diagnostic trait for *Alyssum* and *Clypeola* separation. Pedicle is like an umbrella hand in *C. jonthlaspi* (Fig. 1 E), domical in *C. aspera* (Fig. 1 F), recurved with a sharp angle in *C. lappacea* (Fig. 1 G), and S-shaped in *C. dichotoma* (Fig. 1 H).

Fruit trichomes in studied species are columnar or pyramidal. In *C. jonthlaspi* and *C. dichotoma*, trichomes are columnar. In *C. aspera* and *C. lappacea*, trichomes are pyramidal and branching at the tip and in mature fruit. The branching pattern in different populations of *C. lappacea* is varied and in *C. aspera* it is pentamerous. The trichome features in *C. jonthlaspi* showed variation and due to this it has been used to distinguish subspecies and varieties in Floras and papers. In *C. lappacea* there is a great variety in hair distribution and length.

Fruit shape is elliptic, orbicular or obovate. The style in *C. dichotoma* and *C. lappacea* is long and the tip of fruits are not emarginate (Fig. 1 I, J), though in *C. aspera* and *C. jonthlaspi* it is emarginate and style length is often equal to its width (Fig. 1 K, L). In *C. jonthlaspi*, *C. aspera* and *C. dichotoma* there are two distinct parts, fruit disk and wing. **The shape of cells in fruit margins** differs among three species, they are lobate in *C. jonthlaspi* (Fig. 2 A), stellate with the presence of stomata in *C. aspera* (Fig. 2 B), and represented by extensive cell with fine lobes in *C. dichotoma* (Fig. 2 C). In *C. lappacea* there is no distinction between central and marginal parts of fruit. The seed is wingless and without mucilage. Seed is elliptic, obovate, oblong and orbicular with different degree of elongation. In all studied species, different form can be seen among populations and even individuals of a population. **The calyces** are shed after ripening of fruits. In *C. aspera*, *C. jonthlaspi* and *C. dichotoma*, calyx is saccate. In *C. lappacea*, calyces are nearly straight. Sometimes the margins are purple (*C. jonthlaspi*).

Petals in studied species are oblong or triangular (*C. jonthlaspi*). In *C. aspera* and *C. lappacea*, lamina is flattened. In *C. dichotoma*, at the base of one or two petals, there is a protruding in some flower (Fig. 2 F). The

Tab. 1. Collections data for populations used in macromorphological study. * – stands for accessions used in micromorphological studies by SEM. **ALUH** – vouchers preserved in Herbarium of Alzahra University; **FARH** – in Herbarium of Kharazmi University; **FUMH** – in Herbarium of Ferdouysi University; **HSBU** – in Herbarium of Shahid Beheshti University.

Nr	Species	Voucher Nr	Origin	Collector
1	<i>C. jonthlaspi</i>	18917-ALUH	Tehran: Boumehen	Abbasian
2		18918-ALUH	Alborz: Baghestan	Mosaferi
3		188-ALUH	Alborz: Aghesht to Baraghan *	Keshavarzi
4		18919-ALUH	Gilan: Jirandeh	Dadmehr
5		18920-ALUH	Qazvin: Abyek	Abbasian
6		18921-ALUH	Qazvin: 20 km Ange road, Shekarnab village *	Abbasian
7		18922-ALUH	Fars: Shiraz to Isfahan, 15 km to Saadat Shahr	Abbasian
8		18923-ALUH	Kermanshah: Taq-e-Bostan	Gholami
9		18924-ALUH	Tehran: Dar Abad	Abbasian, Habibi, Dadmehr
10		18925-ALUH	Tehran: Darakeh River near Vanak	Keshavarzi, Abbasian, Habibi
11		18926-ALUH	Tehran: Bumehen to Tehran road	Abbasian
12		18915-ALUH	Fars: 35 km Shiraz, 1482 m	Abbasian
13		18913-ALUH	Yazd: Tabas, Neyzar village, 1010 m	Abbasian
14		18911-ALUH	Yazd: Tabas, Eshqabad road, Ozbak Kuh	Abbasian
15		18999-ALUH	Khorasan: Boshrouyeh, Neygenan village	Abbasian
16		18918-ALUH	Fars: 35 km to Neyriz, 1480 m	Abbasian
17		1897-ALUH	Fars: Marvdasht road, Naqsh-e-Rostam	Abbasian
18		1895-ALUH	Yazd: Tabas, Khevr village	Abbasian
19		1892-ALUH	Yazd: Tabas, Eshqabad road, Kalshane village, 1092 m *	Abbasian
20		1903-ALUH	Kurdistan: Sanandaj road, 15 km Kamyaran	Abbasian
21		1904-ALUH	Kermanshah: Sanandaj road	Abbasian
22		1905-ALUH	Kermanshah: 60 km Kermanshah, Bid Sorkh ghaut	Abbasian
23		24711-FUMA	Khorasan: 70 km to Mashhad, Kalat road, 1600 m *	Faqihi nia & Zanguee
24		16372-FUMA	Khorasan: W. Dargaz-Gadganlou, 1200 m	Joharchi & Zanguee
25		25371-FUMA	Khorasan: Kashmar, SW Kuh Sorkh	Faghihi nia & Zanguee
26	<i>C. aspera</i>	18916-ALUH	Fars: 35 km to Shiraz, 1482 m	Abbasian
27		18914-ALUH	Yazd: Tabas, Neyzar village, 1010 m	Abbasian
28		18912-ALUH	Yazd: Eshqabad road, Ozbak Kuh	Abbasian
29		18910-ALUH	Khorasan: Boshrouyeh, Neygenan village *	Abbasian
30		1898-ALUH	Kerman: Kerman, 1770 m	Abbasian
31		1896-ALUH	Fars: 35 km to Neyriz, 1480 m	Abbasian
32		1893-ALUH	Yazd: Tabas, Abid village	Abbasian
33		1894-ALUH	Yazd: 40 km Deyhuk, 1361m	Abbasian

Tab. 1. Continued.

34	<i>C. aspera</i>	5044-ALUH	Fars: 35 km Marvdasht *	Rastipishe
35		1891-ALUH	Yazd: Tabas, Eshqabad road, Kalshane village, 1092 m	Abbasian
36		36394-FUMA	Yazd: SE Tabas, NE Deyhuk, 1700 m	Zanguee & Rafei
37		18917-ALUH	Qazvin: Abyek	Abbasian
38		Anonymus- HSBU	Kerman: Kerman	Sonboli
39	<i>C. dichotoma</i>	1907-ALUH	E Azerbaijan: 48 km NW Marand, salt hills, 1036 m	Akhani & Samadi
40		16313-FUMH	Khorasan: between Quchan and Dargaz, Allah Akbar ghaut, 1650 m	Joharchi & Zanguee
41		24743-FUMH	Khorasan: Bshrouyeh road, 1400 m	Rafei & Zanguee
42		26738-FUMH	Khorasan: SE Birjand, 1650 m	Rafei & Zanguee
43		Anonymus- FUMH	Khorasan: Birjand to Tabas, 1150 m	Anonymus
44		10076-FUMH	Khorasan: Birjand to Sarchah road, 1400 m	Anonymus
45		16609-FUMH	Khorasan: SW Bojnurd, 1050 m	Joharchi & Zanguee
46		17287-FUMH	Khorasan: E Birjand, Gzyk mountains, 1400-1500 m	Joharchi & Zanguee
47		13743-FUMH	Khorasan: Ferdows, Boshrouye	Ayatollahi & Joharchi
48		21809-FUMH	Khorasan: Birjand, Hamand, Give road, 1400 m.	Faghihinia & Zanguee
49		15109-FUMH	Khorasan: Birjand, 8 km after Hamand, 1300-1350 m *	Rashed & Zanguee
50	<i>C. lappacea</i>	Anonymus- HSBU	n.a.	Anonymus
51		36-HSBU	Kermanshah: Songhor, Asadabad, 1650 m	Zehzad
52		87410-HSBU	Isfahan: between Shahreza and Vanak, 2300 m	Khosravi
53		87532-HSBU	Chahar Mahal Va Bakhtiari: between Kharadgee and Gandoman, Pare Das mountain, 2150-2300 m *	Zehzad
54		Anonymus- FARH	Kordestan: Sanandaj *	Anonymus
55		18814-FARH	Iran: Anaran mountain, Ghooch Ali *	Anonymus
56		18905-FARH	Isfahan: Faridan *	Bagheri
57		18904-FARH	Kermanshah	Hassan pour
58		18906-FARH	W. Azerbaijan: Takab *	Anonymus
59		11089-FARH	Hamadan: Tuyserkhan	Haj Mohamad Sameii
60		1901-ALUH	Lorestan: Malayer-Borujerd road, 60 km to Borujerd	Abbasian
61		1902-ALUH	Kermanshah: Bid Sorkh gauth	Abbasian
62		74413-HSBU	E Azarbajjan: between Tabriz and Marand	Zehzad
63		8624402-HSBU	Chahar Mahal Va Bakhtiari: between Gandoman and Ardal, south hills of pond Shaloo, 2350-2450 m	Zehzad

Tab. 2. Qualitative macro- and micromorphological features used in this study.

Characters	State of character and coding
Vegetative form	ascending (0), erect and un-branched (1), branched at base (2), ascending with few branches (3), ascending or erect and bifurcate branches (4)
Fruit shape	ovate (0), elliptic (1), round (2), elliptic-ovate (3)
Seed shape	oblong (0), elliptic (1), elliptic-ovate (2)
Petal shape	connate (0), oblong (1), oblong-connate (2)
Hair in fruit disc	absent (0), present (1)
Hair in fruit margin	absent (0), present (1)
Pedicle shape	curved (0), recurved sharply down (1), S-shaped (2), umbrella handle like (3)
Leaf shape	elliptic and flat (1), oblanceolate-linear (2), oblanceolate and flat-elliptic (3)
Hair shape	cylindrical (0), conical (1)
Anthers shape	non-elliptic (0), elliptic (1)
Petal base protruding	present (0), absent (1)
Protruding at the end of filament and its wing	present (0), absent (1)
Fruit margin	smooth (0), crenate (1), serrate (2)
Different tissues in fruit margin	absent (0), present (1)
Fruit hair surface	without furrows (0), horizontally furrowed(1)
Fruit hair surface	tuberculate (1), hispid (2)
Hair apex	rounded (1), swollen (2), branched (3)
Trichome surface ornamentation	non-verucate (0), verucate (1)
Trichome shape	columnar (1), pyramidal (2), infundibular (3)
Trichome tapering	gradually (1), suddenly (2)
Trichome	without net-like structure (0), with net-like structure (1)
Fruit ornamentation	smooth with button shaped particles (0), with cone shaped protruding (1), tuberculate (2), papillat with irregular pattern (3), small tubercules (4), amorphous and branched (5)
Fruit surface	with deep holes(0), net-like (1), lineolate (2)
Seed surface reticulation	regular (1), irregular (2)
Seed surface	domate (0), net like (1), stripped (2), lineolate (3)

stamens are winged and wings are terminated to a lobed or acute tip. In some individuals, the stamens with two wings can be seen. Anthers are medifix in *C. aspera*, *C. jonthlaspi* and *C. dichotoma*. In *C. lappacea*, at the margin of tip of filament and wings, there are sinuate protrudings (Fig. 2 G). Length of filament and wing of stamen are valuable traits in species delimitation. Some populations of *C. jonthlaspi* showed different combination of flowers (with unusual structures or with both high density of hair and unusual structures) (Fig. 1 C).

Micromorphological studies

Fruit and seed surface were studied. Fruit and seed sculpture pattern and fruit hairs showed a great variation in *C. jonthlaspi* and *C. lappacea*.

The surface of fruit in *C. jonthlaspi* haired on both part of fruits, covered with papilla smaller than hairs, and a net-like sculptured, but in fruits with marginal hairs, surface of fruit have lineolate sculpturing pattern. In *C. aspera*, surface of fruit covered with cone-shaped protrudings which are branched at tip. The shape of these protrudings and fruit sculpturing

Tab. 3. Quantitative macro- and micromorphological features used in this study.

Characters	Characters
Leaf length	Seed length
Leaf width	Seed width
Petal length	Fruit length
Petal width	Fruit width
Sepal length	Length of style
Sepal width	Average length of fruit hair
Length of pedicle	Length of Fruit to seed ratio
Length of inflorescence	Length of longest filament/length of same anther
Length of stamen	Fruit/fruit hair length ratio
Width of fruit/length of hair	Sepal/petal length ratio
Length of fruit margin	Fruit to style length ratio
Length of pedicle/length of fruit	Fruit to seed length ratio

vary among studied populations (Fig. 3). The surface of *C. dichotoma* covered with papillate hairs which are smaller than fruit hairs. In most studied populations of *C. lappacea*, the surface of fruit is covered with branched protrudings, the form of them are different among populations. In Kurdistan population, surface of fruit is stripped and have button-shaped protrudings that scattered irregularly, while vacuolar pattern in Faridan and Paredas populations were observed (Fig. 3). In Azerbaijan population, the fruit is covered with net-like sculptures. In other populations, surface of fruit have stripe or smooth sculpture pattern as in Ilam, Kermanshah, Gandoman, and Faridan (Fig. 3).

Trichome surface has button-shaped ornamentation in *C. jonthlaspi* and *C. dichotoma* but barbed-shaped in *C. aspera* (Fig. 4) and *C. lappacea*. There was an infudibular-shaped hair base in Faridan accession or the gradually narrowing at the tip of hairs (Fig. 4).

Seed surface sculpturing is mostly reticulate but three other types were observed too: domate (*C. dichotoma*), lineolate (in *C. jonthlaspi* with marginal hair at fruit), or net-like pattern (in *C. lappacea*) from Azerbaijan (Fig. 4). Other populations of *C. lappacea*, *C. aspera* and *C. jonthlaspi* have reticulate sculpture (Fig. 4).

A variation in **hair density** was observed while studying leaf dorsal epidermis. The hairs have button-shaped sculptures (Fig. 5 A-C).

In *C. dichotoma* sculptures are not prominent and hairs are more slender (Fig. 5 D). In some studied populations of *C. lappacea*, tip of hairs is curved (Fig. 5 E).

It was evident that the lower and upper **epidermis of petal** is different. In all examined samples, the sculpture of lower epidermis is stripy and these lines are parallel and margin of cells are wavy (Fig. 5 F), but in upper epidermis of four studied species there are differences (Fig. 5 G-J).

Interspecific variation based on macro-morphological characters

The studied species showed significant differences in selected set of characters. The Ward's phenogram based on morphological features showed that there are two main clusters (Fig. 6).

The first cluster consists of *C. jonthlaspi*, *C. aspera* and *C. dichotoma*. In second cluster *C. lappacea* is grouped. In order to determine the most variable characters among the studied species, factor analysis based on PCA was performed, revealing that the first three factors comprise more than 70% of total observed variation. In the first factor, with more than 50% of the total variation, characters as petal length and width, sepal length and width, filament length and width of all stamens wing, length of pedicle, length of anther, length of style, presence

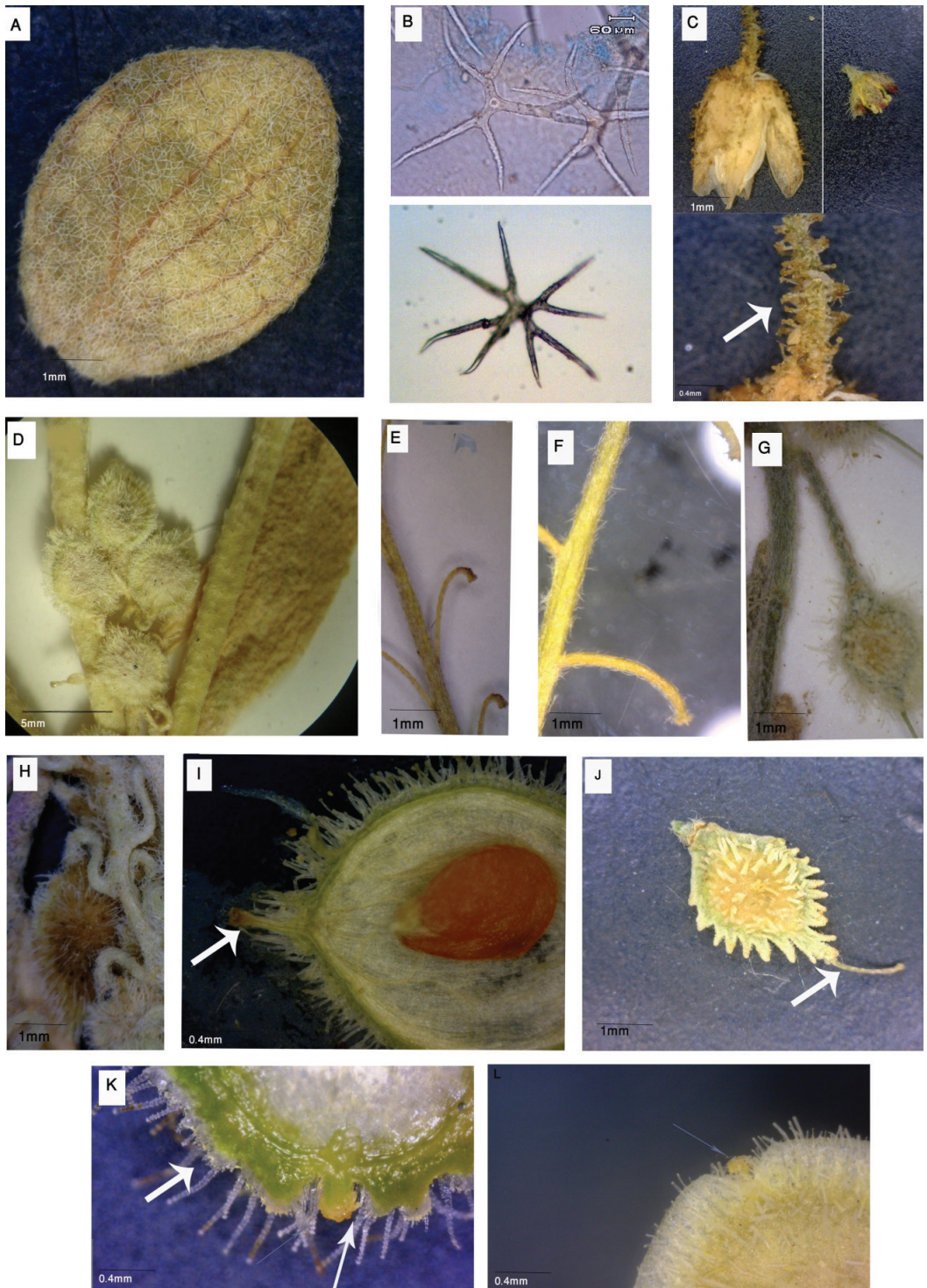


Fig. 1. A – leaf of *Clypeola dichotoma*; B – trichome with four main branches at down and three at upper part; C – abnormal (left) and normal (right) flowers of *C. jonthlaspi*; D – inflorescence of *C. dichotoma*, E – pedicle of *C. jonthlaspi*; F – pedicle of *C. aspera*; G – pedicle of *C. lappacea*; H – pedicle of *C. dichotoma*; I – style of *C. dichotoma*; J – style in *C. lappacea*; K – style and crenate shape of fruit margin in *C. aspera*; L – style in *C. jonthlaspi*.

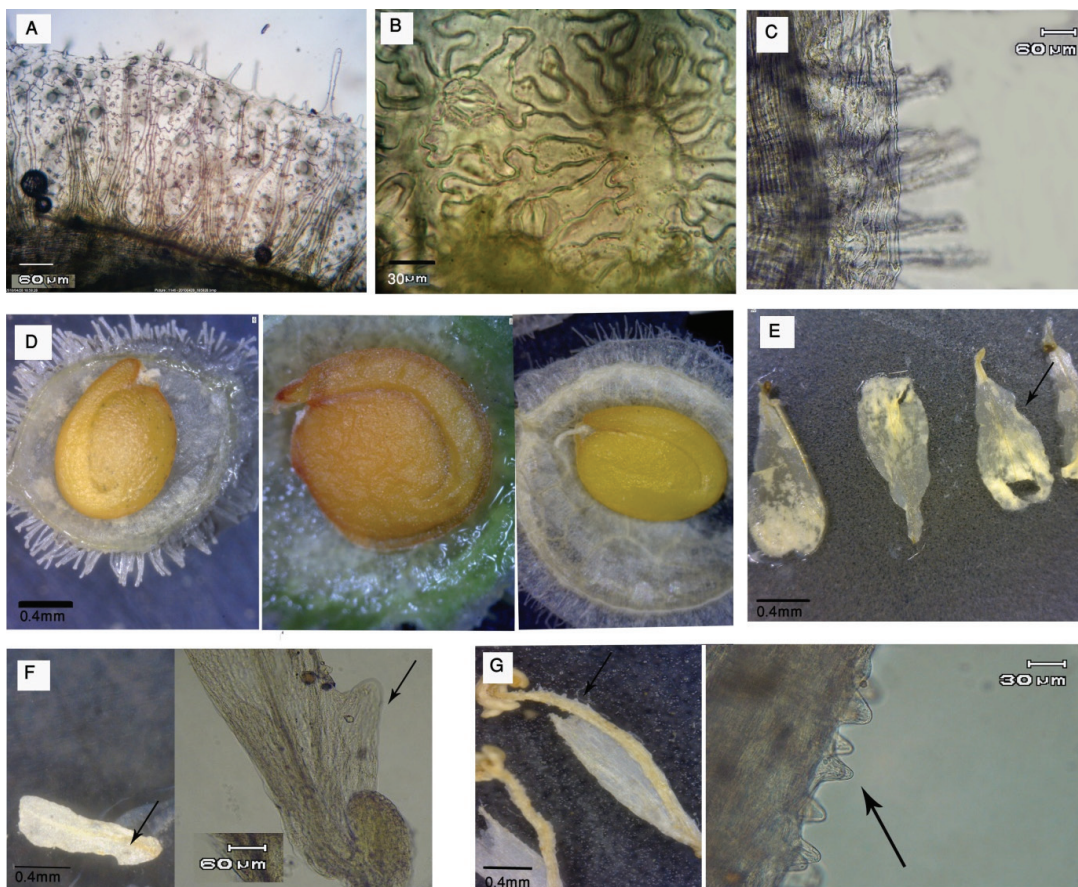


Fig. 2. Fruit margin in *Clypeola jonthlaspi* (A), *C. aspera* (B) and *C. dichotoma* (C); D – mature fruits; E – emargination in lower part of petal of *C. lappacea*; F – protruding in basal petal of *C. dichotoma*; G – protruding in tip of filament and wing of stamen of *C. lappacea*.

of different tissue at fruit margin, presence of protruding in filament and wing margin of stamens, shape of leaf and anther had highest correlation (>0.6). In the second factor, with about 11.53% of the total variation, characters as the height of plant, width of leaf, length of inflorescence, presence of protruding in base of petal and number of leaf veins had highest correlation (>0.6). In the third factor with about 9.44% of the total variation, characters as length of fruit trichomes, ratio of fruit length to seed length, ratio of length of filament to anther length and shape of fruit margin had highest correlation (>0.6). Therefore, these are the most

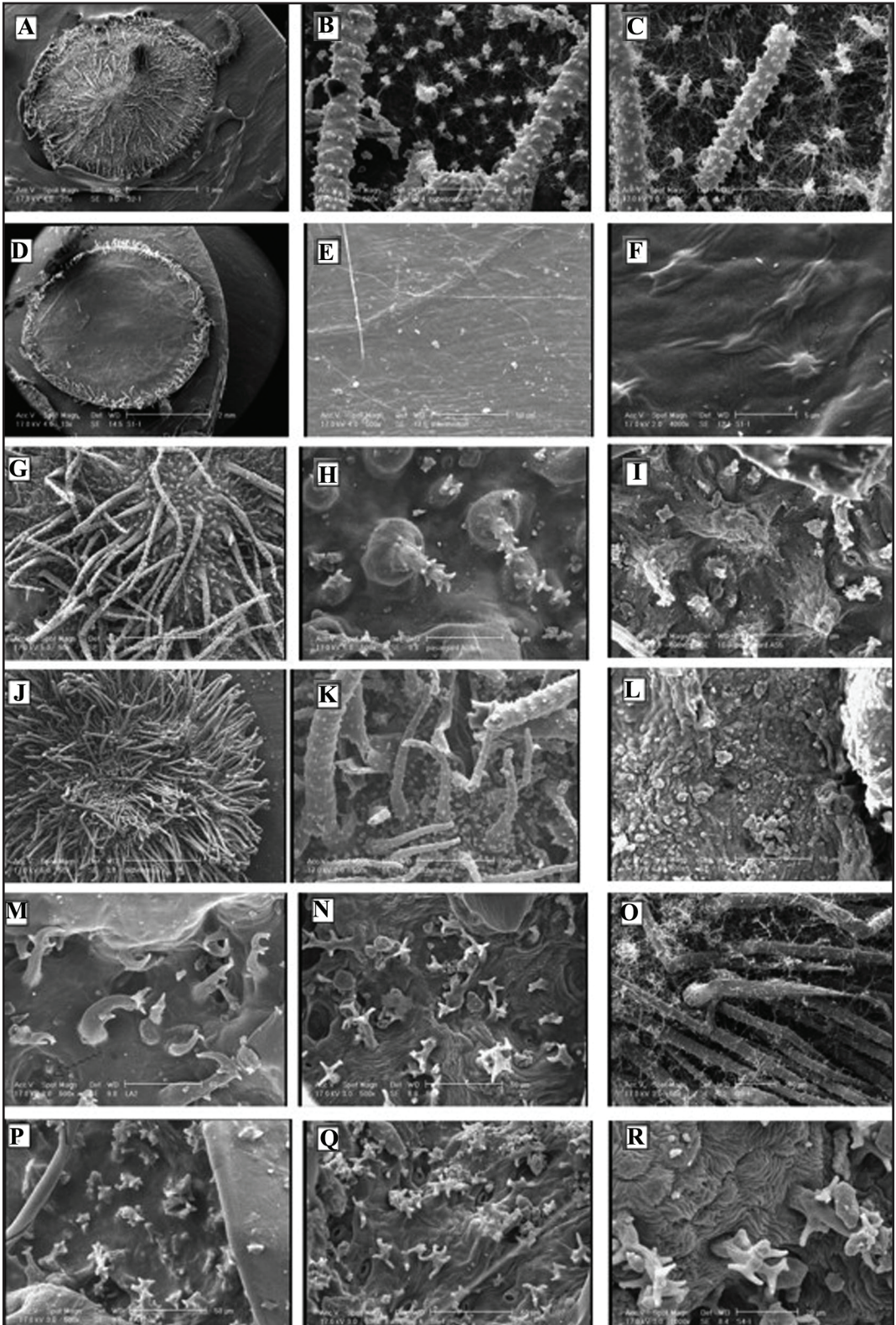
variable morphological characters among the studied characters of studied *Clypeola* species.

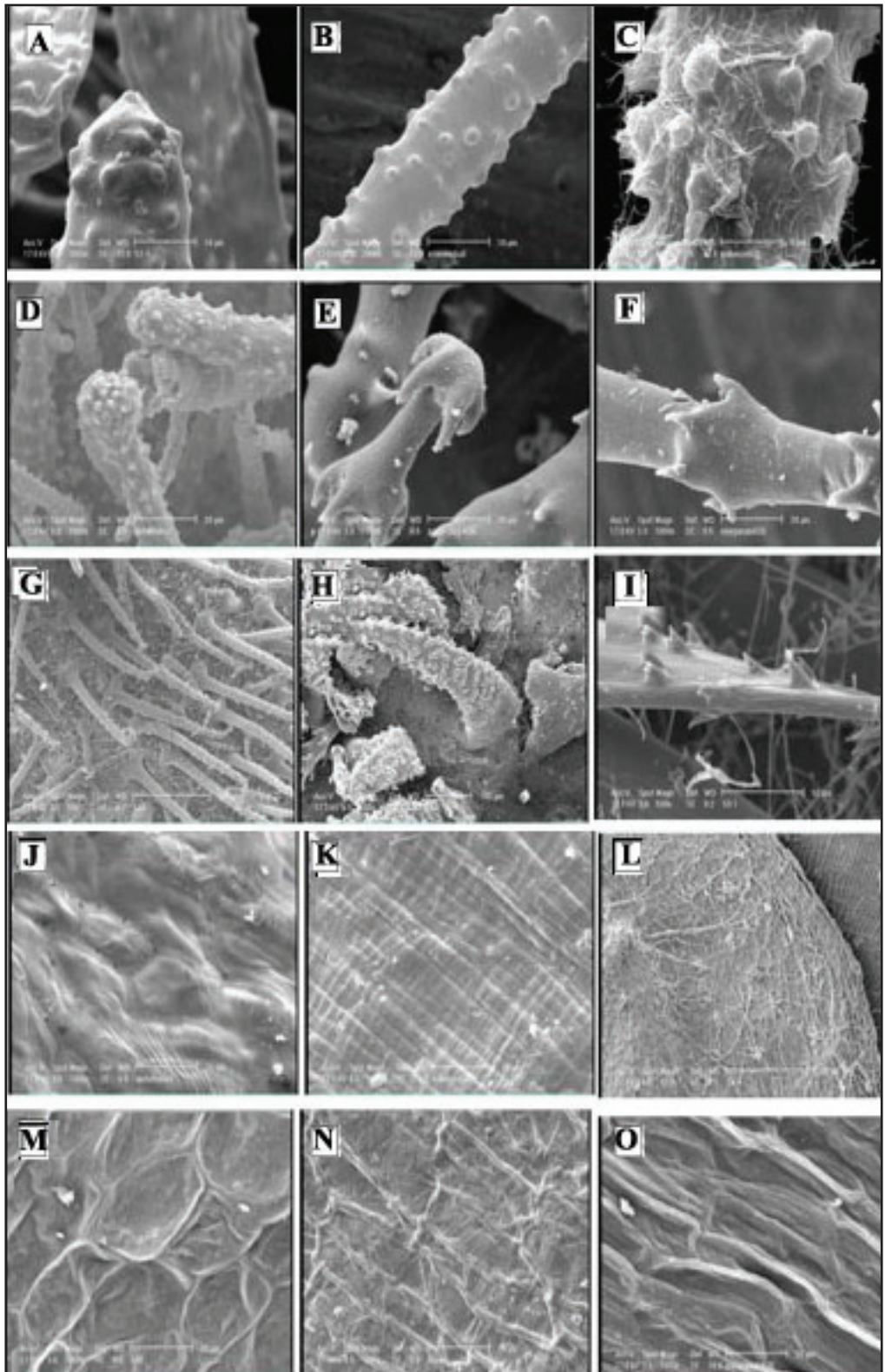
Interspecific variation based on micromorphological characters of seed and fruit

In order to group the species having micromorphological similarities, cluster analysis using Ward's method was performed (Fig. 7). It has revealed two main clusters (Nrs 1 & 2).

In cluster Nr. 1, *C. jonthlaspi*, *C. dichotoma* and one population from *C. lappacea* are grouped. There are two subsets in this cluster, one of which contains populations from Kalshane and Karaj belonging to *C. jonthlaspi*.

Fig. 3. Seed and fruit surface in *Clypeola jonthlaspi* (A-F), *C. aspera* (G-I), *C. dichotoma* (J-K), and *C. lappacea* from different populations (L-R). L – Kordestan; M – Faridan; N – Paredas; O – Azerbaijan; P – Isfahan; Q-R – Kermanshah.





In these populations, trichomes of fruit can be seen only at margin of fruit. In A cluster populations of Karaj, Qazvin and Mashhad-Kalat of *C. jonthlaspi* are grouped. These taxa have fruit hairs in both parts. Presumably, the

reason for grouping population of Azerbaijan from *C. lappacea*, in this subset, is the presence of net like sculpture on the surface of fruit (Fig. 3), which can be seen in populations of *C. jonthlaspi* (Fig. 3 A). Cluster Nr. 2 contains

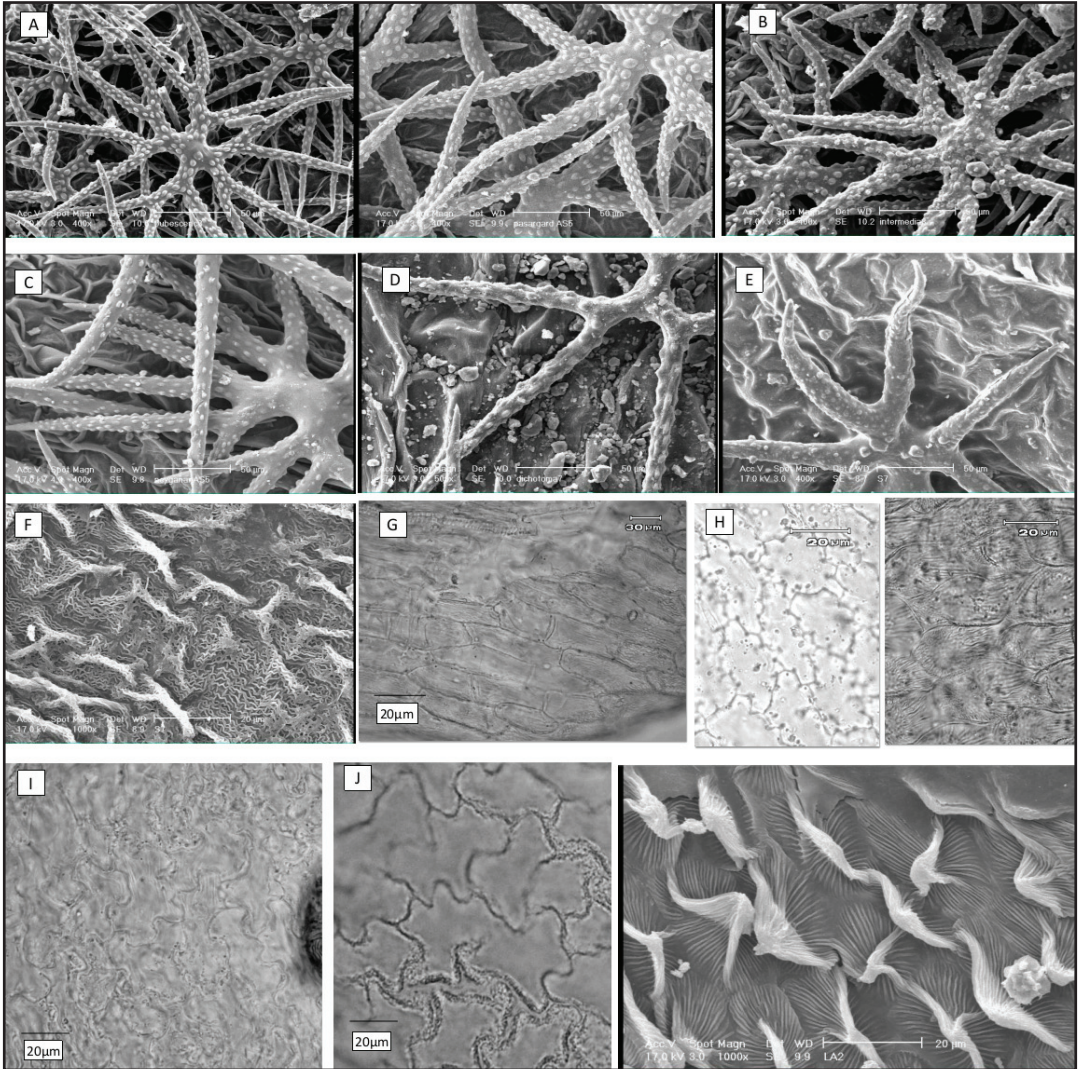


Fig. 5. Leaf and petal surface. **A-E** – leaf hairs; **A** – hair with protruding that are larger in center; **B** – hair with equal protruding in all parts; **C** – hairs without protruding in center; **D** – hair of *C. dichotoma*; **E** – hair with curvature in tip in *C. lappacea*; **F** – dorsal petal epidermis in *C. lappacea*; **G-J** – petal ventral epidermis in *C. jonthlaspi* (**G**), *C. aspera* (**H**), *C. dichotoma* (**I**), and *C. lappacea* (**J**).

- ◀ **Fig. 4.** Fruit and seed surface. **A-I** – fruit surface. **A-C** – rounded trichome tip and button shaped sculptures in *Clypeola jonthlaspi*; **D** – swollen trichome tip in *C. dichotoma*; **E-F** – branched tip and barbed sculptures in *C. aspera*; **G** – infundibular-shaped trichomes in *C. lappacea*; **H** – narrowed gradually trichomes in *C. lappacea*; **I** – sharpening tip in *C. lappacea*. **J-O** – seed surface sculptures. **J** – domate in *C. dichotoma*; **K** – lineolate in *C. jonthlaspi*; **L** – net-like in *C. lappacea*; **M** – reticulate in *C. aspera*; **N** – reticulate in *C. lappacea*; **O** – reticulate in *C. jonthlaspi*.

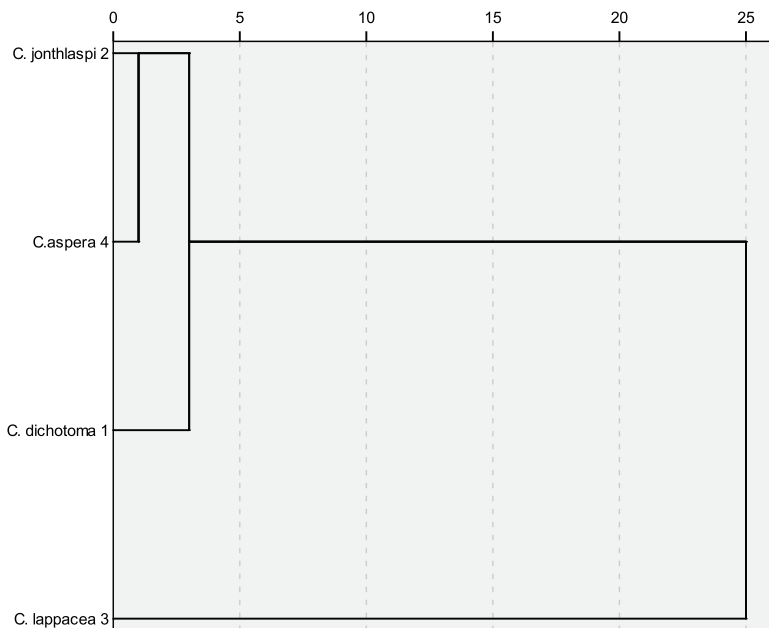


Fig. 6. Phenogram (Ward's method) based on macromorphological characters in four annual *Clypeola* species.

populations of *C. lappacea* and *C. aspera*. In F cluster populations of *C. aspera* are clearly separated. The arrangement of *C. lappacea* and *C. jonthlaspi* populations in dendrogram are modified for macro- and micromorphology with pollen morphology results. In order to determine the most variable characters among the studied species, a factor analysis based on PCA was performed, revealing that the first three factors comprise about 61% of total variation. In the first factor with about 31% of the total variation showed the highest correlation ($>0,6$). Second and third factor with about 16% and 15% of the total variation respectively showed the highest correlation.

Discussion

By considering of different populations of *Clypeola* species in Iran in present study it was evident that, some morphological characters as pedicle shape, shape of fruit hair, shape of fruit margin, characters of stamen, shape of style and petals are efficient in species separation. A number of authors (ABDEL KHALIK 2002; TANTAWY *et al.* 2004; EL NAGGAR 2005;

MOAZZENI *et al.* 2007; KASEM *et al.* 2011) demonstrated that seed surface features are valuable in separating species regarding anticlinal and periclinal walls. In this study we demonstrated that the use of seed surface character is not efficient when used alone, but it was also shown that some subspecies of *C. jonthlaspi* could be separated by these features. The diagnostic importance of fruit characters in present study is in concordant with KAYA *et al.* (2011).

Some micromorphological leaf features as hair position, branch number and diameter are effective in species separation. ROLLINS & BANEJEE (1976) mentioned the importance of same features while studying *Lesquerella* species. It is believed that in dry condition, hairs are denser than humid condition because of adaptive behavior of plants. Results of these study is somewhat in congruent with this idea, as in *C. aspera* and *C. jonthlaspi* and *C. lappacea* (Faridan) from drier location than Ilam and Bakhteeyari belonging to *C. lappacea* have a higher hair density. *C. dichotoma* (Birjand population) which grow in dry location, the hair density is low. Trichomes with curvature

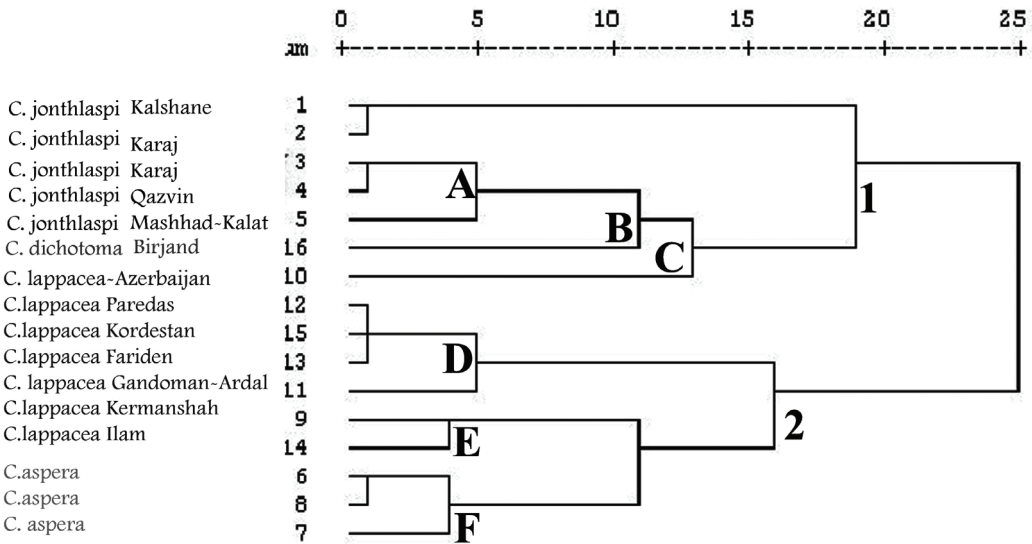


Fig. 7. Phenogram (Ward's method) based on seed and fruit micromorphological characters in four annual *Clypeola* species.

at their tips were observed in populations of Gandoman, Ardal and Ilam of *C. lappacea*.

Fruit micromorphological features especially fruit hairs have diagnostic role in species delimitation but leaf and seed characters are used as complementary. Due to the vast variation which was observed in *C. jonthlaspi* and *C. lappacea* populations, the result of micromorphological studies can be helpful to separate these species as it was evident in palynological study of same genus (KESHAVARZI *et al.* 2012).

Acknowledgments

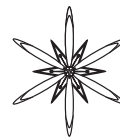
We are very thankful of the support of Mr. Jouharchi (FUMH), Mrs. Tavakoli (FARH) and Dr. Mehrabian (HSBU) to make the possibility to observed more herbarium samples.

References

ABDEL KHALIK K.E. 2002. Biosystematic studies on Brassicaceae (Cruciferae) in Egypt. Ph.D Thesis, University of Wageningen.
 AL-SHEHBAZ I.A., BEILSTEIN M.A., KELLOGG E.A. 2006. Systematic and phylogeny of the Brassicaceae (Cruciferae): An overview. *Pl. Syst. Evol.* 259: 89–120.

ANCEV M., GORANOVA V. 2006. Trichome morphology of eleven genera of the tribe Alysseae (Brassicaceae) occurring in Bulgaria. *Willdenowia* 36: 193–204.
 BOLOURIAN S., PAKRAVAN M. 2011. A morphometric study of the annual species of *Alyssum* (Brassicaceae) in Iran based on their macro- and micromorphological characters. *Phytologia Balcanica* 17 (3): 283–289.
 BREISTROFFER M. 1936. Révision systématique des variations du *Clypeola jonthlaspi* L. *Candollea* 7: 140–166.
 CHAYTOR D.A., TURRILL W.B. 1935. The genus *Clypeola* and its intra-specific variation. *Bull. Misc. Inform., Addit. Ser. I*: 1–23.
 EL NAGGAR S.M.I. 2005. Seed microsculpturing and systematic of the Egyptian Brassicaceae (Magnoliopsida). *Fl. Medit.* 15: 581–598.
 FRANZKE A., LYSAK M.A., AL-SHEHBAZ A. I., KOCH M.A., MUMMENHOFF K. 2010. Cabbage family affairs: the evolutionary history of Brassicaceae. *Trends Plant Sci.* 17 (1): 1–9.
 KASEM W.T, GHAREEB A., MARWA E. 2011. Seed morphology and seed coat sculpturing of 32 taxa of family Brassicaceae. *J. Am. Sci.* 7 (2): 166–178.
 KESHAVARZI M., ABBASIAN S., SHEIDAI M. 2012. Pollen morphology of the genus *Clypeola* (Brassicaceae) in Iran. *Phytologia Balcanica* 18 (1): 17–24.
 KAYA A., ÜNAL M., ÖZGÖKÇE F., DOĞAN B., MARTIN E. 2011. Fruit and seed morphology of six species previously placed in *Malcolmia* (brassicaceae) in Turkey and their taxonomic value. *Turk. J. Bot.* 35: 653–662.

- MOAZZENI H., ZARRE S.H., AL-SHEHBAZ I.A., MUMMENHOFF K.L. 2007.** Seed coat micro-sculpturing and its systematic application in *Isatis* (Brassicaceae) and allied genera in Iran. *Flora* **202**: 447–454.
- MUMENHOFF K., FRANZKE A., KOCH M. 1997.** Molecular data reveal convergence in fruit characters used in the classification of *Thlaspi* s.l. (Brassicaceae). *Bot. J. Linn. Soc.* **125**: 183–199.
- NG N.Q., CHANG T.T., WILLIAMS J.T., HAWKES J.G. 1981.** Morphological studies of Asian rice and its related wild species and recognition of a new Australian taxon. *Biol. J. Linn. Soc.* **16**: 303–313.
- RECHINGER K.H. 1968.** *Clypeola* L. In: RECHINGER K.H. (ed.), *Flora Iranica*. **57**: 170–171. Graz.
- ROLLINS R.C., BANERJEE U.C. 1976.** Trichomes in studies of the Crucifera. In: VAUGHAN J.G., MACLEOD A.J., JONES B.M.G. (eds), *The biology and chemistry of the Crucifera*: 143–166. Academic press. London, New York, San Francisco.
- TANTAWY M.E., KHALIFA S.F., HASSAN S.A., AL-RABIAI T. 2004.** Seed exomorphic characters of some Brassicaceae (LM and SEM study). *Int. J. Agricult. Biol.* **5**: 821–830.



POLLEN MORPHOLOGY OF SOME GERANIUM SUBGENUS ROBERTIUM SPECIES OF IRAN

M. KESHAVARZI *, M. BEHZADIFAR, Z. NAZEM BOKAEI

Abstract. *Geranium* (Geraniaceae) comprises more than 23 annual or perennial species in Iran. There is no study in Iran with pollen morphology emphasize. The main aim of this study is to find diagnostic pollen characters in studied species. Totally 40 accessions of five species (*G. albanum*, *G. molle*, *G. purpureum*, *G. mascatense* and *G. pusillum*) were collected. Pollen grains were studied by use of light and Scanning electron microscopy. To reveal the species relationships different multivariate statistical methods were used. The pollen grains were monad, isopolar, radially symmetric and of spheroid, prolate-spheroid or oblate-spheroid classes. The main ornamentation type was clavate, however reticulate but striate was also observed. All sections are clearly separated by their pollen features except of *Batrachioidea* which show confusion with *Ruberta*. Species relationship is discussed.

Key words: *Geranium*, *Robertium*, pollen morphology, Iran

Plant Science Dept., Faculty of Biological Science, Alzahra University; * neshat112000@yahoo.com, M.keshavarzi@alzahra.ac.ir

Introduction

Geranium L. (Geraniaceae) comprises 423 species in the world which are grouped in 3 subgenera and 18 sections (AEDO *et al.* 1998). This genus contains more than 23 species in Iran. These are annual or perennial plants of different habitats in Iran (SCHONBECK-TEMESY 1970).

YEO (1984) was the first who divided *Geranium* into three subgenera based on fruit discharge mechanism. In seed ejection type which is in concordance with subgenus *Geranium*, a single seed is actively discharged by the explosive recurvature of the awn, which remains together with the mericarp attached to the columella. The carpel projection type which is observed in subgenus *Robertium* (Picard) Rouy differs, the whole mericarp containing the seed is dispersed and awn remains with columella (AEDO *et al.* 1998). The fruit discharge method in subgenus *Erodioidea* (Picard) Yeo is identified as "Erodium-type". In this case the mericarp, including the coiled awn, is propelled over a short distance.

In *Geranium* subgen. *Robertium* there are 8 sections and totally 30 species in the world. Pollen grains of 35 Asian *Geranium* species were previously studied by PARK &

KIM (1997). They used light microscopy and scanning electron microscopy to evaluate the classification and phylogenetic aspects of studied taxa. They found high variation in pollen size and exine sculpture.

Geraniaceae is a eurypalynous family which pollen grains for the first time have been studied by BORTENSCHLAGER (1967). Later VERHOEVEN & VENTER (1986), STAFFORD & BLACKMORE (1991), PERVEEN & GAISER (1999), and SHEHATA (2008) had studied pollen grains of different taxa in this family. SHEHATA (2008) pointed to different exine sculpture as reticulate-striate, gemmate-reticulate and reticulate in Geraniaceae. He believed that these features are of diagnostic importance.

In subg. *Geranium*, pollens are larger than in subg. *Robertium* and *muri* are more elaborated with fine lumens which strengthen the probability of reverse evolution in Asian elements of *Geranium*. There is no record of palynological study of *Geranium* species in Iran. The main aim of present study is to use the pollen grains features as a source of diagnostic characters to distinguish different *Geranium* species of subgenus *Robertium*.

Material and methods

The material used for this study was collected from wild populations and herbarium specimens (Tab. 1). The observations were made with an Olympus DP12 light microscopy, without any pretreatment. The measurements were based on at least 20 pollen grains per population. For SEM studies, the pollen grains suspended in a drop of water were directly transferred by a fine pipette to a metallic stub using double sided cello tape and then coated with gold in a sputtering chamber (Sputter Coater BAL-TEC, SCDOOS). Coating with gold by the physical vapor deposition method (PVD) was restricted to 100 Å. The SEM examination was carried out on a TESCAN microscope. The terminology of HESSE *et al.* (2009) for pollen sculptures was followed.

The characters of pollen grains of the studied *Geranium* species are summarized in Tabs 2 & 3. In order to detect significant differences in the studied characters among the various studied species, an analysis of variance (ANOVA) was performed. To reveal the species relationships, we have used cluster analysis and principal component analysis (PCA) (INGROUILLE 1986). For multivariate analysis, the mean of the quantitative characters was used. Qualitative characters were coded as binary or multistate. Variables were standardized for multivariate statistical analysis. Average taxonomic distances and squared Euclidean distances were applied as dissimilarity coefficient in the cluster analysis of pollen data. In order to determine the most variable characters among the studied species, factor analysis based on principal components analysis was performed. SPSS ver. 20 and PAST ver. 2.17c (2013) softwares were used for statistical analysis.

Results

The pollen grains of studied *Geranium* species are monad, isopolar and radially symmetric. They are of spheroid, prolate-spheroid or oblate-spheroid class. Light

micrographs of pollen grains were similar (Fig. 1), therefore scanning electron micrographs were studied to find more differences. All studied taxa were tricolporate. The colpi were short and linear. The basic ornamentation of the studied *Geranium* species was clavate-reticulate or baculate-reticulate, but striate ornamentation was also observed (Figs 2 & 3).

G. albanum showed two parted wart-like sculptures while *G. mascatense* showed very different exine sculpture in studied taxa with striate type of ornamentations.

In order to define the diagnostic value of pollen grains in species delimitations in studied *Geranium* species, cluster analysis by Ward's method were performed on the base of 14 qualitative and quantitative features (Fig. 4). As studied species represent each of the sections, it is evident in cluster pattern that all sections are clearly separated except *Batrachioidea* which show confusion with *Ruberta*. *G. mascatense* and *G. albanum* comprise a separate cluster with more similarity in their pollen features.

Factor analysis revealed that there were three factors provided more than 78% of total observed variation in studied pollen grains. Studying the component matrix for each factors it was evident that colpus length and equatorial shape are most important features in the first factor and aperture orientation, while homogeneity of pollen sculpture and exine thickness – in the second factor. In the third factor only equatorial length is responsible for more than 19% of observed variation. PCO based on qualitative and quantitative features of pollen grains (Fig. 5) confirms the results of cluster analysis by Ward's method.

Discussion

Analysis has shown that *G. albanum* had the largest, while *G. molle* had the smallest pollen grains (Tab. 3). Although DENIZ *et al.* (2013) believed that there was no significant difference between the sections in terms of pollen grains, but studied species of present

Tab. 1. Vouchers of *Geranium* species used in this study. Vouchers are deposited at Herbarium of Alzahra University.

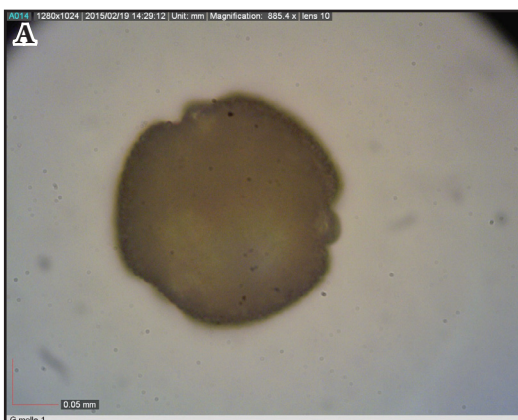
Section	Species	Voucher specimen		
<i>Batrachioidea</i> W.D.J.	<i>G. molle</i> L.	1. Mazandaran: Chalous, Shariatabad Village, Nataj 350AUH		
		2. Tehran: Damavand to Roudehen, Veskareh Village, Ghasemian 352AUH		
		3. Mazandaran: Sari to Ghaemshahr, Seydi 353AUH		
		4. Golestan: Gorgan, Naharkhoran Jungle, Soleimani 354AUH		
		5. Mazandaran: Ghaemshahr, Fasahat & Rezaii 355AUH		
		6. Guilan: Saravan Forest, Mohamadjani, 356 AUH		
		7. Mazandaran: Babolsar, Sari road km 5, Rezapour 357AUH		
		8. Mazandaran: Kelardasht, Bayat 258AUH		
		9. Golestan: Gorgan, Motalebi 359AUH		
		10. Khuzestan:Dezfuol, Near Dez river, Bagheri 360AUH		
		11. Mazandaran: Ghaemshahr, Jamshidi 361AUH		
		12. Guilan: Lahijan district, Pedram 362AUH		
		13. Mazandaran: Ghaemshahr, Talar Forest, Cheniani 363AUH		
		14. Mazandaran: Babolsar, Sari to Babolsar road, km 5, Rezapour 364AUH		
		15. Mazandaran: Amol, Siahbishe Forest, Behzadifar & Pourabdollah 365AUH		
		16. Guilan: Astara, Heyran, Sayadlar, Behzadifar & Pourabdollah 366AUH		
<i>G. pusillum</i> L.		17. Mazandaran: Javaherdeh, Mosaferi 367AUH		
		18. Guilan: Jirandeh, Keshavarzi 368 AUH		
		19. Guilan: Khalesar, Behzadifar 369 AUH		
<i>Divaricata</i> Rouy	<i>G. albanum</i> M. Bieb.	20. Golestan: Ziarat, Pakravan 370AUH		
		21. Guilan: Masoule, Alebouyeh-ansari 371AUH		
		22. Mazandaran: Amol, Siabishe to Chalous road, Behzadifar & Pourabdollah 373AUH		
		23. Mazandaran: Jirandeh, Keshavarzi 372AUH		
		<i>Trilopha</i> Yeo	<i>G. mascatense</i> Boiss.	24. Fars: Kazeroun, Keshavarzi, 375AUH
				25. Khuzestan: Dezful, Keshavarzi, 376AUH
<i>Ruberta</i> Dumort.	<i>G. purpureum</i> Vill.	26. Guilan: Lahijan District, Pedram 377AUH		
		27. Mazandaran: Ramsar, Javaherdeh, Gholizadeh 378AUH		
		28. Guilan: Langeroud, Mehrvarz 379AUH		
		29. Mazandaran: Ramsar, Tavakoli 380AUH		
		30. Mazandaran: Ramsar, Irani 381AUH		
		31. Mazandaran: Chalous, Shariat abad Village, Nataj 382AUH		
		32. Golestan: Minodasht, Alfajr Village, Habibi 383AUH		
		33. Guilan: Anzali, Mohamadjani 384AUH		
		34. Tehran: Darband, Baghaiipour 385AUH		
		35. Tehran: Darband, Mohamadjani 386AUH		
		36. Tehran: Darband, Keshavarzi 387AUH, 388AUH		
		37. Golestan: Gorgan, Ghorogh forest, Mosaferi 389AUH		
38. Guilan: Baharestan forest, Behzadifar & Pourabdollah 390AUH				
39. Guilan: Gisom forest, Donya jan to Kharmakin, Behzadifar & Pourabdollah 391AUH				
40. Mazandaran: Siahbishe to Chalous, Behzadifar & Pourabdollah 392AUH				

Tab. 2. Studied pollen features in *Geranium* species of Iran.

Characters	Characters
Polar axis length	Exine thickness
Equatorial axis length	Nr of aperture
Apocolporium	Colpi length
Mesocolporium	Pore diameter
Qualitative characters	State of characters
Exine ornamentation type	Clavate-baculate-reticulate = 0, striate = 1
polar outline	Triangular = 0, orbicular = 1
Equatorial outline	Quadrangular = 0, rounded = 1, elliptic = 2
Aperture orientation	At the same level = 0, sunken = 1
Exine homogeneity	Present = 0, absent = 1
Pollen shape	Prolate-spheroid = 0, oblate-spheroid = 1, spheroid = 2

Tab. 3. Evaluated characters of pollen grains in studied *Geranium* species. * – codes are mentioned in Tab. 2.

Character	<i>G. albanum</i>	<i>G. mascatense</i>	<i>G. molle</i>	<i>G. purpureum</i>	<i>G. pusillum</i>
Polar axis	66.13	61.67	51.54	62.02	52.7
Equatorial length	61.6	61.54	48.76	58.85	59.08
Exine thickness	0.002	0.005	0.005	0.004	0.006
Colpus length	41.23	59.68	25.83	18.68	21.76
Pore diameter	16.48	18.47	11.87	7.42	11.02
Apocolpium length	32.185	33.09	33.07	42.85	42.46
Mesocolpium length	34.16	39.04	37.95	38.01	21.31
Ornamentation *	1	2	1	1	1
Homogeneity of pollen sculpture *	1	1	1	1	1
Polar shape *	1	2	2	2	1
Equatorial shape *	1	1	1	2	3
Aperture orientation *	1	2	2	1	1
Pollen shape *	0	2	0	0	1

**Fig. 1.** Light micrographs of pollen grains in studied *Geranium* species: **A** – *G. molle*; **B** – *G. pusillum*.

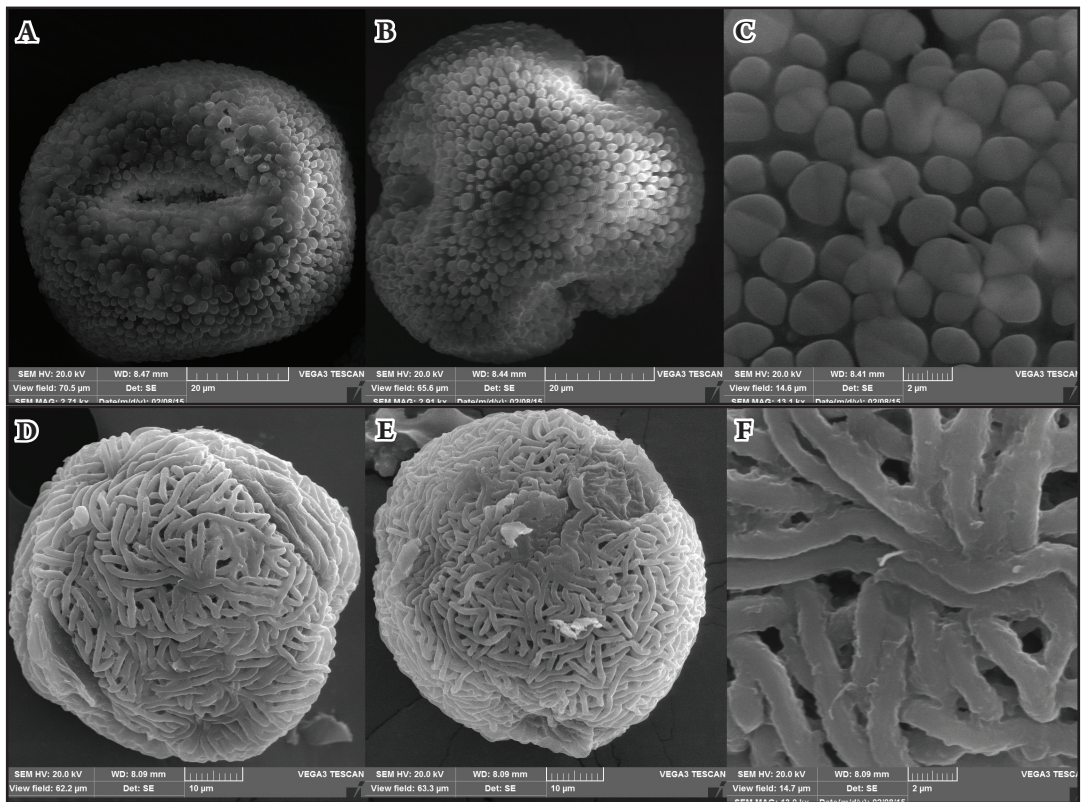


Fig. 2. Pollen micrographs of *Geranium* species: **A-C** – *G. albanum*; **D-F** – *G. mascatense*. **A, D** – equatorial view; **B, E** – polar view; **C, F** – exine sculpture.

project showed that elements of each section are clearly separated by use of selected set of features.

As was pointed by SHEHATA (2008) for the pollen morphology of Geraniaceae family in Egypt, one of different ornamentation types in Geraniaceae is striate and in present study the *G. mascatense* show striate type while others showed clavate-reticulate or baculate-reticulate types. *G. albanum* and *G. molle* showed tectate tectum but other had semitectate one.

DENIZ *et al.* (2013) mentioned spheroidal-subprolate shape for *G. pusillum* while in present study prolate spheroidal shape was observed. SHEHATA (2008) in his studies on pollen morphology of the Geraniaceae identified some types by use of exine ornamentation features viz striate/striate-reticulate, reticulate/gemmate, and

reticulate. He described prolate spheroidal pollen grains in *G. molle* which is in concordant with findings of the present study. Analysis has shown that the pollen grains of all studied *Geranium* species are tricolporate.

Previous study showed that *G. purpureum* is separated from other species morphologically by having glandular hairs in inflorescence with colorless stalks and red glands. *G. albanum* has a discharge mechanism as inoperative but *molle* and *G. pusillum* has an operative one with blue pollen while operative mechanism is accompanied by not carinate calyx is the characteristic of *G. mascatense*. As it is evident in PCO graph species are clearly separated by their pollen features. Further studies are needed to reveal the morphologically similar species.

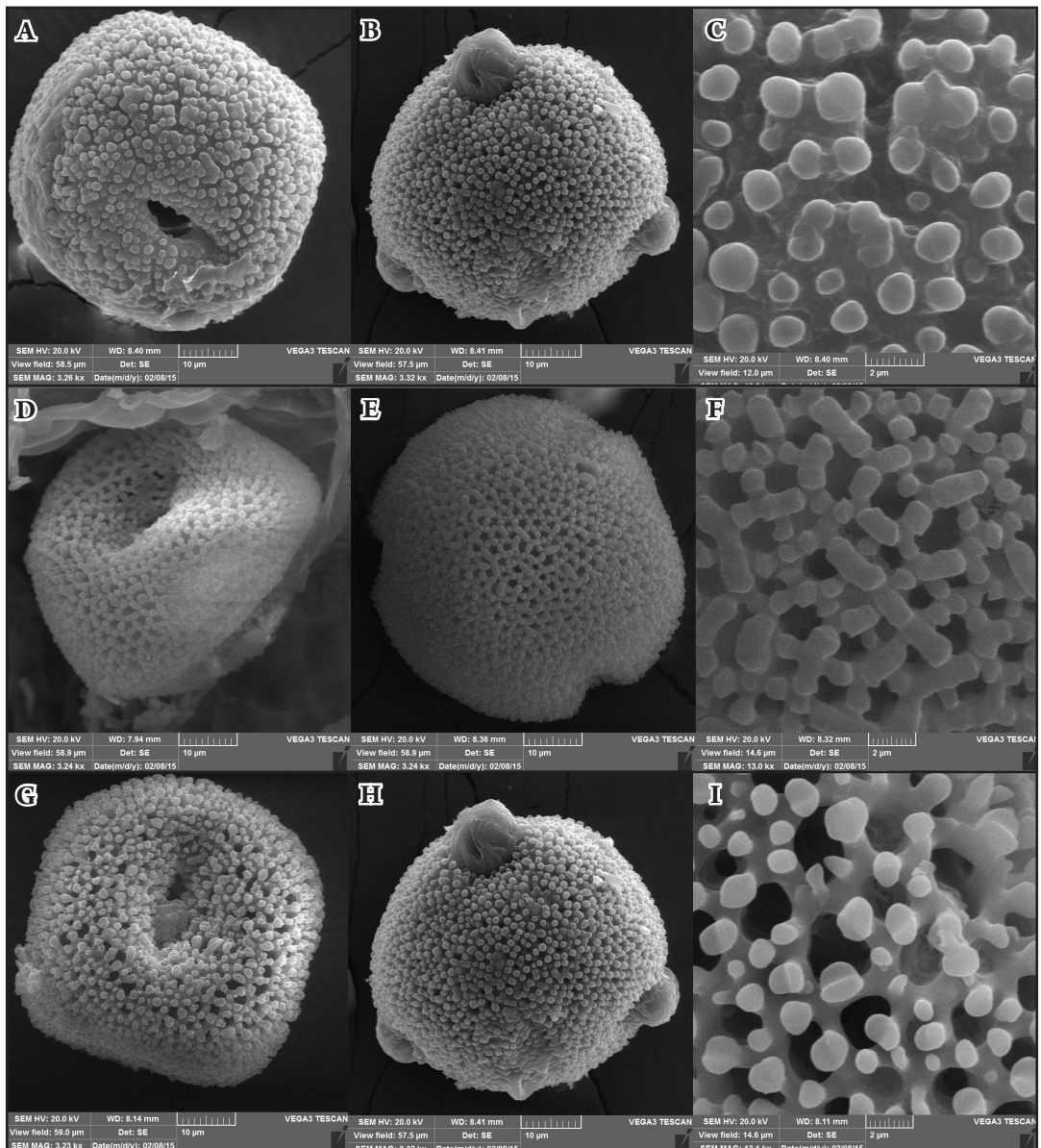


Fig. 3. Pollen micrographs of *Geranium* species: **A-C** – *G. molle*; **D-F** – *G. purpureum*; **G-I** – *G. pusillum*. **A, D, G** – equatorial view; **B, E, H** – polar view; **C, F, I** – exine sculpture.

References

- AEDO C., GARMENDIA F.M., PANDO F. 1998.** World checklist of *Geranium* L. *Anales Jard. Bot. Madrid* **56** (2): 1–42.
- BORTENSCHLAGER S. 1967.** Vorläufige Mitteilungen zur Pollenmorphologie in der Familie der Geraniaceen, und ihre systematische Bedeutung. *Grana Palynol.* **7**: 400–468.
- DENIZ I., ÇIRPICI A., YILDIZ K. 2013.** Palynological study of the *Geranium* (Geraniaceae) species from the Thrace region (Turkey-in-Europe). *Phytologia Balcanica* **19** (3): 347–355.
- HESSE M., HALBRITTER H., ZETTER R., WEBER M. BUCHNER R., FROSCH-RADIVO A., ULRICH S. 2009.** Pollen terminology. An illustrated handbook. Springer, Wein, New York.

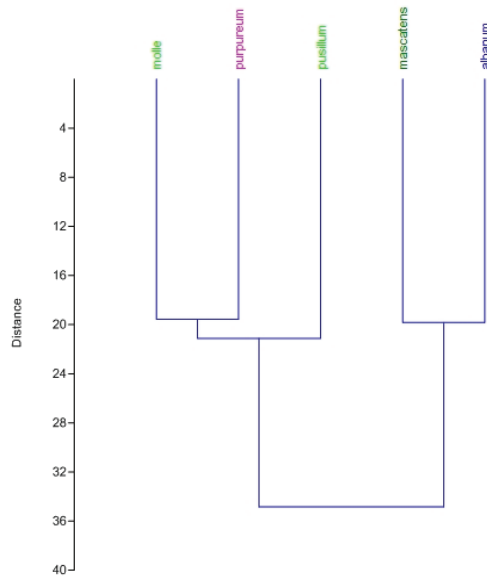


Fig. 4. Cluster analysis (Ward's method) based on pollen features of *Geranium*.

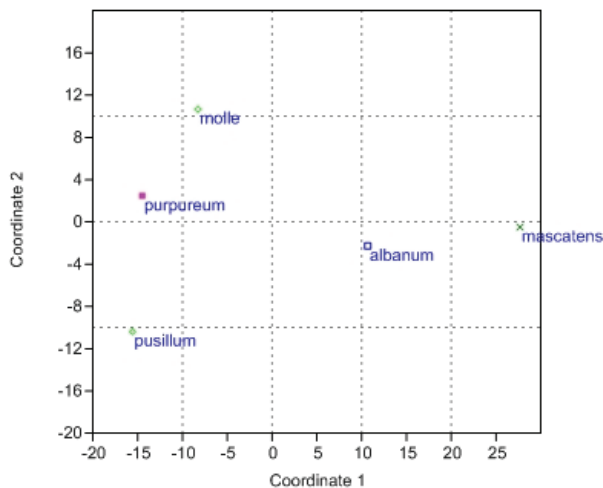
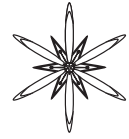


Fig. 5. PCO plot of *Geranium* species based on observed pollen data.

- INGROUILLE M.J. 1986.** The construction of cluster webs in numerical taxonomic investigation. *Taxon* **35**: 541–545.
- PARK S.J., KIM Y.S. 1997.** A palynotaxonomic study of Asian *Geranium* L. *Kor. J. Plant Tax.* **27** (3): 295–315.
- PERVEEN A., GAISER M. 1999.** Pollen flora of Pakistan. XV. Geraniaceae. *Turk. J. Bot.* **23**: 263–269.
- SCHONBECK-TEMESY E. 1970.** Geraniaceae. In: RECHINGER K.H. (ed.), *Flora Iranica* **69**: 30–58.
- SEHATA A.A. 2008.** Pollen morphology of Egyptian Geraniaceae: An assessment of taxonomic value. *Int. J. Bot.* **4** (1): 67–76.
- STAFFORD P.J., BLACKMORE S. 1991.** The Northwest European pollen flora, 46. Geraniaceae. *Rev. Palaeobot. Palyno.* **69**: 49–78.
- VERHOEVEN R.L., VENTER H.J.T. 1986.** Pollen morphology of *Erodium* in South Africa. *S. Afr. J. Bot.* **53** (4): 279–283.
- YEO P.F. 1984.** Fruit discharge type in *Geranium* (Geraniaceae): its use in classification and its evolutionary implications. *Bot. J. Linn. Soc.* **89**: 1–36.



АНАТОМІЧНА БУДОВА СТЕБЛА ТА ПОСУХОСТІЙКІСТЬ *AYLOSTERA FLAVISTYLA*, *MAMMILLARIA BOCASANA* ТА *ECHINOCACTUS GRUSONII*

НАТАЛІЯ В. НУЖИНА* та КАТЕРИНА М. БАГЛАЙ**

Анотація. Досліджено анатомічну будову стебла *Aylostera flavistyla*, *Mammillaria bocasana* та *Echinocactus grusonii*. Виявлено відмінні напрямки пристосування цих рослин до умов з дефіцитом води. Найбільш посухостійкими виявилися рослини виду *E. grusonii*, найменш посухостійкими – рослини виду *M. bocasana*.

Ключові слова: *Aylostera flavistyla*, *Mammillaria bocasana*, *Echinocactus grusonii*, анатомія стебла, посухостійкість

ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, вул. Симона Петлюри, 1, м. Київ, 01032, Україна; * nuzhynan@gmail.com, ** fomin-sad@yandex.ru

Вступ

Загально відомо, що сукуленти (зокрема родини Састасеае) відносяться до посухостійких та спековитривалих рослин, які витримують підвищення температури до +60 °С. У процесі еволюції формувались та закріплювались різні механізми адаптації, за рахунок яких ці рослини ставали більш стійкими до негативних умов середовища (NOBEL 2002). Однак, з одного боку, ступінь посухо- та спекостійкості у різних родів та видів різняться, з іншого боку, рослини підродини Састоїдеае на початкових етапах онтогенезу особливо чутливі до аридних умов існування (ROSAS *et al.* 2012). Незначну кількість робіт присвячено анатомічній будові проростків кактусів та її змінам під дією факторів навколишнього середовища (SMITH *et al.* 1984; AYALA-CORDERO *et al.* 2006; SECORUN & DE SOUZA 2011).

Метою дослідження було виявити зв'язок анатомічної будови представників родини Састасеае з їх посухостійкістю.

Матеріали і методи досліджень

Об'єктами дослідження були види родини Састасеае з колекції Ботанічного саду ім. акад. О.В. Фоміна: *Aylostera flavistyla* F. Ritt., *Mammillaria bocasana* Pos., *Echinocactus*

grusonii Hildm. Два останніх види занесені до Червоного списку МСОП, що ще раз підкреслює необхідність вивчення їх посухостійкості.

M. bocasana – невеликі кущики до 10 см заввишки з кулястими пагонами. З віком рослини утворюють більш-менш щільні дернини. Пагін густо вкритий витягнутими сосочками, які є розвиненими примордіями. Ареоли поділені майже навпіл. Одна, що є власне ареолою, розміщена на верхівці сосочка, де містяться численні щетинисті, м'які бічні колючки й жорсткіші, гачкуваті – центральні. Друга частина ареоли, аксила, розміщена в пазусі сосочка, де утворюються квітки й бічні пагони. Аксили слабо опушені (ANDERSON 2001).

E. grusonii – це поодинокі кулясті рослини, які у природних умовах досягають до 1 м у діаметрі. Стебла з прямими глибокими численними ребрами, на яких в опушених ареолах розміщені прямі, міцні, жовтуваті колючки 3-7 см завдовжки (ANDERSON 2001).

A. flavistyla – приплюснuto-кулясті кущики з великою кількістю пагонів, 4-5 см у діаметрі. Ребер 15-27, поділених на невеликі бугорки. Ареоли продовгасті, жовті, проте з віком вони стають білими. Центральна колючка одна, пряма. Радіальні колючки численні (15-22), жовті, з віком – білі, маленькі, 0,5-1 см завдовжки (ANDERSON 2001).

Для анатомічних досліджень брали медіальні частини стебел однорічних рослин, які вирощували в захищеному ґрунті. Зразки фіксували за методикою Чемберлена (ПАУШЕВА 1988). Заливали в желатин за стандартною методикою (РОМЕЙС 1954) та за допомогою заморожуючого мікротому виготовляли поперечні зрізи товщиною 15-20 мкм. Зрізи фарбували сафраніном (забарвлює лігніфіковані структури), суданом (забарвлює ліпіди), I₂-KI (забарвлює крохмаль). Також проводили мацерацію стебел з метою вивчення структур епідерми. При описі епідерми листової пластинки використовували методики ЗАРІНКАМАР (2007) та ЗАХАРЕВИЧА (1954). Мікроскопічні виміри проводили за допомогою окуляр-мікрометра на мікроскопі XSP-146TR та програми Image J.

Оцінку посухостійкості проводили за методикою ЖАНГА И ТОХТАРЬ (2011).

$$OT = (b - a) / (b - a) \times 100, \text{ де}$$

OT – оводненість тканин, %;

a – маса порожнього б'юкса, г;

b – маса б'юкса з сирію наважкою, г;

v – маса б'юкса з сухою наважкою, г.

$$VD = (M2 - M1) / (M2 - M3) \times 100, \text{ де}$$

VD – водний дефіцит, %;

M1 – маса стебел до 24-годинного насичення, г;

M2 – маса стебел після 24-годинного насичення, г;

M3 – маса сухої наважки, г.

$$VV = (M1 - M2) / M3 \times 100, \text{ де}$$

VV – втрата води, %;

M1 – маса стебел до в'янення, г;

M2 – маса стебел через 2, 4, або 6 годин в'янення, г;

M3 – маса сухої наважки, г.

Статистичну обробку даних проводили у програмі Statistica 6, достовірність результатів визначали за *t*-критерієм Стьюдента. Фотографії зроблені цифровою камерою Canon Power Shot A630.

Результати та їх обговорення

Досліджені види мають подібну анатомічну будову стебла: одношарову епідерму, клітини якої мають крупно-хвилясті обриси та витягнуту проекцію; паразитний тип продигового апарату; продиhi не заглиблені. Під епідермою нерівномірно представлена гіподерма з дещо дрібніших клітин за паренхімі. Добре розвинена водоносна тканина. Провідні пучки (до 16 штук) добре розвинені за рахунок ксилеми, флоема представлена 2-3 рядами клітин.

Найбільш відрізняються види за вмістом запасних речовин. Зовнішня стінка епідерми стебла *A. flavistyla* має дещо потовщену кутикулу (Рис. 1 а). Хлоренхіма чітко не відмежована, представлена клітинами округлої форми з великим вмістом води. В коровій паренхімі багато ефіро-олійних включень та слизових клітин, трапляються конгломерати сферичних включень ймовірно ліпідної природи (Рис. 2 а, б). Біля провідних пучків та під епідермою спостерігаються поодинокі скупчення кристалів і зрідка друз оксалату кальцію (Рис. 3 а).

В *E. grusonii* найкраще з поміж розглянутих видів розвинута епідерма та кутикула (Рис. 1 б; Табл. 1). Хлоренхіма в більшій мірі представлена в сосочках 4-5 рядами клітин прямокутної та овальної форми. Невелика кількість ліпідних включень розміщена вздовж провідної системи (Рис. 2 в). В сосочках, біля провідних пучків та серцевинній паренхімі знаходиться багато великих друз оксалату кальцію (Рис. 3 б). Кристали в друзах розміщені переважно радіально.

Зовнішня та внутрішня периклінальні стінки епідермальних клітин стебла *M. bocasana* потовщені (Рис. 1 в). Овальні клітини хлоренхіми зустрічаються лише в сосочках, де також вздовж елементів провідної системи розміщені призматичні кристали та дрібні друзи оксалату кальцію (Рис. 3 в). У паренхімі кори та серцевини багато крохмалю, а в сосочках крохмалю немає.

Водоносна тканина досліджених видів найкраще розвинена у *A. flavistyla*, площа клітин корової паренхіми становить

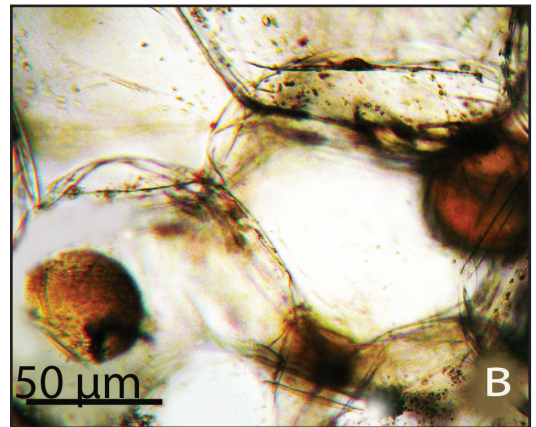
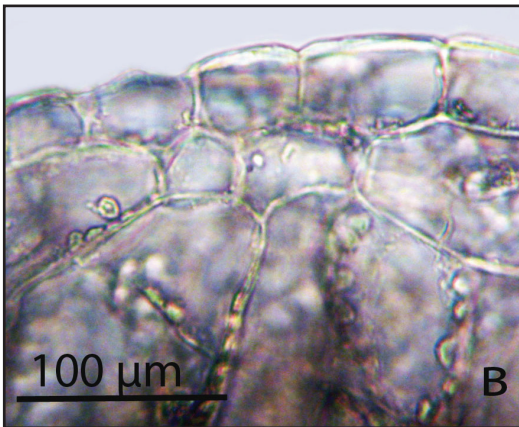
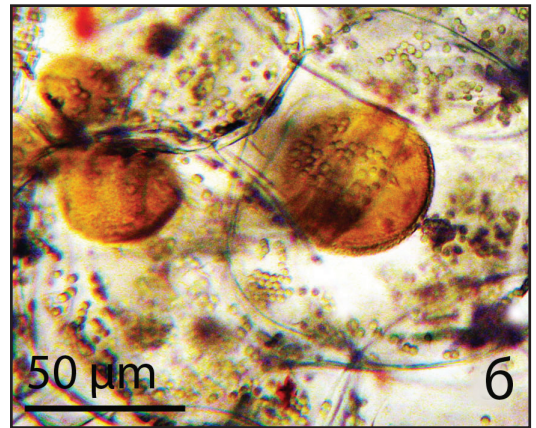
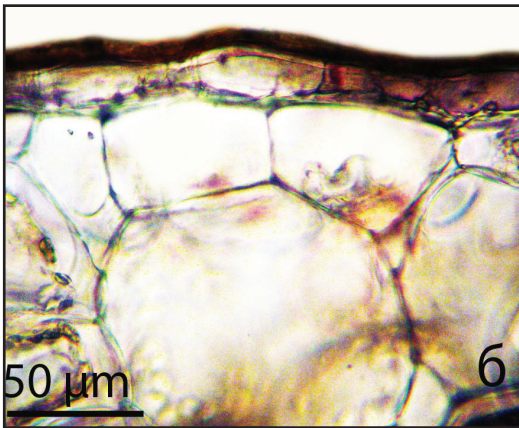
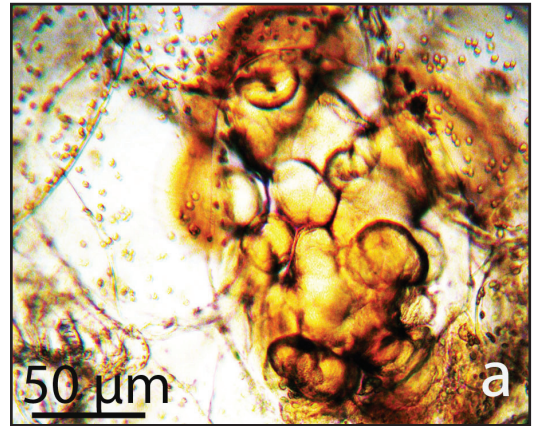
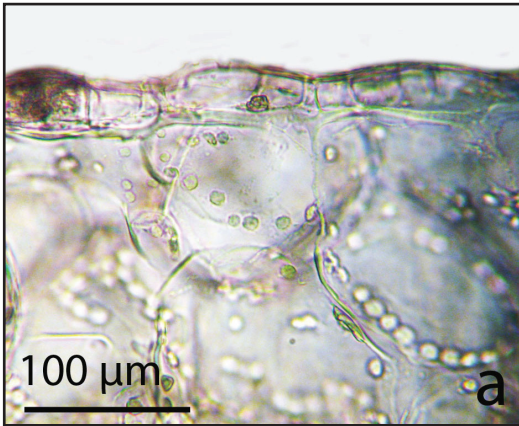


Рис. 1. Поперечний переріз епідерми стебла: **а** – *Aylostera flavistyla*; **б** – *Echinocactus grusonii*; **в** – *Mammillaria bocasana*.

Fig. 1. Cross-sections through the stem epidermis of: **a** – *Aylostera flavistyla*; **б** – *Echinocactus grusonii*; **в** – *Mammillaria bocasana*.

Рис. 2. Включення ліпідної природи в стеблі: **а, б** – *Aylostera flavistyla*; **в** – *Echinocactus grusonii*.

Fig. 2. The lipid inclusions in the stem of: **a, б** – *Aylostera flavistyla*; **в** – *Echinocactus grusonii*.

Табл. 1. Морфометричні характеристики епідерми деяких видів родини Cactaceae.**Tab. 1.** Morphometric characteristics of epidermis of some species from Cactaceae family.

Вид	Товщина епідерми, мкм	Товщина зовн. кліт. стінки, мкм	Площа клітин епідерми, мкм ²	Довжина продихів, мкм	Товщина продихів, мкм	Кількість продихів, шт./мм ²
<i>A. flavistyla</i>	41,3±3,1	4,8±1	7915±1876	45±1,5	29,1±1,4	7,64±2,1
<i>E. grusonii</i>	46,8±8,3	8,5±0,9*	3466±1429*	35,11±2,1*	26,5±4,7	10,75±2,5
<i>M. bocasana</i>	29,6±6,9*^	5,6±1,4*^	7972±1535^	34,1±2,6*	27,48±2,6	13,33±3,4*^

* – P < 0,05 відносно *A. flavistyla*; ^ – P < 0,05 відносно *E. grusonii*

* – P < 0,05 respectively to *A. flavistyla*; ^ – P < 0,05 respectively to *E. grusonii*

Табл. 2. Характеристика посухостійкості деяких видів родини Cactaceae.**Tab. 2.** Characteristics of the drought resistance of some species from Cactaceae family.

Вид	Середня втрата води за 1 год. в'янення, %	Оводненість стебел, %	Водний дефіцит, %
<i>A. flavistyla</i>	28,09±5,24	96,37±0,40	14,91±2,06
<i>E. grusonii</i>	19,61±6,45*	96,52±0,01	12,81±1,01
<i>M. bocasana</i>	44,59±1,62*^	96,61±0,10	21,61±5,31*^

* – P < 0,05 відносно *A. flavistyla*; ^ – P < 0,05 відносно *E. grusonii*

* – P < 0,05 respectively to *A. flavistyla*; ^ – P < 0,05 respectively to *E. grusonii*

219812 ± 54406 мкм², а площа клітин серцевинної паренхіми – 225895 ± 70533 мкм². Площа клітин корової паренхіми у *M. bocasana* більша ніж в серцевині, і становить 133276 ± 31726 мкм² та 24026±6097 мкм² відповідно. *E. grusonii* має найдрібніші водоносні клітини (31970 ± 17779 мкм² у корі та 16204 ± 9634 мкм² у серцевині). Роль запасання води в розглянутих видів виконує переважно коро́ва паренхіма, хоча клітини у корі та серцевині *A. flavistyla* й не відрізняються за розмірами, проте відсоток серцевини значно менший порівняно з відсотком кори в стеблі.

Кутикула непроникна для води і газів, тому захищає стебло від зайвого випаровування. Найкраще вона розвинена у *E. grusonii* поряд з найтовщою епідермою (Табл. 1). Дрібні клітини епідерми також сприяють зниженню випаровування поверхнею стебла. *A. flavistyla* водночас з досить товстою епідермою має тоншу, порівняно з *M. bocasana*, її зовнішню оболонку, що надає подібної стійкості цим двом видам за даними показниками.

Найбільша кількість продихів характерна для *M. bocasana* (Табл. 1). Разом з цим,

закономірно, що при збільшенні кількості продихів зменшуються їх розміри. Так найбільші розміри продихів у *A. flavistyla*. Зокрема від кількості продихів на одиницю площі залежить інтенсивність транспірації, а отже і посухостійкість. Як правило посуху супроводжує висока температура, тому велика кількість продихів дає можливість зменшувати температуру поверхні листка за рахунок випаровування з одного боку, однак з іншого боку, при цьому відбувається зниження посухостійкості.

Результати вивчення видів родини Cactaceae вказують на значну оводненість їх стебел, що є характерним для сукулентних рослин в цілому (Табл. 2). За даним показником досліджені види подібні. Водний дефіцит характеризує міру недонасиченості водою рослинних клітин. Найбільше значення даного показника у *M. bocasana*, що корелює з порівняно незначною кількістю включень оксалатів. За даним показником рослини *A. flavistyla* та *E. grusonii* є більш посухостійкими.

Як відомо, накопичення кристалів кальцію та зерен крохмалю, дозволяє регулювати

внутрішньоклітинну рН, що захищає цитоплазму від руйнування і є адаптивною відповіддю на втрату води (AYALA-CORDERO *et al.* 2006). Інші дослідники вказують, що накопичення оксалату кальцію в тканині поруч з продирами та в ксилемі, сприяє закриттю продирих протягом дня і відповідно зниження транспірації (RUIZ & MANSFIELD 1994; МОНЖЕ & ВАРАН 2002). Більша кількість оксалатів у нормі, на нашу думку, є задатком більш вищої посухостійкості для *A. flavistyla* та *E. grusonii*.

Водоутримуюча здатність застовується як основний показник стійкості рослин до тривалої посухи. Вона характеризується швидкістю віддачі води ізольованих вегетативних органів. У нашому дослідженні найбільша втрата води за 1 годину спостерігалась у *M. bocasana*, що пов'язано зокрема з найбільшою кількістю продирих, а отже з підвищенням витрат води на транспірацію в умовах підвищення температури. Оскільки рослини даного виду мають набагато більше довгих сосочків, то відповідно і площа поверхні буде значно більшою для випаровування, порівняно з іншими двома видами. Більш ніж вдвічі менша водовіддача була у *E. grusonii*. Таким чином, за такими показниками як втрата води за 1 годину в'янення та водний дефіцит, найменш посухостійкими виявились рослини *M. bocasana*, а найбільш посухостійкими – рослини *E. grusonii*.

Отримані результати показали різноспрямований напрям адаптації різних видів до умов з недостатньою кількістю води. На нашу думку саме найтовстіша епідерма та кутикула, дрібноклітинність епідерми, а також найбільша кількість включень оксалату кальцію у *E. grusonii* є основними факторами підвищення посухостійкості.

Збільшення ступеня посухостійкості у *A. flavistyla* пов'язане з такими ознаками, як: а) розвинена, порівняно з двома іншими видами, водоносна паренхіма; б) велика кількість включень, які допомагають утримувати воду в клітинах; в) мінімальна кількість продирих.

В той час як *M. bocasana* має відносно низьку посухостійкість за рахунок тонкої

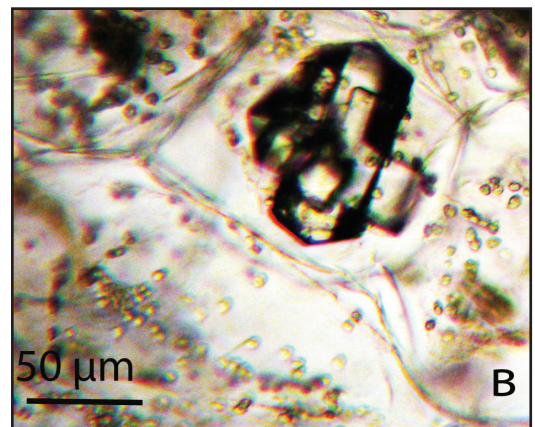
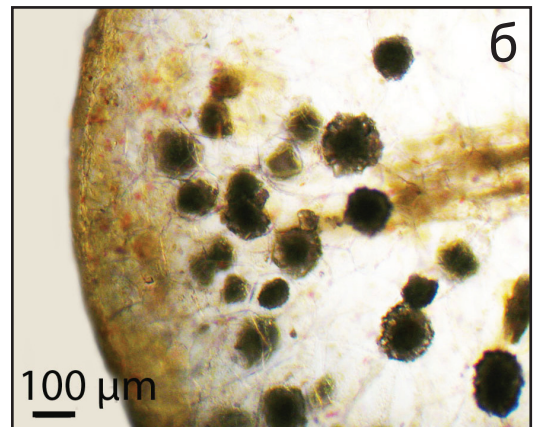
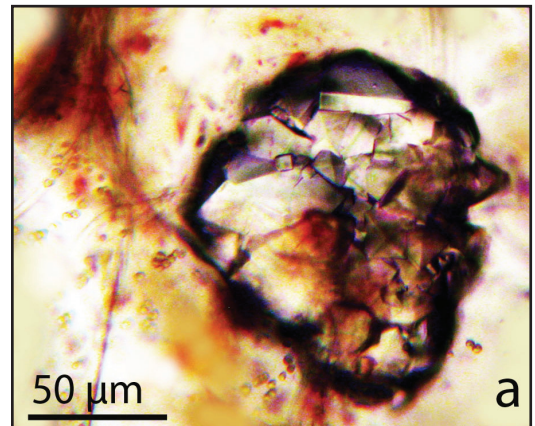


Рис. 3. Включення оксалату кальцію в стеблі: а – *Aylostera flavistyla*; б – *Echinocactus grusonii*; в – *Mammillaria bocasana*.

Fig. 3. The calcium oxalate inclusions in the stem of: а – *Aylostera flavistyla*; б – *Echinocactus grusonii*; в – *Mammillaria bocasana*.

епідерми, великої кількості продохів, крупноклітинної епідерми і малої кількості включень. Адаптаційним до посушливих умов напрямком для *M. bocasana*, на відміну від двох інших видів, є наявність численних довгих (до 1 см у річних рослин) щетинок, окрім бічних та центральної колючок. Густе опушення знижує турбулентність повітря біля поверхні рослини, а отже і інтенсивність транспірації через продохи. Збільшення кількості продохів при збільшенні опушення є суперечливим еволюційним проявом.

Висновки

Таким чином, можна стверджувати, що існують відмінні напрямки пристосування рослин до аридних умов, які характеризуються дефіцитом вологи. Найбільш посухостійкими виявилися рослини виду *E. grusonii*, найменш посухостійкими – рослини виду *M. bocasana*.

Використані джерела

- ЖАНГ Д.Х., ТОХТАРЬ В.К. 2011.** Исследование засухоустойчивости перспективных видов *Momordica charantia* L. и *M. balsamina* L. (Cucurbitaceae). Научные ведомости. Серия Естественные науки 9 (15): 43–47.
- [Zhang D.H., Tohtar' V.K. 2011. Research on drought tolerance of perspective species *Momordica charantia* L. and *M. balsamina* L. (Cucurbitaceae). *Sci. News. Ser. Nat. Sci.* 9 (15): 43–47. (In Russian)]
- ЗАХАРЕВИЧ С.Ф. 1954.** К методике описания листа. *Вестник Ленинград. Ун-та* 4: 65–75.

- [Zaharevich S.F. 1954. Toward the method of leaf description. *Proc. Leningrad Univer.* 4: 65–75. (In Russian)]
- ПАУШЕВА З.П. 1988.** Практикум по цитологии растений. Агропромиздат, Москва.
- [Pausheva Z.P. 1988. Practicum on plant cytology. Агропромиздат, Moscow. (In Russian)]
- РОМЕЙС Б. 1954.** Микроскопическая техника. Изд-во иностранной литературы, Москва.
- [Romeys B. 1954. Microscopic technics. Publ. of foreign literature, Moscow. (In Russian)]
- ANDERSON E.F. 2001.** The cactus family. Timber Press, Portland, Oregon.
- AYALA-CORDERO G., TERRAZAS T., LOPEZ-MATA L., TREJO C. 2006.** Morpho-anatomical changes and photosynthetic metabolism of *Stenocereus beneckei* seedlings under soil water deficit. *J. Exp. Bot.* 57: 3165–3174.
- МОНЬЕ П.В., БАРАН Е.В. 2002.** Characterization of calcium oxalates generated as biominerals in cacti. *Plant Physiology* 128: 707–713.
- NOBEL P.S. (ed.) 2002.** Cacti: Biology and uses. University of California Press.
- ROSAS U., ZHOU R.W., CASTILLO G., COLLAZO-ORTEGA M. 2012.** Developmental reaction norms for water stressed seedlings of succulent cacti. *PLoS ONE* 7 (3): e33936. doi: 10.1371/journal.pone.0033936.
- RUIZ L.P., MANSFIELD T.A. 1994.** A postulated role for calcium oxalate in the regulation of calcium ions in the vicinity of stomatal guard cells. *New Phytologist* 127: 473–476.
- SECORUN A.C., DE SOUZA L.A. 2011.** Morphology and anatomy of *Rhipsalis cereuscula*, *Rhipsalis floccose* subsp. *hohenauensis* and *Lepismium cruciforme* (Cactaceae) seedlings. *Rev. Mex. Biodivers.* 82: 131–143.
- SMITH S.D., DIDDEN-ZOPFY B., NOBEL P.S. 1984.** High-temperature responses of North American cacti. *Ecology* 65: 643–651.
- ZARINKAMAR F. 2007.** Stomatal observations in Dicotyledons. *Pak. J. Biol. Sci.* 10 (2): 199–219.

ANATOMICAL STRUCTURE OF THE STEM AND DROUGHT RESISTANCE OF AYLOSTERA FLAVISTYLA, MAMMILLARIA BOCASANA AND ECHINOCACTUS GRUSONII

NATALIIA NUZHYNIA * & KATERYNA BAGLAY **

Abstract. The anatomy of *Aylostera flavistyla*, *Mammillaria bocasana* and *Echinocactus grusonii* stems was studied. Different trends of plants' adaptation to condition of water deficit were identified. It was shown that the most drought-resistant plant is *E. grusonii*, and the less drought-tolerant is *M. bocasana*.

Key words: *Aylostera flavistyla*, *Mammillaria bocasana*, *Echinocactus grusonii*, anatomy of the stem, drought resistance

Educational and Scientific Centre "Institute of Biology" of Taras Shevchenko National University of Kyiv; Symon Petlura str. 1, 01032 Kyiv, Ukraine; * nuzhynan@gmail.com, ** fomin-sad@yandex.ru



РІД *REBUTIA* (САСТАСЕАЕ): ЗМІНА АНАТОМО- МОРФОЛОГІЧНИХ ОЗНАК В ПРЕГЕНЕРАТИВНИЙ ПЕРІОД

ГАЛИНА В. КАЛАШНИК¹ ТА МАРИНА М. ГАЙДАРЖИ²

Анотація. Проаналізовано анатомо-морфологічні особливості 3-, 6- та 12-місячних рослин двох видів – *Rebutia flavistyla* та *R. minuscula*. Встановлено, що у процесі росту та розвитку від 3-місячного до однорічного віку характерне зростання кількості клітин епідерми на одиницю площі та потовщення їх зовнішніх стінок. В цей час з'являється гіподерма, збільшуються розміри клітин корової та палисадної паренхіми, зростає відношення діаметру серцевини до товщини корової паренхіми, з'являються слизисті клітини та збільшується їх кількість, зростає кількість провідних пучків та ксилемних елементів у них. Відмічено сповільнення ділення клітин епідерми та паренхіми, а також посилення процесів їх росту й розтягування у 6-місячному віці. При цьому також спостерігаються певні відмінності анатомічної будови у різних видів, які можуть мати таксономічне значення.

Ключові слова: *Rebutia*, Сactaceae, анатомічні дослідження, розвиток рослин

¹ Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології», кафедра ботаніки, просп. Академіка Глушкова, 2, м. Київ, 03022, Україна; gal4enok28@ukr.net

² Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології», НДЛ «Інтродукованого та природного фіторизноманіття», вул. С. Петлюри, 1, м. Київ, 01032, Україна

Вступ

Рід *Rebutia* K. Schum. належить до підродини Sactoideae Eaton, родини Сactaceae Juss. Представники цього роду є одними з найбільш поширених в колекціях Ботанічних садів та аматорів рослин родини Сactaceae. Це невеликий рід, однак його систематика викликає багато суперечок впродовж усієї історії вивчення, які не вирішені і в наш час (MİNALTE *et al.* 2011). Зокрема, BUINING & DONALD (1963, 1965) за морфологічними особливостями квітки розділили рід *Rebutia* на два підроди: *Rebutia* та *Aylostera* Speg., однак KRAINZ (1967) відкинув такий поділ. VASKEBERG (1968-1977) на основі ряду характеристик розрізняв три роди: *Aylostera*, *Mediolobivia* Backbg. та *Rebutia*. У ряді пізніших праць (BARTHLOTT & HUNT 1993; HUNT 1999; ANDERSON 2001; HUNT *et al.* 2006) види з родів *Rebutia*, *Mediolobivia* та *Aylostera* знову були об'єднані в один рід *Rebutia*. Крім цього RITZ *et al.* (2007) запропонували об'єднати під назвою *Rebutia* також роди *Sulcorebutia* Backbg. та *Weingartia*

Werderm. (MİNALTE *et al.* 2011). Таким чином, якщо раніше в межах роду *Rebutia* розрізняли 41 вид (ANDERSON 2001), то зараз The Plant List включає 253 видові назви, з яких лише 24 визнано, а решта вважаються синонімами.

В природних умовах представники роду *Rebutia* зустрічаються в північно-західних регіонах Аргентини та південних провінціях Болівії на схід від Анд (FEARN & PEARCY 1981). Території зростання рослин різних видів відрізняються своїми кліматичними умовами. Так, вони зустрічаються як в дуже засушливих і напівзасушливих регіонах, так і в вологих лісах Юнги та на берегах водойм, хоча в останніх випадках вони ростуть на бідних кам'яних ґрунтах. У зв'язку з неконтрольованим збором та розширенням сільськогосподарської діяльності 29 видів даного роду включені до The IUCN Red List of Threatened Species.

Характерно, що більшість праць присвячених вивченню цього роду стосуються морфології рослин, філогенії, молекулярно-генетичного аналізу, а також впливу умов середовища (GOLA 1997;

MINALTE *et al.* 2011). При цьому досить мало уваги приділяється вивченню анатомії даних рослин, в тому числі анатомічним змінам в процесі росту та розвитку. Хоча такі дані допомогли б в уточненні класифікації роду *Rebutia* (MURUAGA & GUANTAY 2012), визначенні особливостей пристосувань цих рослин до умов середовища тощо. Тому нашу роботу було присвячено вивченню анатомічної будови стебла рослин роду *Rebutia* на ранніх етапах онтогенезу.

Матеріали і методи досліджень

Дослідження проводили на 3-, 6- та 12-місячних рослинах двох видів – *Rebutia flavistyla* F. Ritter та *R. minuscula* K. Sch., вирощених в умовах оранжереї Ботанічного саду ім. акад. О.В. Фоміна з насіння власної репродукції. Для дослідження відбирали по 5 екземплярів з кожного виду. Рослини фіксували в 70% етиловому спирті. Поперечні зрізи робили від руки із середньої частини стебла. Мікропрепарати виготовляли за загальноприйнятими методиками та фарбували сафраніном, J₂-KJ або метиленовим синім (ПАУШЕВА 1988). Тимчасові препарати зрізів вивчали за допомогою світлового мікроскопа XSP-146TP. Мікрофотографії робили за допомогою цифрової фотокамери Canon PowerShot A630. Вимірювання здійснювали за допомогою програми ImageJ. Статистичну обробку результатів виконували за допомогою пакету програм Statistica 8.0 (StatSoft, USA). Класифікацію продихового індексу та товщини зовнішньої стінки епідерми здійснювали за ВАСИЛЬЕВ (1988), типів продихів – за МЕТСАЛФЕ & СНАЛК (1979).

Результати та їх обговорення

Rebutia flavistyla. Розміри цих рослин за період від 3 до 12 місяців збільшуються наступним чином: висота стебла – від 7,3±0,3 мм до 17,7±0,8 мм; діаметр стебла при основі – від 2,1±0,1 мм до 8,3±0,4 мм; ширина найширшої частини стебла – від 5±0,2 мм до 19,5±0,8 мм.

Епідерма одношарова, її товщина за період від 3 до 12 місяців значно зменшується, від 27,5±0,8 мкм до 25±0,5 мкм, а товщина зовнішньої стінки епідермальних клітин – значно збільшується, від 1,8±0,1 мкм до 3,3±0,1 мкм. Кількість клітин епідерми на одиницю площі за цей час значно зростає, однак при цьому в 6-місячному віці значно менша кількість клітин, ніж у 3-місячному. Відповідно, найбільші розміри клітин у рослин 6-місячного віку, а найменша – у 12-місячних рослин (Табл. 1). Продихи паралелоцитного типу. Їх кількість з віком лінійно зростає, продиховий індекс також зростає, однак найвищий цей показник у 6-місячних рослин. В річних рослин з'являється шар гіподерми з потовщеними стінками.

Палісадна паренхіма в 3-місячних рослин відсутня, в 6-місячних – виражена не скрізь, представлена не більше як 3-4 рядами клітин, а в 12-місячних – добре виражена, з 4-6 рядів клітин. Товщина водоносної корової паренхіми зростає від 1860±104 мкм у 3-місячних рослин, до 3960±88 мкм у 12-місячних. Діаметр серцевинної паренхіми збільшується від 933±30 мкм до 4050±157 мкм. При цьому розміри клітин паренхіми на поперечному перерізі стебла змінюються досить нерівномірно, так найбільші значення цього показника, як для кори, так і для серцевини, спостерігаються у 6-місячних рослин. При цьому у 12-місячних рослин розміри клітин паренхіми більші за такі у 3-місячних, що вказує на загальну тенденцію до збільшення цих параметрів з віком (Табл. 1). Характерно, що розміри клітин корової паренхіми значно більші за розміри клітин серцевинної паренхіми у всіх вікових груп. В 6-місячних рослин в коровій паренхімі зрідка трапляються слизові клітини. У 12-місячному віці їх кількість значно зростає, особливо в коровій паренхімі.

Рослинам *R. flavistyla* властиві колатеральні провідні пучки, кількість яких в центральному циліндрі за досліджуваній період збільшується від 6-10 до 16-19 шт. В 3-місячних рослин вони слабо розвинені, а кількість провідних елементів у пучку

Табл. 1. Кількісна характеристика анатомічних показників рослин роду *Rebutia*.Таб. 1. Quantitative anatomical characteristic of the *Rebutia* plants.

Вік	К-ть клітин епідерми на мм ²	Площа основних клітин епідерми, мкм ²	Кількість проміхів на мм ²	Продиховий індекс	Площа клітин корової паренхіми, мкм ²	Площа клітин палісадної паренхіми, мкм ²	Площа клітин паренхіми серцевини, мкм ²
<i>Rebutia flavistyla</i>							
3 міс.	83,3±3,2	14096±527	2,5±0,9	2,9	39013±1725	-	9536±749
6 міс.	50,6±1,4***	18949±682***	6,1±1,0*	10,7	59909±2256***	47772±5060	37986±2412***
12 міс.	128,8±6,5***	12265±442*	10±1,1***	7,2	40293±1783	32931±1436	14838±658***
<i>Rebutia minuscula</i>							
3 міс.	276,5±28,1	6999±318	9,4±0,9	3,9	13106±510	15537±770	2714±144,5
6 міс.	152,3±5,6***	7499±268	13,6±1,1	8,1	32444±1535***	36156±2012***	23213±1321***
12 міс.	164,8±16,9*	8046±212*	12,9±1,2*	7,2	27935±9973***	31095±1301***	36524±1159***

* – $p < 0,05$; *** – $p < 0,001$ – достовірна відмінність відносно 3-місячних рослин.

* – $p < 0,05$; *** – $p < 0,001$ – significant difference in relation to 3-month plants.

коливається від 1 до 4 шт. В 6-місячних екземплярів спостерігається 6-11 провідних елементів на пучок, а в 12-місячних рослин кількість провідних елементів значно зростає і сягає 65-80 елементів у пучку. Крім цього в 12-місячних рослин з'являються слабо розвинені корові провідні пучки.

***Rebutia minuscula*.** За період з 3-х до 12-місячного віку висота стебла досліджуваних представників цих рослин збільшується з 7,7±0,3 мм до 21±0,8 мм; ширина стебла при основі – від 2,1±0,1 мм до 7,1±0,3 мм; діаметр найширшої частини стебла – від 5,9±0,2 мм до 20,2±0,4 мм.

Епідерма одношарова, її товщина за період росту від 3 до 6 місяців значно зменшується, від 27,2±0,6 мкм до 25,5±0,4 мкм, а пізніше цей показник майже не змінюється. Товщина зовнішньої стінки епідермальних клітин зростає від 2,2±0,1 мкм у 3-місячних рослин до 2,7±0,1 мкм у 12-місячних. Кількість клітин епідерми на одиницю площі в 3-місячних рослин значно більша за таку у 6- та 12-місячних. При цьому, з 6- до 12-місячного віку цей показник підвищується незначно (Табл. 1). Продихи паралелоцитного типу. Їх кількість

та продиховий індекс найменші у 3-місячних рослин, а у інших вікових груп ці показники значно вищі, однак відрізняються незначно (Табл. 1). Гіподерма одношарова з відносно тонкостінних клітин.

Палісадна паренхіма в 3-місячному віці фрагментарно виражена, завтовшки до 3-4 клітин, а в 12-місячних рослин – добре розвинута і складена з 5-6 рядів клітин. Товщина корової паренхіми за цей час зростає від 1240±46 мкм до 3500±289 мкм, діаметр серцевини – від 1280±46 мкм до 5550±222 мкм. При цьому розміри клітин паренхіми на поперечному перерізі стебла з віком значно збільшуються (Табл. 1). Для клітин серцевинної паренхіми цей процес носить досить лінійний характер, а для корової та палісадної паренхіми – спорадичний. Зокрема, для 6-місячних рослин характерні значно більші показники цих параметрів, ніж для інших вікових груп. Крім цього, відмічено, що у 3- та 6-місячних рослин клітини корової паренхіми більші за клітини серцевинної паренхіми, однак до 12-місячного віку розміри останніх значно зростає та перевищує розміри клітин корової паренхіми. В паренхімі 12-місячних рослин присутні слизіві клітини.

Провідні пучки колатеральні. Їх кількість в центральному циліндрі за цей період збільшується від 9-10 до 17-20 шт. При цьому кількість елементів ксилеми в них коливається від 3-11 шт. у 3-місячних рослин до 68-75 шт. у 12-місячних. Крім цього, у 12-місячних рослин з'являються слабо розвинуті корові провідні пучки.

Таким чином, якщо у 3-місячних рослин досліджуваних видів адаптація до аридних умов існування базується в першу чергу на посиленому розвитку водозапасної тканини, а покривні тканини досить слабо розвинені, то роль останніх з віком зростає. Зокрема, з'являється гіподермальна тканина, потовщується зовнішня стінка епідермальних клітин, хоча товщина епідерми загалом знижується. Характерне також зростання ролі серцевинної паренхіми в процесах водозапасання. Крім цього, як додаткове пристосування до аридних умов існування з віком значно зростає кількість слизових клітин. Якщо в серцевині вони зустрічаються досить рідко, то для кори, в тому числі й для палісадної паренхіми, характерна велика їх кількість, хоча у більшості представників підродини Cactoideae вони зазвичай розміщені у внутрішній корі та серцевині (TERRAZAS SALGADO & MAUSETH 2002).

Для представників обох видів характерне сповільнення ділення клітин епідерми та паренхіми та посилення процесів їх росту й розтягнення у 6-місячому віці. Це може бути спричинене сезонною ритмікою росту рослин. Однак, незважаючи на це, загалом з віком збільшується кількість клітин епідерми на одиницю площі, та, відповідно, зменшуються їх розміри, водночас зростають розміри клітин корової та серцевинної паренхіми. Крім цього, зростає кількість продохів та продохивий індекс, останній з дуже низького стає низьким. Зростає також кількість провідних пучків та ксилемних елементів у них. Особливо швидкий розвиток провідної системи у рослин обох видів характерний для періоду від 6 до 12 місяців. В цей час,

у зв'язку зі збільшенням діаметру стебла, з'являються корові провідні пучки, однак вони ще дуже слабо розвинуті.

Деякі з проаналізованих ознак можуть мати систематичне значення на видовому рівні. Так, при майже однаковій товщині епідерми, для представників *R. flavistyla* характерна тонка (ВАСИЛЬЄВ 1988) зовнішня стінка у 3-місячому віці, помірної товщини – в 6-місячому, і товста – в 12-місячому. Тоді як у досліджених екземплярів *R. minuscula* у всіх вікових груп вона помірної товщини. Крім цього, у рослин *R. flavistyla* товщина корової паренхіми в 3-місячому віці значно більша за діаметр серцевини, а в 12-місячому ці показники майже однакові, тоді як у 3-місячних екземплярів *R. minuscula* вони майже однакові, а з віком діаметр серцевини значно перевищує товщину корової паренхіми.

Висновки

Отже, для рослин *R. flavistyla* та *R. minuscula* у процесі росту та розвитку від 3-місячного до однорічного віку характерне зростання кількості клітин епідерми на одиницю площі та потовщення їх зовнішніх стінок. В цей час з'являється гіподерма, збільшуються розміри клітин корової та серцевинної паренхіми на поперечному перерізі стебла, зростає відношення діаметру серцевини до товщини корової паренхіми, з'являються слизові клітини та збільшується їх кількість, зростає кількість провідних пучків та ксилемних елементів у них. При цьому спостерігаються певні відмінності анатомічної будови у різних видів, які можуть мати таксономічне значення. Таким чином, з віком, в процесі адаптації досліджуваних рослин до умов існування, посилюється роль покривних тканин, зростає водозапасаюча роль серцевинної паренхіми, в коровій паренхімі збільшується кількість слизових клітин, які виконують роль додаткового регулятора водного балансу рослини.

Використані джерела

- ВАСИЛЬЕВ Б.Р. 1988.** Строение листа древесных растений различных климатических зон. Издательство Ленинградского университета, Ленинград.
[Vasiliev B.R. 1988. Structure of the leaf of woody plants of different climatic zones. Leningrad University Press, Leningrad. (In Russian)]
- ПАУШЕВА З. П. 1988.** Практикум по цитологии растений. Агропромиздат, Москва.
[Pausheva Z.P. 1988. Practicum on plant cytology. Agropromizdat, Moscow]
- ANDERSON E.F. 2001.** The cactus family. Timber Ed., Portland, OR.
- ВАСКЕБЕРГ С. 1968-1977.** Das Kaktenlexicon. Veb Gustav Fischer Verlag, Jena.
- BARTHLOTT W., HUNT D. 1993.** Cactaceae. In: KUBITZKI K., ROHWER J.G., BITTRICH V. (eds), The families and genera of vascular plants. Vol. 2: 161–197. Springer Verlag, Berlin, Germany.
- BUINING A.F.H., DONALD J.D. 1963.** Die Gattung *Rebutia* K. Schumann. *Sukkulantenkunde* 7/8: 96–107.
- BUINING A.F.H., DONALD J.D. 1965.** The revision of the genus *Rebutia* K. Schum. *Cact. Succ. J. Gr. Brit.* 27: 36–41.
- FEARN B., PEARCY L. 1981.** The genus *Rebutia*. Higham Press Ltd., Shirland, Derby, Great Britain.
- GOLA E. 1997.** Phyllotactic spectra in cacti: *Mammillaria* species and some genera from *Rebutia* group. *Acta Soc. Bot. Pol.* 66 (3-4): 237–257.
- HUNT D. 1999.** CITES. Cactaceae checklist. Kew Royal Botanic Gardens, Kew. UK.
- HUNT D., TAYLOR N., CHARLES G. 2006.** The cactus lexicon. DH Books, Milborne Port, UK.
- KRAINZ H. 1967.** Die Kakteen: eine Gesamtdarstellung der eingeführten Arten nebst Anzucht und Pflege-Anweisungen. Francksche Verlagshandlung, Stuttgart.
- METCALFE C.R., CHALK L. 1979.** Anatomy of the dicotyledons. Clarendon Press, Oxford.
- MIHALTE L., SESTRAS R.E., FESZT G. 2011.** Morphological characterization and phylogenetic distance among several genotypes of *Rebutia*, *Aylosteria*, *Mediolobivia* and *Sulcorebutia* (Cactaceae). *Afr. J. Biotechnol.* 61: 13051–13057.
- MURUAGA N.B., GUANTAY M.E. 2012.** Aspectos epidérmicos en especies de *Rebutia* (Cactaceae: Cactoideae) de la Argentina. *Lilloa* 49 (1): 52–58.
- RITZ C.M., MARTINS L., MECKLENBURG R., GOREMYKIN V., HELLWIG F.H. 2007.** The molecular phylogeny of *Rebutia* (Cactaceae) and its allies demonstrates the influence of paleogeography on the evolution of South American mountain cacti. *Am. J. Bot.* 94 (8): 1321–1332.
- TERRAZAS SALGADO T., MAUSETH J.D. 2002.** Shoot anatomy and morphology. In: NOBEL P.S. (ed.), *Cacti: Biology and uses*: 23–34. Berkeley, Los Angeles, London, University of California Press.

THE GENUS *REBUTIA* (CACTACEAE): CHANGE OF THE ANATOMICAL AND MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS DURING THE PREGENERATIVE PERIODGALINA V. KALASHNYK¹ & MARINA M. GAJDARZHY²

Abstract. Anatomical and morphological features of 3-, 6- and 12-month *Rebutia flavistyla* and *R. minuscula* plants were analyzed. Increasing of the epidermal cells number per unit area and the thickening of their external walls are typical for the growth and development processes from 3- to 12-month ages. At this time hypodermis has emerged, sizes of the cortex and pith parenchyma cells have increased, the pith diameter-cortex thickness ratio have increased, the mucilage cells have emerged and their number increased, besides number of the vascular bundles and xylem elements in each bundle have growth.. The slowing of the epidermal and parenchyma cells division and the intensification of their growth and stretching in 6-month age were noted. The differences in the anatomical structure of different species, that may have taxonomic significance, were observed.

Key words: *Rebutia*, Cactaceae, anatomical studies, plant development

¹ Taras Shevchenko National University of Kyiv, ESC "Institute of Biology", Department of botany, Acad. Glushkov ave. 2, 03022 Kyiv, Ukraine; gal4enok28@ukr.net

² Taras Shevchenko National University of Kyiv, ESC "Institute of Biology", scientific laboratory "Introduced and natural phytodiversity", S. Petyuryi str. 1, 01032 Kyiv, Ukraine



ОСОБЛИВОСТІ МІКРОМОРФОЛОГІЧНОЇ БУДОВИ ГІСОПУ ЛІКАРСЬКОГО

Людмила А. Котюк

Анотація. Досліджено деякі мікроморфологічні особливості будови вегетативних і генеративних органів *Hyssopus officinalis*. На епідермі виявлено продири діацитного типу та зовнішні вирости: залозисті й криючі трихоми, пельтатні ефіроолійні залози. На стеблi знаходяться голівчасті і колінозигнуті покривні трихоми, на листках – пельтатні залози і конусоподібні та колінозигнуті одно- й багатоклітинні трихоми. На чашечці у міжребер'ї є пельтатні залози, а ребра густо вкриті криючими і залозистими трихомами. Адаксіальна поверхня віночка вкрита довгими покривними трихомами, пельтатні залози розміщені не щільно по краю. Найбільшу щільність ефіроолійних пельтатних залоз відмічено на адаксіальній поверхні верхньої губи чашечки ($15,8 \pm 2,54$ шт./мм²) і абаксіальній поверхні листка ($13,6 \pm 2,40$ шт./мм²). Найбільші за діаметром залози розташовані на адаксіальній поверхні листка ($47,82 \pm 2,82$ мкм).

Ключові слова: *Hyssopus officinalis*, ефіроолійна рослина, залозисті трихоми, ефіроолійні залози

Житомирський національний агроекологічний університет, Старий бульвар, 7, м. Житомир, 10008, Україна; kotyuk-la@ukr.net

Вступ

Гісоп лікарський (*Hyssopus officinalis* L.) – перспективна ефіроолійна, пряно-ароматична, лікарська рослина-інтродуцент, яку останнім часом культивують у різних регіонах України. Батьківщина гісопу лікарського – Середземномор'я. В культурі і природі рослина трапляється у Західній Європі, Північній Америці, Європейській частині Росії, передгір'ї Алтаю (Беленовская *и др.* 1991; РАБОТЯГОВ *та ін.* 2003; МІНАРЧЕНКО 2005; КУРБАТОВА *и др.* 2009; Бойко *та ін.* 2012).

Рослинну сировину й ефірну олію гісопу використовують у фармації, парфумерії та харчовій галузі. Гісоп має чудові фітонцидні властивості, є цінним медоносом (ЖАРІКОВ і ОСТАПЕНКО 1994; Гоменюк *и др.* 2001; НИКИТИНА і ПОПОВА 2011; Котюк 2015).

Відомо, що гісоп лікарський синтезує велику кількість цінних біологічно-активних речовин: ефірну олію, стероїди, флавоноїди, тритерпеноїди, вітаміни, органічні кислоти, жирні олії (Котюк 2015). Важливе практичне значення має ефірна олія, яку накопичують різні спеціалізовані

вмістилища (ефіроолійні залози, секретуючі волоски), локалізовані на епідермі вегетативних і генеративних органів рослин (НИКИТИНА 2008; ШИВКО 2012; ZAWIŚLAK 2013).

Волоски або трихоми – спеціальні утворення, які формуються на епідермі вегетативних і генеративних органів, відіграють важливу фізіолого-біохімічну і захисну роль у житті рослин. Вони різноманітні за формою й розмірами, одно- і багатоклітинні вирости: залозисті й незалозисті волоски, сосочки, лусочки. Загалом трихоми виконують захисну (криючі трихоми) та видільну (залозисті трихоми) функції (МИГАЛЬ і ШУЛЬГА 2009; ДМІТРУК & WERYSZKO-СНІМЕЛЕWSKA 2010; ЛЕВЧИК і РАХМЕТОВ 2013, 2014).

У деяких наукових працях відзначено, що характер, кількість і розміри секретуючих утворень пов'язані із масовою долею ефірних олій, які синтезує рослина. У сировині рослин, які мають екзогенні утворення, переважну кількість ефірної олії отримують від залоз, а не із залозистих волосків. Особливо це характерно для рослин родини Lamiaceae, які утворюють пельтатні залози із

8-16 секретуючих клітин (MOON *et al.* 2009; ШАКЕНЕВА и ПАРШИНА 2014).

Ряд вчених (РАБОТЯГОВ 1983; МАЛАНКИНА и КОРЧАШКИНА 2007; ШИБКО 2012), досліджуючи ефіроолійні рослини родини Lamiaceae, встановили пряму кореляційну залежність між показниками щільності та розмірами ефіроолійних залоз на поверхні надземних органів щодо накопичення і також вмісту ефірної олії у рослині.

Вивчення структури поверхні органів рослин – важливе джерело таксономічної інформації (НОВИКОВ і БАРАБАШ-КРАСНИ 2015). Наявність і характер опушення є одними з найважливіших таксономічних ознак. Опушення може розвиватися на різних частинах тіла та відрізнятися в межах не лише однієї рослини, а й навіть на різних поверхнях одного органу. Часто саме на підставі відмінності в опушенні виокремлюють таксони видового й нижчих рангів.

Метою наших досліджень було встановлення мікрморфології та локалізації залозистих структур на епідермі вегетативних та генеративних органів рослин гісопу лікарського. Це дасть можливість з'ясувати видові морфологічні особливості рослин і встановити терміни збирання та напрями використання рослинної сировини.

Матеріали і методи досліджень

Об'єктом досліджень були рослини гісопу лікарського сорту Маркіз (*Hyssopus officinalis* cv. 'Markiz'). У дослідженнях використовували насінний матеріал із колекції пряно-ароматичних рослин відділу нових культур Національного ботанічного саду імені М.М. Гришка НАН України. Рослини вирощували на експериментальних ділянках ботанічного саду Житомирського національного агроєкологічного університету, що належить до зони Полісся України. Для досліджень відбирали листки, стебла і квітки серединної формації рослин другого року життя. Щільність пельтатних залоз і їх діаметр на листку та чашечці визначали у їх середній частині, на віночку – по краю.

Тимчасові мікропрепарати виготовляли зі свіжозібраної сировини та гербарних зразків.

Для мікроскопічного аналізу органів використовували мікроскопи: МБС-10, Біолам-70. Фотофіксацію результатів здійснювали за допомогою камери МСДС Levenhuk D SOL NG, мікроскопічні виміри – окуляр-мікрометра.

Результати та їх обговорення

Гісоп лікарський – багаторічний гіллястий полікарпічний напівкущик, у якому налічується 40-180 здерев'янілих при основі квітконосних стебел. Стебло гісопу лікарського у поперечному перерізі чотиригранне, непучкового типу, змішано опушене, вкрите 1-, 2- або 3-клітинними прямими, колінозигнутими або голівчастими волосками (Рис. 1 А-Г). Первинна кора утворена коленхімою і паренхімою, коленхіма у ребрах сформована 4-6 рядами, а у бічних стінках – 2-3 рядами клітин. Провідна система представлена флоемою і ксилемою. Паренхімні клітини серцевини великі, округлі, тонкостінні, поступово руйнуються, в результаті чого утворюється порожнина (Рис. 1 Б).

Листки гісопу лікарського лінійно-ланцетоподібні, цілокраї, дорзивентального типу. Листкова пластинка одножилкова – є лише одна центральна жилка без відгалужень (Рис. 3 А₁, Б₁). Клітини нижньої епідерми мають більш звивисті краї у порівнянні з верхньою епідермою. За характером розташування продихів листки гісопу лікарського амфістоматичні, продихи є на обох поверхнях, хоча їх щільність більша на абаксіальній. Продихи діацитного типу, оточені двома супровідними клітинами, які розміщені перпендикулярно продиховій щілині (Рис. 2).

Поверхня листка зелена, гладка, залозисто-виїмчаста, по краю – виїмчаста. Епідермальна поверхня листка містить різного типу утворення: пельтатні залози, криючі (незалозисті) і залозисті трихоми.

На адаксіальній та абаксіальній епідермі листка досить щільно розміщуються

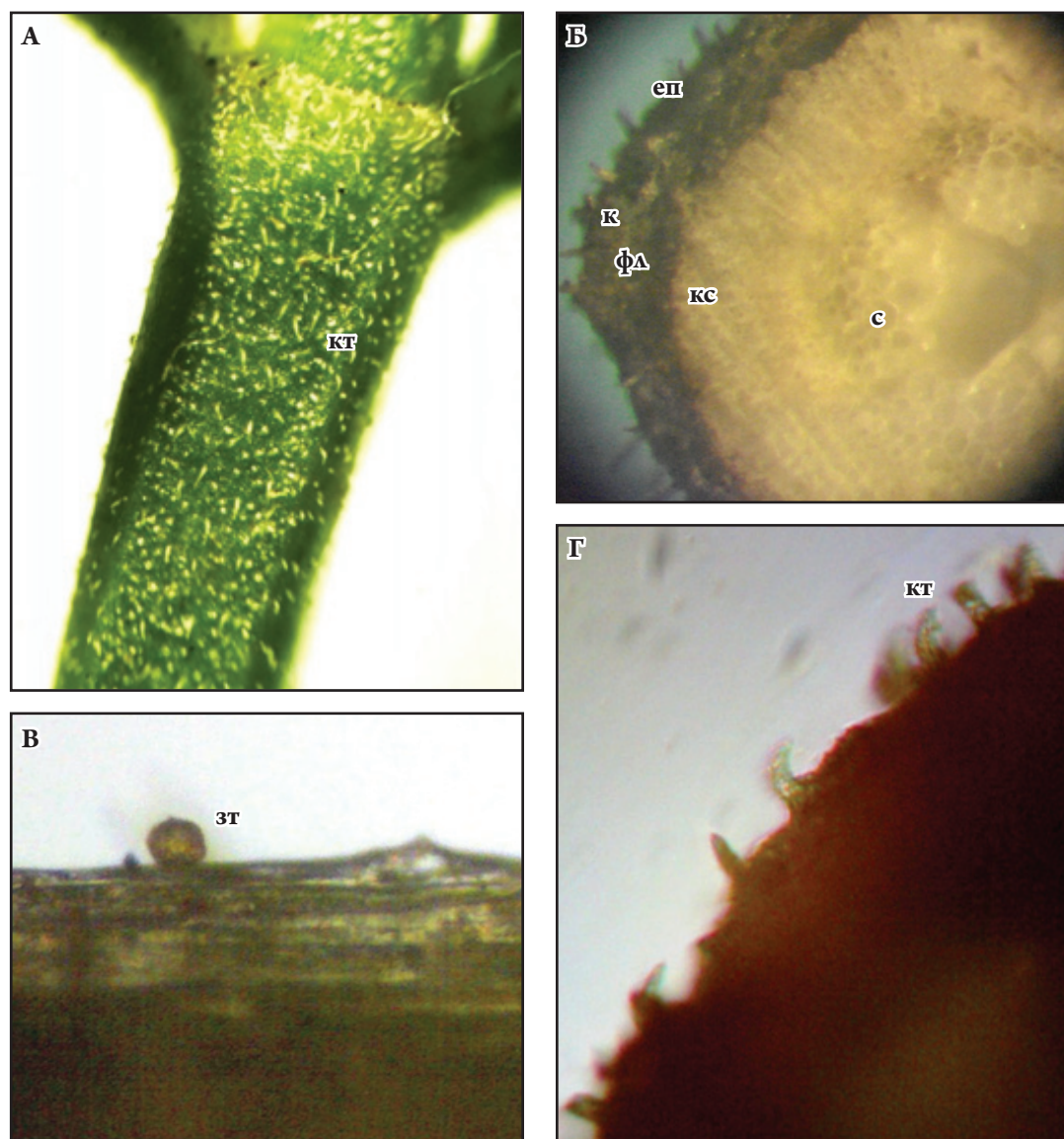


Рис. 1. Мікроморфологічні особливості стебла *Hyssopus officinalis*: **А** – опушення стебла ($\times 20$); **Б** – стебло у поперечному перерізі ($\times 120$); **В, Г** – трихоми поверхні стебла ($\times 128$). **еп** – епідерма; **зт** – залозисті трихоми; **к** – коленхіма; **кс** – ксилема; **кт** – криючі трихоми; **с** – серцевина; **фл** – флоема.

Fig. 1. Micromorphological characteristics of *Hyssopus officinalis* stem: **A** – stem pubescence ($\times 20$); **Б** – stem in cross section ($\times 120$); **В, Г** – trichomes of the stem surface ($\times 128$). **еп** – epidermis; **зт** – glandular trichomes; **к** – collenchyma; **кс** – xylem; **кт** – indumentary trichomes; **с** – pith; **фл** – phloem.

занурені у мезофіл пельтатні ефіроолійні залози (Табл. 1). Залози 16-клітинні, клітини розміщені у вигляді розетки. При накопиченні ефірної олії кутикула клітин куполоподібно здувається, утворюючи резервуар з ефірною олією (Рис. 3 Б₂). На

адаксіальній епідермі листка зустрічаються пельтатні залози діаметром $47,82 \pm 2,82$ мкм зі щільністю $7,6 \pm 1,28$ шт./ 1 мм^2 . Абаксіальна епідерма має залози меншого діаметру ($47,18 \pm 2,0$ мкм), але розміщені вони щільніше ($13,6 \pm 2,40$ шт./ мм^2) (Рис. 3 А₁, Б₁).

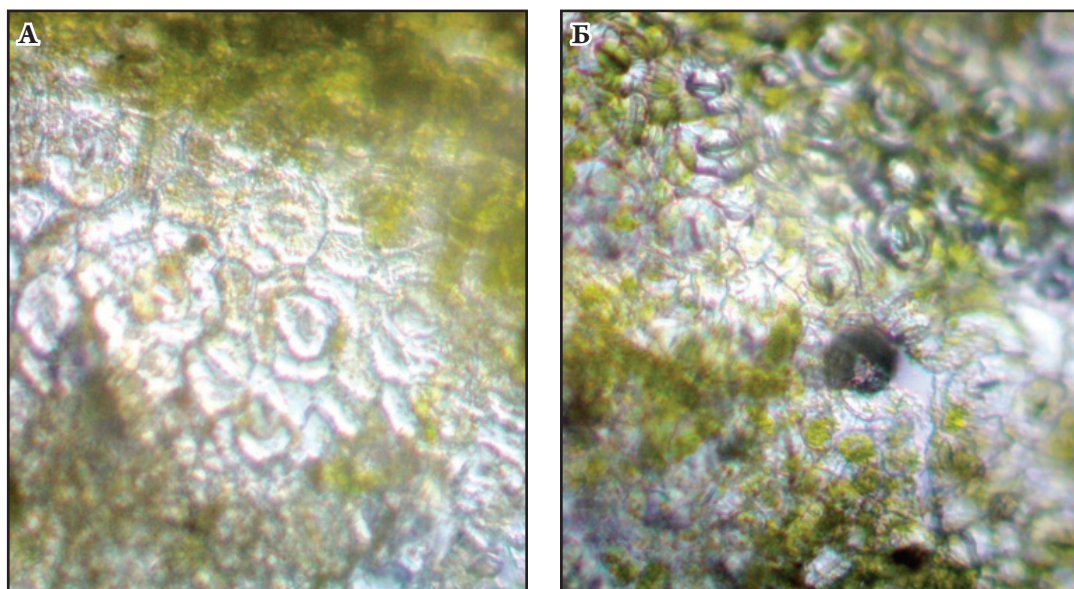


Рис. 2. Структура епідерми листка *Hyssopus officinalis* ($\times 128$): **А** – адаксіальна поверхня; **Б** – абаксіальна поверхня.

Fig. 2. Structure of the leaf epidermis in *Hyssopus officinalis* ($\times 128$): **A** – adaxial surface; **B** – abaxial surface.

Табл. 1. Щільність та розміри пельтатних залоз на епідермальній поверхні вегетативних і генеративних органів *Hyssopus officinalis*. – – залози відсутні.

Tab. 1. Density and dimensions of peltate glands occurring on the epidermal surface of vegetative and reproductive organs in *Hyssopus officinalis*. – – glands are absent.

Орган рослини	Поверхня розташування залоз	Щільність розташування залоз, шт./мм ²	Діаметр ефіроолійної залози, мкм
Листок	адаксіальна	7,6 \pm 1,28	47,82 \pm 2,82
	абаксіальна	13,6 \pm 2,40	47,18 \pm 2,0
Чашечка, верхня губа	адаксіальна	15,8 \pm 2,54	37,0 \pm 2,83
	абаксіальна	9,7 \pm 1,10	37,2 \pm 1,23
Чашечка, нижня губа	адаксіальна	9,1 \pm 1,88	33,5 \pm 1,43
	абаксіальна	3,3 \pm 0,59	39,42 \pm 3,94
Віночок, верхня губа	адаксіальна	3,3 \pm 0,59	39,42 \pm 3,94
	абаксіальна	0,9 \pm 0,54	27,98 \pm 1,83
Віночок, нижня губа	адаксіальна	2,6 \pm 0,73	37,06 \pm 3,58
	абаксіальна	-	-
Стебло		-	-

На адаксіальній поверхні і по краю листка є залозисті голівчасті волоски з одноклітинною голівкою й короткою одноклітинною ніжкою (Рис. 3 А₂, А₃), прості одно- або двоклітинні незалозисті криючі трихоми: прямі, конусоподібні або колінозигнуті

(Рис. 3 А₂, А₃). Абаксіальна епідерма вкрита такими ж трихомами, але їх щільність дещо нижча (Рис. 3 Б₁-Б₃).

Квітки у гісопу лікарського зигоморфні, дрібні. Чашечка гісопу лікарського трубчато-дзвоникоподібна з п'ятьма загостреними

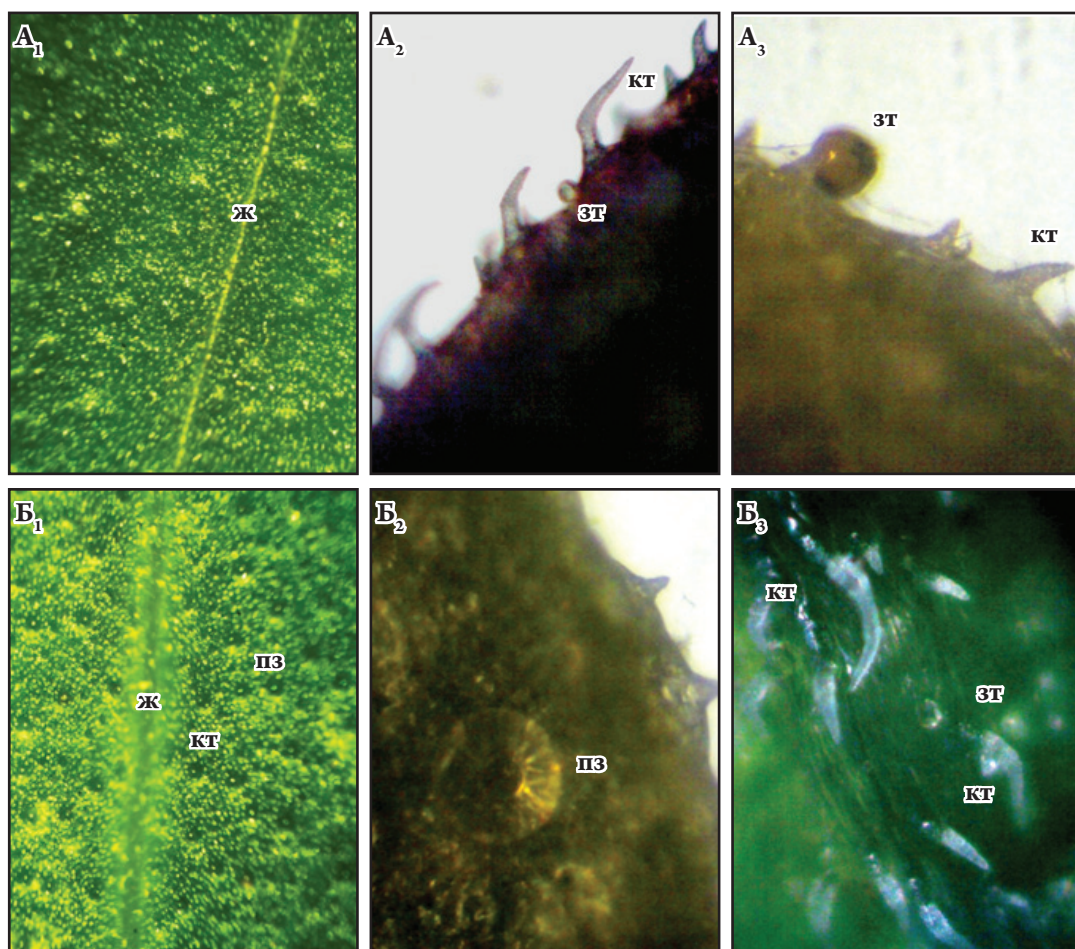


Рис. 3. Вирости епідерми листка *Hyssopus officinalis*: **А** – адаксіальна поверхня; **Б** – абаксіальна поверхня. **ж** – жилка; **зт** – залозисті трихоми; **кт** – криючі трихоми; **пз** – пельтатні залози. **А₁, Б₁** – $\times 60$; **А₂, А₃, Б₂, Б₃** – $\times 128$.

Fig. 3. Outgrowths of the leaf epidermis in *Hyssopus officinalis*: **А** – adaxial surface; **Б** – abaxial surface. **ж** – midrib; **зт** – glandular trichomes; **кт** – indumentary trichomes; **пз** – peltate trichomes. **А₁, Б₁** – $\times 60$; **А₂, А₃, Б₂, Б₃** – $\times 128$.

ланцетними зубцями майже однакової довжини і 15 ребрами, зелена, з антоціановим відтінком. На адаксіальній поверхні чашечки у базальній частині й уздовж ребер відмічено густе опушення із багатоклітинних видовжено-зігнутих трихом, між ребрами – пельтатні залози (Табл. 1; Рис. 4 **А₁, А₂**). На абаксіальній поверхні чашолистків трихоми майже відсутні, а пельтатні залози зустрічаються зрідка (Рис. 4 **А₃, А₄**). На адаксіальній поверхні верхньої губи щільність пельтатних залоз у середній частині трубки складала $15,8 \pm 2,54$ шт./мм², а діаметр – $37,0 \pm 2,83$ мкм. Для адаксіальній поверхні

нижньої губи ці показники становили $15,6 \pm 1,96$ шт./мм² і $35,4 \pm 2,31$ мкм відповідно. На абаксіальній поверхні верхньої губи щільність ефіроолійних залоз складала $9,7 \pm 1,10$ шт./мм², а діаметр – $37,2 \pm 1,23$ мкм. Для абаксіальній поверхні нижньої губи ці показники становили $9,1 \pm 1,88$ шт./мм² і $33,5 \pm 1,43$ мкм відповідно.

Віночок квітки гісопу лікарського двогубий, розміром 12 мм, синьо-фіолетового забарвлення. На адаксіальній поверхні віночка пельтатні залози трапляються лише на його дистальній частині (по краю), а на трубці відсутні (Табл. 1). Їх щільність на

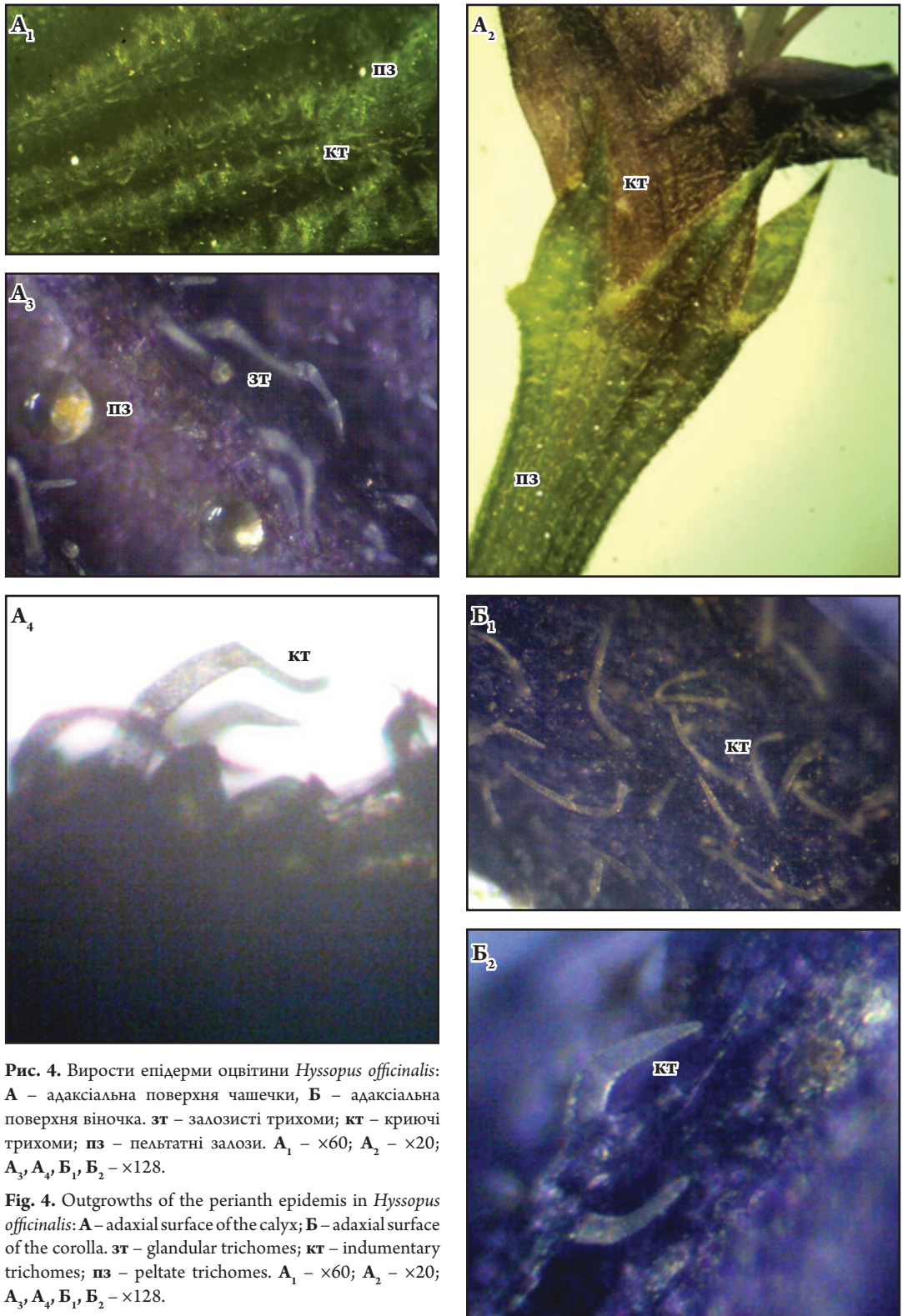


Рис. 4. Вирости епідерми оцвітини *Hyssopus officinalis*: **А** – адаксіальна поверхня чашечки, **Б** – адаксіальна поверхня віночка. **зт** – залозисті трихоми; **кт** – криючі трихоми; **пз** – пельтатні залози. **A₁** – $\times 60$; **A₂** – $\times 20$; **A₃**, **A₄**, **B₁**, **B₂** – $\times 128$.

Fig. 4. Outgrowths of the perianth epidermis in *Hyssopus officinalis*: **A** – adaxial surface of the calyx; **B** – adaxial surface of the corolla. **зт** – glandular trichomes; **кт** – indumentary trichomes; **пз** – peltate trichomes. **A₁** – $\times 60$; **A₂** – $\times 20$; **A₃**, **A₄**, **B₁**, **B₂** – $\times 128$.

верхній губі становить $3,3 \pm 0,59$ шт./мм², а на нижній – $2,6 \pm 0,73$ шт./мм². Їх діаметр становить $39,42 \pm 3,94$ мкм і $37,06 \pm 3,58$ мкм відповідно. Адаксіальна поверхня віночка густо вкрита довгими криючими трихомами. По краю пелюсток абаксіальної поверхні верхньої губи зрідка ($0,9 \pm 0,54$ шт./мм²) виявлено дрібні пельтатні залози, діаметром $27,98 \pm 1,83$ мкм. На абаксіальній поверхні нижньої губи пельтатні залози відсутні (Рис. 4 Б₁, Б₂).

Висновки

У результаті вивчення мікроструктури вегетативних і генеративних органів *H. officinalis* виявлено продиhi діацитного типу та епідермальні вирости: залозисті й криючі трихоми, пельтатні ефіроолійні залози. На стеблi виявлено залозисті голівчасті трихоми і колінозигнуті криючі трихоми, на листках – пельтатні залози і конусоподібні та коліно зигнуті одно- і багатоклітинні трихоми. На чашечці у міжребер'ї наявні пельтатні залози, а ребра густо вкриті криючими і залозистими трихомами. Адаксіальна поверхня віночка вкрита довгими криючими трихомами, пельтатні залози розміщені не щільно по краю, на абаксіальній поверхні нижньої губи секретуючі структури відсутні.

Епідермальні вирости розташовані на всіх надземних органах гісопу лікарського, але їх розподіл нерівномірний. Найбільшу щільність ефіроолійних пельтатних залоз виявлено на адаксіальній поверхні верхньої губи чашечки і абаксіальній поверхні листка. Найменшу щільність залоз виявлено на абаксіальній поверхні верхньої губи віночка. Найбільші за діаметром залози розташовані на адаксіальній поверхні листка, а найменші – на абаксіальній поверхні верхньої губи віночка.

Очевидно, основні секретуючі структури *H. officinalis*, які синтезують ефірні олії, – це листок і чашечка цвітiни. Наявність опушення і ефіроолійних залоз на епідермі органів гісопу лікарського підвищує адаптивні можливості даного виду в умовах інтродукції.

Використані джерела

- БЕЛЕНОВСКАЯ Л.М., КОРХОВ В.В., МАЦ М.Н., МЕДВЕДЕВА Л.И. 1991.** Растительные ресурсы СССР. Цветковые растения, их химический состав, использование. Семейства Hippuridaceae-Lobeliaceae. Наука, Санкт-Петербург.
- [Belenovskaya L.M., Korkhov V.V., Matz M.N., Medvedeva L.I. 1991. Plant sources of USSR. Flowering plants, their chemical composition and application. Families Hippuridaceae-Lobeliaceae. Science, Saint-Petersburg. (In Russian)]
- БОЙКО А.В., ОСТАПКО В.М., ПРИХОДЬКО С.А., МУЛЕНКОВА Е.Г. 2012.** Флористические находки на Юго-Востоке Украины. *Промышленная ботаника* **12**: 107–110.
- [Boiko A.V., Ostapko V.M., Prikhod'ko S.A., Mulenkova E.H. 2012. Floristic findings on South-East of Ukraine. *Industrial botany* **12**: 107–110. (In Ukrainian)]
- ГОМЕНИУК Г.А., ДАНИЛЕНКО В.С., ГОМЕНИУК И.И., ДАНИЛЕНКО И.В. 2001.** Практическое применение лекарственных сборов: справочник. А.С.К., Киев.
- [Homeniuk G.A., Danylenko V.S., Homeniuk I.I., Danilenko I.V. 2001. Practical application of medical collections: A handbook. A.S.K., Kyiv. (In Russian)]
- ЖАРИКОВ В.И., ОСТАПЕНКО А.И. 1994.** Вирощування лікарських, ефіроолійних, пряноароматичних рослин. Вища школа, Київ.
- [Zharikov V.I., Ostapenko A.I. 1994. Introduction of medical, essential, and spicy plants. Higher school, Kyiv. (In Ukrainian)]
- КОТЮК Л.А. 2015.** Онтоморфогенез *Hyssopus officinalis* L. за умов інтродукції в ботанічному саду ЖНАЕУ. *Mod. Phytomorphol.* **7**: 135–146.
- [Kotyuk L.A. 2015. Ontomorphogene is of *Hyssopus officinalis* L. introduced in conditions of ZhNAEU's Botanical Garden. *Mod. Phytomorphol.* **7**: 135–146. (In Ukrainian)]
- КУРБАТОВА Н., МУХИТДИНОВ Н., ТУЯКОВА А., АБИДКУЛОВА К. 2009.** Ботанические и фотохимические исследования *Hyssopus officinalis* L. культивируемого в Казахстане. *Вісник КНУ ім. Т.Г.Шевченка. Інтродукція та збереження рослинного різноманіття* **25-27**: 95–97.
- [Kurbatova N., Mukhitdinov N., Tuyakova A., Abidkulova K. 2009. Botanical and photochemical studies on *Hyssopus officinalis* L. cultivated in Kazakhstan. *Proc. T. Shevchenko Kyiv Nat. Univer. Introd. Protect. Plant Divers.* **25-27**: 95–97. (In Ukrainian)]
- ЛЕВЧИК Н.Я., РАХМЕТОВ Д.Б. 2013.** Классификация, особенности ультраструктуры та функціонування терпеноїдогенних структур ефіроолійних рослин. *Физиология растений и генетика* **45 (5)**: 371–381.

- [Levchyk N.Ya., Rakhmetov D.B. 2013. Classification, peculiarities of ultrastructure and functioning of essential oil plants terpenoidogenous structures. *Plant Physiol. Genet.* 45 (5): 371–381. (In Ukrainian)]
- ЛЕВЧИК Н.Я., РАХМЕТОВ Д.Б. 2014.** Морфологія терпеноїдогенних структур, особливості процесу виділення ефірних олій та продуктивність рослин видів роду *Vitex* L. *Физиология растений и генетика* 46 (1): 56–64.
- [Levchyk N.Ya., Rakhmetov D.B. 2014. Morphology of terpenoidogenous structures, peculiarities of essence oil secretion process and productivity of species *Vitex* L. *Plant Physiol. Genet.* 46 (1): 56–64. (In Ukrainian)]
- МАЛАНКИНА Е.А., КОРЧАШКИНА Н.В. 2007.** Формирование эфиромасличных железок у рода монарда (*Monarda* L.) и их распределение по поверхности листа в связи с продуктивностью растений. *Нетрадиционные природные ресурсы, инновационные технологии и продукты* 14: 67–71.
- [Malankina E.L., Korchashkina N.V. 2007. Formation of essential oil glands in monarda genus (*Monarda* L.) and their distribution on leaf surface in connection with the productivity of plants. *Untraditional Nat. Sources, Innovat. Technol. Product.* 14: 67–71. (In Russian)]
- МИГАЛЬ М.Д., ШУЛЬГА И.А. 2009.** Особенности морфологического строения и секреторной деятельности волосков растений. *Сборник научных трудов Института лубяных культур УААН* 5: 63–75.
- [Mygal M.D., Shul'ga I.L. 2009. Peculiarities of morphological structure and secretory activity of plant trichomes. *Collect. of Sci. Proc. of Institute of Bast Crops Ukr. Agr. Acad. Sci.* 5: 63–75. (In Russian)]
- Мінарченко В.М. 2005. Лікарські судинні рослини України (медичне та ресурсне значення). Фітосоціоцентр, Київ.
- НИКИТИНА А.С. 2008.** Фармакогностическое изучение змеголовника молдавского (*Dracocephalum moldavica* L.) и иссопа лекарственного (*Hyssopus officinalis* L.) с целью обоснования применения в фармации и медицине. Автореф. дис. ... канд. ф. н. Пятигорск.
- [Nikitina A.S. 2008. Farmakognostic study of zmeegolovnik moldavskiy (*Dracocephalum moldavica* L.) and medicinal hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) in order to support their applications in pharmacy and medicine. Proc. of PhD thesis. Piatigorsk.]
- НИКИТИНА А.С., ПОПОВА О.И. 2011.** Исследование три萜пеновых соединений иссопа лекарственного, культивируемого в условиях Ставропольского края. *Фундаментальные исследования* 11 (2): 430–432.
- [Nikitina A.S., Popova O.I. 2011. Research of triterpene compounds of medicinal hyssop, cultivated in the conditions of Stavropol region. *Fundamental Researches* 11 (2): 430–432. (In Russian)]
- НОВИКОВ А., БАРАБАШ-КРАСНИ Б. 2015.** Сучасна систематика рослин. Загальні питання: навчальний посібник. Ліга-Прес, Львів.
- [Novikov A., Barabasz-Krasny B. 2015. Modern plant systematics. General issues. Liga-Press, Lviv. (In Ukrainian)]
- РАБОТЯГОВ В.Д. 1983.** Математическая модель продуктивности лаванды. *Физиология и биохимия культурных растений* 15 (6): 566–571.
- [Rabotiagov V.D. 1983. Mathematical model of lavender productivity. *Physiol. Biochem. Cult. Plants* 15 (6): 566–571. (In Russian)]
- РАБОТЯГОВ В.Д., СВИДЕНКО Л.В., ДЕРЕВЬЯНКО В.Н., БОЙКО М.Ф. 2003.** Эфиромасличные и лекарственные растения, интродуцированные в Херсонской области (эколого-биологические особенности и хозяйственно ценные признаки). Айлант, Херсон.
- [Rabotiagov V.D., Svydenko L.V., Derevianko V.N., Boyko M.F. 2003. Aromatic and medicinal plants, introduced in the Kherson region (ecological and biological characteristics and economic valuable features). Ailant, Kherson. (In Russian)]
- ШАКЕНЕВА Д.К., ПАРШИНА Г.Н. 2014.** Эфиромасличные железки эпидермы листьев некоторых видов семейства *Lamiaceae* L. как диагностический признак. *Наука и образование - 2014 (сб. мат. IX Междунар. науч. конф. студ. и мол. ученых. Астана, 11 апреля 2014 г.):* 3655–3658.
- [Shakeneva D.K., Parshyna H.N. 2014. Essential oil glands of leaf epidermis of some species of the family *Lamiaceae* L. as a diagnostic feature. *Science and Education - 2014. (Proc. of IX Internat. Sci. Conf. of Stud. and Young Sci. Astana, 11 April 2014):* 3655–3658. (In Russian)]
- ШИБКО О.М. 2012.** Изучение локализации эфиромасличных железок у *Hyssopus officinalis* L. *Лісівництво та декоративне садівництво* 171 (1): 268–271.
- [Shybko O.M. 2012. Research of localization of essential oil glands in *Hyssopus officinalis* L. *Forestry and Decorative Gardening* 171 (1): 268–271. (In Russian)]
- DMITRUK M., WERYSZKO-SHMIELEWSKA E. 2010.** Morphological differentiation and distribution of non-glandular trichomes on *Dracocephalum moldavicum* L. on shoots. *Acta Agrobot.* 63: 11–22.
- КОТЮК Л. А. 2015.** Hyssop composition depending on age and plants development phases. *Biotechnol. Acta* 8 (5): 55–63.
- MOON H.-K., HONG S.-P., SMETS E., HUYSMAN S. 2009.** Phylogenetic significance of leaf micromorphology and anatomy in the tribe Menthae (Nepetoideae: Lamiaceae). *Bot. J. Linn. Soc.* 160: 211–231.
- ZAWIŚLAK G. 2013.** Morphological characters of *Hyssopus officinalis* L. and chemical composition of its essential oil. *Mod. Phytomorphol.* 4: 93–95.

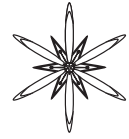
FEATURES OF MICROMORPHOLOGICAL STRUCTURE OF MEDICINAL HYSOPO

LYUDMYLA A. KOTYUK

Abstract. Micromorphological peculiarities of the structure of vegetative and generative organs of *Hyssopus officinalis* were analyzed. The epidermis of *H. officinalis* reveals diacytic stomata and external outgrowths: glandular and covering trichomes, as well as peltate essential oil glands. Capitate and bent indumentary (covering) trichomes occur on the stem, while on the leaves peltate glands, conical and bent uni- and multicellular trichomes were observed. On the calyx, in the midrib region, there are peltate glands while the ribs are densely covered with indumentary and glandular trichomes. The corolla's adaxial surface is covered with long indumentary trichomes, with sparse peltate glands occurring on the margins. The highest density of essential oil peltate glands is found on the adaxial surface of the calyx upper lip (15.8 ± 2.54 pcs./mm²) and on the leaf abaxial surface (13.6 ± 2.40 pcs./mm²). Glands with the largest diameter (47.82 ± 2.82 μm) are located on the leaf adaxial surface.

Key words: *Hyssopus officinalis*, essential oil plant, glandular trichomes, essential oil glands

Zhytomyr National Agroecological University, Stary Boulevard 7, 10008 Zhytomyr, Ukraine; kotyuk-la@ukr.net



УДК 582.998.1 (477.42)

БИОМОРФОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ *SERRATULA CORONATA* L. (ASTERACEAE) ЗА УМОВ ІНТРОДУКЦІЇ В БОТАНІЧНОМУ САДУ ЖНАЕУ

ГРИНА В. ІВАЩЕНКО¹ ТА ДЖАМАЛ Б. РАХМЕТОВ²

Анотація. Встановлено особливості росту, розвитку та морфології рослин *Serratula coronata* L. за умов інтродукції в ботанічному саду Житомирського національного агроекологічного університету, що належить до зони Полісся України. Наведено результати вивчення *S. coronata ex situ* за періодами онтогенезу: латентним, прегенеративним та частково генеративним. Описані ознаки шести вікових станів особин: сім'янки в стані спокою, проростки, ювенільний, іматурний, молодий (ранній) генеративний, середньовіковий (зрілий) генеративний. В перший рік життя сіянці *S. coronata* проходили прегенеративний період онтогенезу. На другий рік рослини вступали в генеративний період, досягаючи середньовікового генеративного стану на третій рік зростання. Рослини *S. coronata* формували вегетативні, генеративні органи, життєздатне насіння, що є свідченням достатнього ступеня адаптації виду до умов регіону.

Ключові слова: *Serratula coronata*, Asteraceae, інтродукція, морфологічні особливості, вікові стани, періоди онтогенезу

¹ Житомирський національний агроекологічний університет, Старий бульвар, 7, м. Житомир, 10008, Україна; kalateja@ukr.net

² Національний ботанічний сад ім. М.М. Гришка НАН України, вул. Тимірязєвська, 1, м. Київ, 01014, Україна; jamal_r@bigmir.net

Вступ

Serratula coronata L. (серпій увінчаний) – багаторічна трав'яна рослина з родини Asteraceae, триби Cynareae Less. (Віслюїна 1965). Поширений цей вид у Середній Азії, Східній Європі, Східному і Західному Сибіру, Кавказі та на Далекому Сході (Соколов 1993; Черепанов 1995). В Україні вид представлений в південній частині Полісся, в Лісостепу, за винятком крайнього заходу, північній частині Степу (Віслюїна 1965; Доброчаєва *и др.* 1987), де рослини зростають розсіяно на сухих луках, по узліссях і в степових чагарниках.

В Україні в культурі серпій увінчаний не вирощують. В народній медицині він використовується при епілепсії, неврозах, новоутвореннях, анемії, геморої, ангіні, блювоті, пропасниці, в якості ранозагоювального засобу (Соколов 1993). Надземна частина

S. coronata містить флавоноїди, сліди алкалоїдів та аскорбінову кислоту (Мінарченко 2005). Амінокислотний склад листків характеризується високим вмістом аспарагінової і глутамінової кислот, а також лейцину, а в бутонах відмічена висока концентрація L-аргініну (Володин 2003). Із *S. coronata*, вирощеної на території України, виділено фітоекдистероїди: 20-гідроксiekдизон (екдистерон), екдизон, поліподин В, інтегристерон А, птеростерон, 20,22-моноацетонід екдистерону і 2,3,20,22-діацетонід екдистерону (Холодова 1979). Фітоекдистероїди являють собою велику групу полігідроксильованих стероїдів, які виявляють анаболічну, адаптогенну, антиоксидантну, мембраностабілізуючу, гепато-, нейро- та нефропротекторну, антиаритмічну, імуномодулюючу, гіпоглікемічну і гіпохолестеролемічну властивості, а також характеризуються низькою токсичністю (Володин 2003).

Актуальним є пошук нових природних джерел фітоекдистероїдів для використання в якості адаптогенних лікарських препаратів, що в значній мірі відновлюють і підвищують працездатність при розумових і фізичних перевтомах (Пчеленко 2002). В надземній частині *S. coronata* сумарний вміст екдистероїдів, залежно від фази вегетації, складає від 0,5% до 1,5%, що на порядок вище, ніж у рапонтікума сафлоровидного (Новосельская и др. 1998).

Застосування серпію увінчаного у фармації як природного джерела фітоекдистероїдів є перспективним та потребує подальшого ретельного вивчення біоморфологічних особливостей і життєвого циклу рослини в умовах культури. Водночас, для умов Житомирського Полісся відсутні відомості щодо введення даного виду рослин в культуру. Тому метою цієї роботи було вивчення онтогенезу, морфо-біологічних особливостей рослин *S. coronata* за інтродукції в ботанічному саду Житомирського національного агроекологічного університету.

Матеріали і методи досліджень

Предметом досліджень були рослини *S. coronata*. Для оцінки адаптивних можливостей нового інтродуцента ми вивчали біоморфологічні особливості розвитку рослин в ботанічному саду ЖНАЕУ. У дослідженнях використовували вихідний матеріал із колекції рослин відділу нових культур Національного ботанічного саду імені М.М. Гришка НАН України. Особливості росту і розвитку рослин вивчали упродовж 2013-2015 рр. згідно із загальноприйнятими методиками (Работнов 1950; Уранов и Смирнова 1969; Серебрякова 1972; Бейдеман 1974; Жукова 2013); якісні показники насіння оцінювали згідно з ДСТУ 7160 – 2010. В описах використано загальноприйнята термінологію з морфології вищих рослин (Артюшенко і Федоров 1986; Новіков і Барабаш-Красни 2015).

Для мікроскопічних досліджень використовували Біолам-70, ВВ5 з USB

камерою та USB цифровий мікроскопи. Фотофіксацію результатів здійснювали за допомогою цифрової фотокамер Canon DC 8.1 V та Levenhuk D 50 L NG.

Біометричні й загальні морфологічні дослідження проводили, розпочинаючи з латентного періоду.

Результати та їх обговорення

S. coronata – багаторічна полікарпічна, симподіальна, з напіврозетковим типом структури надземних пагонів трав'яна рослина (Комаров 1963). Є гемікриптофітом (Харина и Швыдкая 1993), кореневище потужне, горизонтальне, з багаточисленними шнуроподібними коренями. Стебла прямостоячі, високі (до 200 см заввишки), розгалужені, багатогранні й ребристо-борозенчасті; листки від пірчасто-роздільних до розсічених, з 3-7 парами яйцеподібно-або довгасто-ланцетних бічних сегментів. Кошики на кінцях головних пагонів по 1-2, крайові квітки функціонально маточкові, серединні – двостатеві; плід – сім'янка з чубком (Вісюліна 1965). За класифікацією життєвих форм І.Г. Серебрякова *S. coronata* відноситься до трав'яних мичкуватокореневих (китицекореневих або додатковокореневих) полікарпиків (Серебряков 1964; Бек 2009).

Біоморфологічні особливості рослин *S. coronata* висвітлені для кожного із періодів онтогенезу відповідно до конкретного вікового стану. На підставі біоморфологічного аналізу різновікових рослин *S. coronata* описано 6 вікових станів особин і досліджено латентний, прегенеративний та частково генеративний періоди онтоморфогенезу.

Латентний період. Плід *S. coronata* – сім'янка з чубком (паплюсом), коричнювато-світло-бурого кольору, довгасто-клиноподібною форми, з тонкими поздовжніми реберцями, завдовжки $7,13 \pm 0,46$ мм і завширшки $2,33 \pm 0,21$ мм; паплюс – $9,22 \pm 0,86$ мм завдовжки, з рудих зазублених щетинок (Рис. 3 Ж). За типом поширення *S. coronata* – анемохор. Маса 1000 сім'янок становить $3,28 \pm 0,12$ г. Свіжозібране

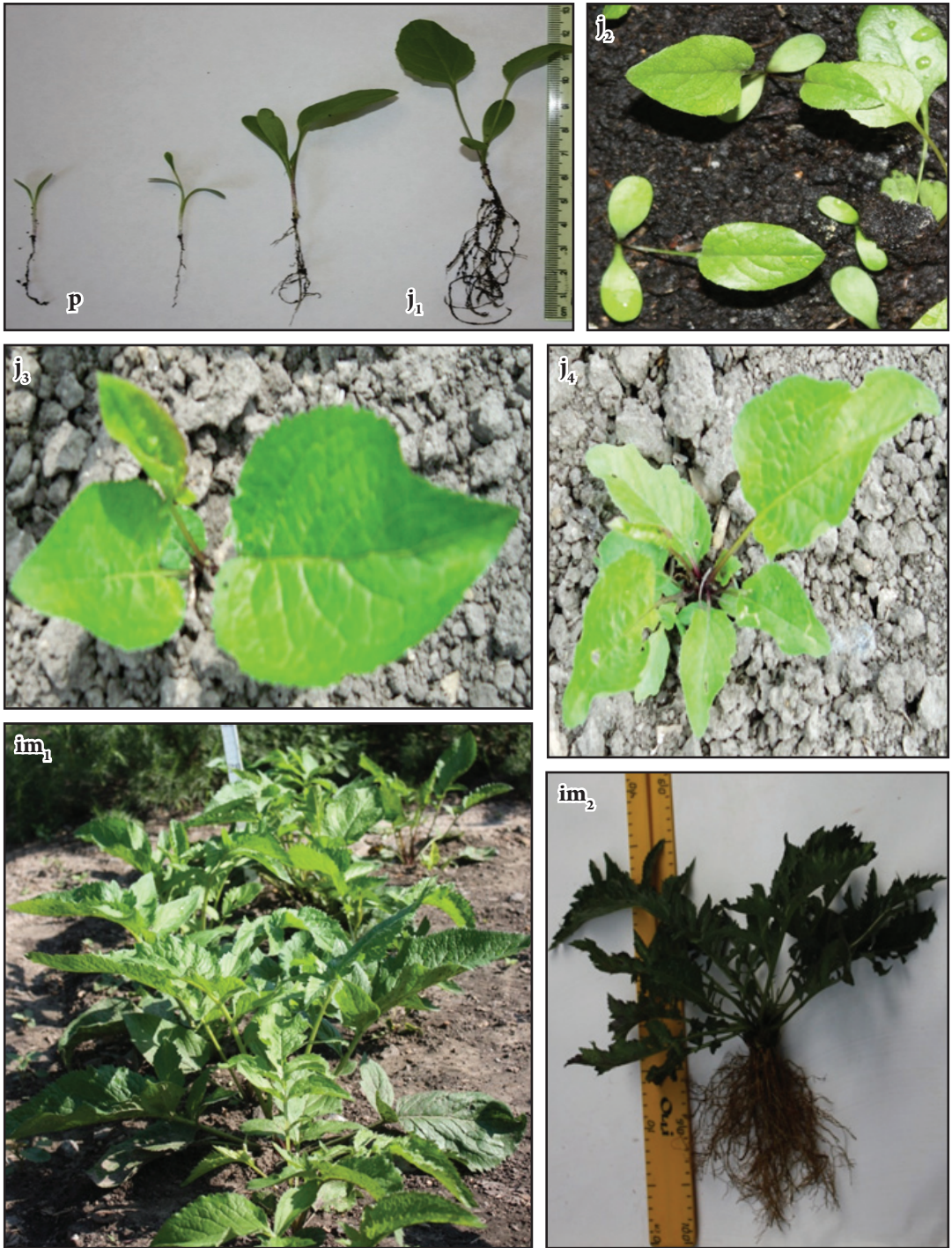


Рис. 1. Прегенеративний період онтогенезу *Serratula coronata*: **p** – проростки; **j₁-j₄** – ювенільні рослини; **im₁-im₂** – імагурні рослини.

Fig. 1. Pregenerative period of ontogenesis of *Serratula coronata*: **p** – sprouts; **j₁-j₄** – juvenile plants; **im₁-im₂** – immature plants.



Рис. 2. Сіяньці *Serratula coronata*: А – другого року життя у генеративний період; Б-Г – третього року життя у фазах весняного відростання, вегетативній і бутонізації відповідно.

Fig. 2. *Serratula coronata* seedlings: А – second year of life in the generative period; Б-Г – third year of life in the phases of spring growth, vegetative, and budding respectively.



Рис. 2. Сіянци *Serratula coronata*. Продовження: Д-Е – третього року життя у фазах цвітіння і плодоношення відповідно.

Fig. 2. *Serratula coronata* seedlings. Continued: Д-Е – third year of life in the phases of blossoming and fruit-bearing respectively.

насіння має низьку схожість і енергію проростання, потребує стратифікації. Згідно з дослідженнями С.А. Бек (2009), свіжозібраному насінню серпю увінчаного достатньо 10 діб зберігання при температурі 5-7 °С для суттєвого підвищення схожості. Через 6 місяців після збирання урожаю лабораторна схожість стратифікованого насіння становила 83%, а енергія проростання – 66%.

Прегенеративний період. Триває від проростання насіння до початку цвітіння; включає наступні вікові стани: проростки, ювенільний, іматурний, віргінійний.

Проростки (р). Весняні посіви серпю увінчаного проводились стратифікованим насінням у третій декаді квітня. Поодинокі сходи спостерігались через 7-10 діб, масові

через 12-16 діб після посіву, залежно від метеорологічних умов. Для серпю увінчаного характерний надземний тип проростання. Насіннева шкірка звичайно залишається в ґрунті, дуже рідко виноситься на поверхню. Сім'ядольні листки цілюкраї, овальної форми, світло-зелені, завдовжки $9,05 \pm 0,25$ мм, завширшки $2,24 \pm 0,11$ мм (Рис. 1: р). Світло-коричневий корінець завдовжки $30,0 \pm 0,8$ мм, не має бічних коренів і значно перевищує гіпокотиль, довжина якого становить $6,95 \pm 0,27$ мм. У більшості проростків гіпокотиль світло-зеленого кольору, іноді має темно-бордове забарвлення. Ріст сім'ядольних листків завершується до моменту розгортання першого справжнього листка – на 11-13 добу. В цей період довжина сім'ядольних листків складає в середньому 25 мм, ширина – 8 мм;

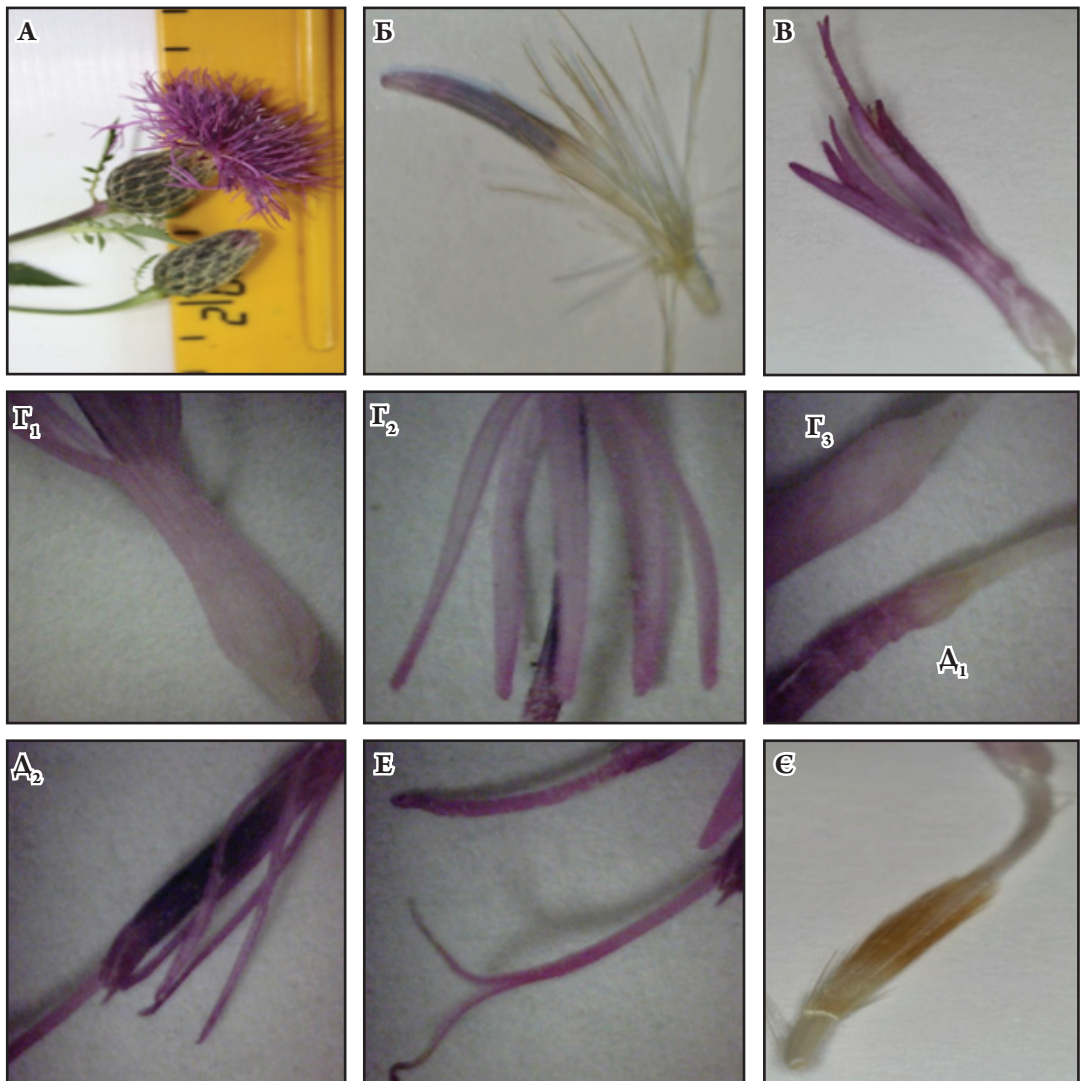


Рис. 3. Морфологічні особливості органів рослин *Serratula coronata*: **A** – суцвіття; **Б** – бутон ($\times 20$); **В** – двостатева квітка ($\times 20$); Γ_1 - Γ_3 – фрагменти віночка двостатевої квітки ($\times 20$); Δ_1 - Δ_2 – фрагменти віночка одностатевої квітки ($\times 20$); **Е** – приймочка ($\times 20$); **Є** – папіус ($\times 20$).

Fig. 3. Morphological features of plants' organs of *Serratula coronata*: **A** – inflorescence; **Б** – bud ($\times 20$); **В** – bisexual flower ($\times 20$); Γ_1 - Γ_3 – fragments of the corolla of the bisexual flower ($\times 20$); Δ_1 - Δ_2 – fragments of the corolla of the unisexual flower ($\times 20$); **E** – stigma ($\times 20$); **Є** – pappus ($\times 20$).

корінь є завдовжки 40 мм, гіпокотиль – 20 мм. Проростки швидко переходять у ювенільний віковий стан.

Ювенільні рослини (j). У ювенільному стані у рослин серпю увінчаного розвиваються перші справжні листки (Рис. 1: j_1 - j_4). Перший ювенільний листок яйцеподібної форми, із зубчастим краєм

листової пластинки, темно-зеленого кольору, завдовжки $37,7 \pm 3,5$ мм, завширшки $24,6 \pm 1,8$ мм. Центральні і бічні жилки добре виражені. Черешок зазвичай червонувато-коричневого кольору. Головний корінь стрижневий, завдовжки $39,6 \pm 2,7$ мм, на ньому спостерігається галузнення та розвиток від 4 до 8 бічних коренів. Другий справжній листок

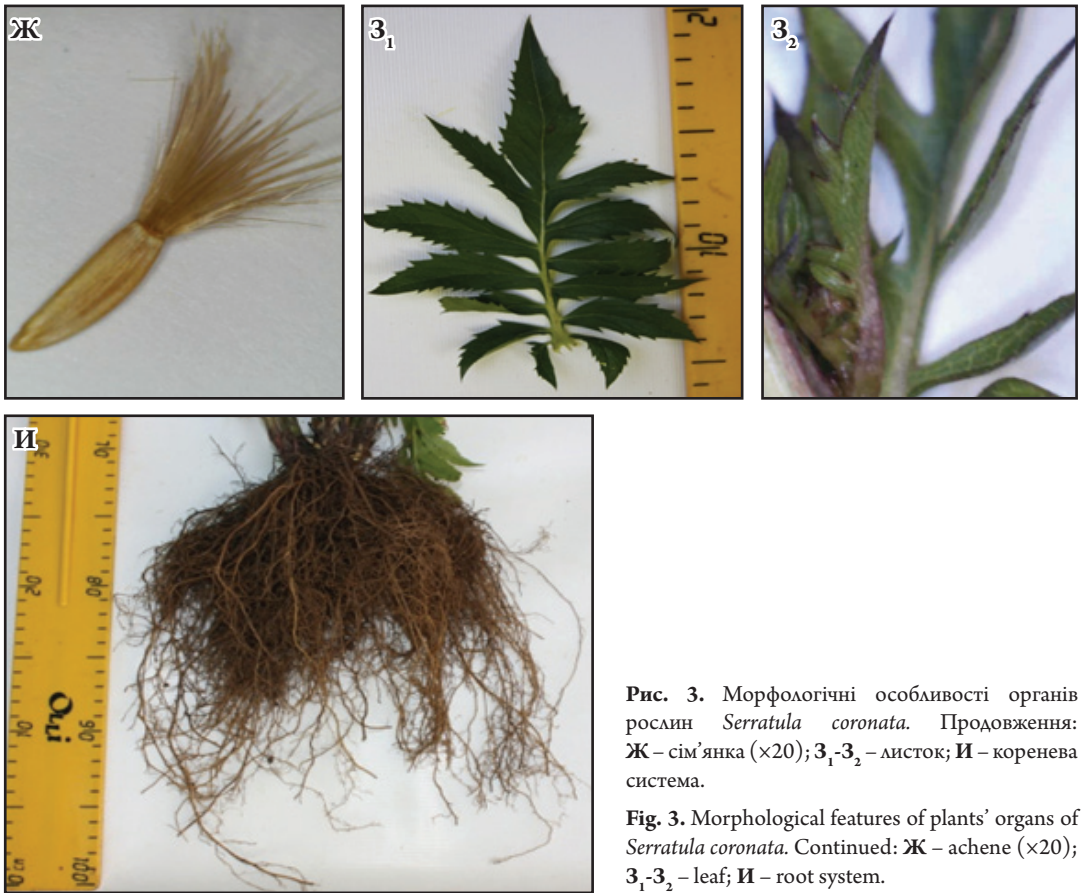


Рис. 3. Морфологічні особливості органів рослин *Serratula coronata*. Продовження: Ж – сім'янка ($\times 20$); З₁-З₂ – листок; И – коренева система.

Fig. 3. Morphological features of plants' organs of *Serratula coronata*. Continued: Ж – achene ($\times 20$); З₁-З₂ – leaf; И – root system.

формується через 22-25 діб після появи проростків. Він також яйцеподібної форми і з зубчастим краєм. Інтервал між формуванням листової пластинки другого і третього справжнього листків складає 12-14 діб. До цього періоду у більшості сіянців починають засихати сім'ядольні листки. Сьомі та восьмі розеткові листки зазвичай трійчаторозсічені завдовжки 15-18 см, завширшки 7-9 см. Висота рослин в ювенільному періоді становила $21,01 \pm 1,25$ см. Коренева система досягала $10,97 \pm 0,92$ см завдовжки, формувались додаткові корені.

Іматурні рослини (ім). У сіянців серпцю увінчаного спостерігалися подальші морфологічні зміни підземних і надземних органів (Рис. 1: ім₁, ім₂). Розвиток кореня супроводжувався зростанням його довжини до $20,39 \pm 0,93$ см, кількості додаткових коренів до 4-6. Особливо помітна зміна форми листка

– формується пірчаторозсічена листовка пластинка із п'яти сегментів, завдовжки $18,97 \pm 1,27$ см і завширшки $9,22 \pm 0,66$ см. Наступні розеткові листки за формою відрізнялись від листків генеративних рослин тільки меншою кількістю сегментів. Нові пірчаторозсічені листки в розетці сіянців з'являлись з інтервалом 7-10 діб до кінця вегетативного періоду. Більшість сіянців до кінця вегетації мали не більше 12-14 листків в розетці. Висота рослин становила $28 \pm 2,16$ см. Сіянці закінчували вегетацію в іматурному віковому стані (Рис. 1: ім₂).

Упродовж першого року життя сіянці ростуть повільно, особливо протягом першого місяця після появи сходів, характеризуються низькою посухостійкістю.

Віргінільні рослини (v). Віргінільні рослини *S. coronata* представлені укороченими вегетативними пагонами із

пірчаторозсіченими листками (Бек 2009). За роки досліджень в умовах Житомирського Полісся у віргінільний віковий стан рослини не вступали. Випадіння віргінільного вікового стану було відмічене також іншими дослідниками за умов інтродукції *S. coronata* в сухостеповій зоні центрального Казахстану (Бек 2009).

Генеративний період. З настанням фази цвітіння і плодоношення на другому році життя особини вступають у генеративний період розвитку. Надалі рослини щорічно проходять малий цикл розвитку, досягаючи на третій рік життя стану середньовікових генеративних особин. В умовах інтродукції генеративний період у особин *S. coronata* значно перевищує прегенеративний.

Молоді генеративні особини (g1). Молоді генеративні рослини характеризувались подальшим формуванням дорослих структур: генеративних пагонів із суцвіттями та мичкуватою кореневою системою.

У сіяців другого року життя фаза весняного відростання наступала в третій декаді березня, бутонізація – в першій декаді червня, цвітіння – у другій декаді липня, плодоношення – в першій декаді серпня. Насіння достигало у третій декаді серпня – першій декаді вересня. У молодих генеративних особин формувалось по 1-3 генеративних пагони висотою $81,44 \pm 8,96$ см, діаметром $6,84 \pm 0,38$ мм біля основи; на основному пагоні зазвичай містилося $3,5 \pm 1,01$ бічних. В прикореневій розетці утворювалось $6 \pm 0,39$ листків (Рис. 2 А). Листки непарнопірчасті, від роздільних до розсічених, з 4-7 парами продовгасто-ланцетних бічних сегментів і більшим за них верхівковим сегментом. Листки зверху голі, темно-зелені або з пурпурватим відтінком, зісподу світліші. Сегменти листків гострокінчикові, по всьому краю пильчасті (Рис. 3: $3_1, 3_2$). На адаксіальній та абаксіальній поверхнях є трихоми (Рис. 4 А-Г). Розеткові листки довгочерешкові, великі; стеблові листки серединної формації короткочерешкові, верхівкові – сидячі. Пластинки листків серединної формації

завдовжки $16,03 \pm 0,54$ см, завширшки $11,03 \pm 0,53$ см. Листкорозміщення почергове. Стебла прямостоячі, розгалужені, багатогранні, пурпурові. На одній рослині формується $10,8 \pm 2,38$ суцвіть, що розміщуються на головних та бічних пагонах по одному, або скупчені по два або три (Рис. 3 А). В середньому довжина кошика становила $3,02 \pm 0,20$ см. Обгортка кошика довгасто-яйцеподібна, $17,97 \pm 1,33$ мм у діаметрі, коричневатопурпурова, повстяно-шерстиста з черепитчасто розміщеними листочками. Зовнішні листочки коротші, ширші, гострокінчикові, ланцетоподібні; внутрішні – довші, лінійчаті. Квітки трубчасті, ліловопурпурові. Крайові квітки функціонально маточкові, з 3-4 стерильними тичинками та, іноді, з три- або чотирироздільним відгином віночка, нечисленні, завдовжки $28,73 \pm 0,55$ мм. Серединні квітки двостатеві, з п'ятироздільним відгином, численні, завдовжки $19,76 \pm 0,52$ мм. (Рис. 3 Б-Є). Віночок одностатевих квіток збільшений та вужчий (Рис. 3: Γ_1 - Γ_3 , Δ_1 - Δ_2). Лопаті приймочки розведені і при досяганні відігнуті назовні (Рис. 3 Е). В середньому один кошик містить $81,7 \pm 11,52$ квіток. Цвітіння розпочинається з верхівкового кошика (базипетальне).

З другого року життя рослини формують мичкувату кореневу систему: головний корінь повністю відмирає, розвивається кореневище з додатковими коренями. Глибина проникнення кореневої системи в ґрунт до кінця другого року життя досягає 20-25 см. Кількість додаткових коренів значно збільшується у порівнянні з першим роком і становить 20-25 шт. Бруньки відновлення знаходяться на глибині 3-4 см.

Відмирання генеративних пагонів розпочинається у фазу плодоношення і закінчується в другій або третій декадах вересня. Період від масового відростання до відмирання надземної частини рослин залежно від метеорологічних умов вегетаційного періоду становить 160-180 діб.

Середньовікові генеративні особини (g2). У цей стан рослини *S. coronata*



Рис. 4. Трихоми на абаксiальній (А-В) та адаксiальній (Г) поверхнях листкової пластинки *Serratula coronata* ($\times 128$).

Fig. 4. Trichomes on the abaxial (A-B) and adaxial (Г) leaf surfaces of *Serratula coronata* ($\times 128$).

вступали на третій рік життя (Рис. 2 Б-Е). За літературними даними він є найтриваліший. Так, в умовах середньотайгової підзони Республіки Комі та сухостепової зони Центрального Казахстану до середньовікових генеративних особин відносили рослини 3-9 років життя (Мишуров *и др.* 1995).

В умовах півдня Томської області вже у п'ятилітніх рослин процеси відмирання переважали над процесами росту, що свідчить про старогенеративний віковий стан (Харина 1990).

У сiянцiв третього року життя фаза весняного вiдростання наступала з третьою

декади березня, бутонізація – першої декади червня, цвітіння – першої декади липня, плодоношення – першої декади серпня. Насіння досягає в третій декаді серпня.

Упродовж інтродукційних досліджень максимальні показники висоти, кількості генеративних пагонів, маси рослин спостерігалися на третій рік життя. У фазі масового цвітіння рослини досягали $136,6 \pm 7,28$ см висоти, маса особини становила $508 \pm 27,77$ г. Пагоноутворююча здатність у рослин *S. coronata* з віком збільшувалась, і на третій рік формувалось $6 \pm 0,68$ генеративних пагонів та $83 \pm 7,36$ суцвіть на одній особині. Зростала також кількість бічних пагонів до $9,4 \pm 1,47$. Формувалась більш потужна коренева система. Укорочене кореневище досягало 7-10 см завдовжки; значно зростала кількість додаткових коренів до 50-60, глибина їх проникнення в ґрунт сягала 30-35 см (Рис. 3 И). За кількістю сегментів, розмірами листової пластинки, середньовікові генеративні особини не відрізнялись від молодих генеративних, проте кількість листків в прикореневій розетці збільшилась майже вдвічі.

Тривалість середньовікового генеративного стану в умовах Житомирського Полісся за період інтродукційних досліджень не встановлена.

Висновки

В період досліджень (2013-2015 рр.) встановлено, що за інтродукції в ботанічному саду Житомирського агроекологічного університету для великого життєвого циклу *S. coronata* властиво три періоди розвитку (латентний, прегенеративний і генеративний) та 6 вікових станів (сім'янки в стані спокою, проростки, ювенільні рослини, імагурні рослини, молоді генеративні рослини, середньовікові генеративні рослини). В перший рік життя сіянці серпію увіччаного проходили прегенеративний період онтогенезу. На другий рік вегетації рослини вступали в генеративний період, досягаючи середньовікового генеративного стану на третій рік. Рослини *S. coronata*

формували як вегетативні, так і генеративні органи, а також життєздатне насіння, що є свідченням достатнього ступеня адаптації виду до умов регіону.

Використані джерела

- АРТЮШЕНКО З.Т., ФЕДОРОВ А.А. 1986.** Атлас по описательной морфологии высших растений. Плод. Наука, Лен. отд., Ленинград.
[Artyushenko Z.T., Fedorov A.A. 1986. Atlas of descriptive morphology of higher plants. Fruit. Science, Leningrad dept., Leningrad. (In Russian)]
- БЕЙДЕМАН И.Н. 1974.** Методика изучения фенологии растений и растительных сообществ. Наука, Новосибирск.
[Beydeman I.N. 1974. The methods of study of the phenology of plants and plant communities. Science, Novosibirsk. (In Russian)]
- БЕК С.А. 2009.** Биологические особенности *Serratula coronata* L. и ее интродукция в сухостепной зоне центрального Казахстана. Дисс. на соискание ученой степени канд. биол. наук. Томск.
[Bek S.A. 2009. Biological features of *Serratula coronata* L. and its introduction in dry-steppe zone of Central Kazakhstan. PhD thesis. Tomsk. (In Russian)]
- ВИСЮЛИНА О.Д. (ред.) 1965.** Флора УРСР. Т. XII. Вид-во АН УРСР, Київ.
[Visjulina O.D. (ed.) 1965. Flora of URSR. Vol. XII. Publ. of AS of URSR, Kyiv. (In Ukrainian)]
- ВОЛОДИН В.В. (ред.) 2003.** Фитоэктоиды. Наука, Санкт-Петербург.
[Volodin V.V. (ed.) 2003. Phytoecdisteroids. Science, Saint-Petersburg. (In Russian)]
- ДОБРОЧАЕВА Д.Н., КОТОВ М.И., ПРОКУДИН Ю.Н. и др. 1987.** Определитель высших растений Украины. Наук. думка, Киев.
[Dobrochaeva D.N., Kotov M.I., Prokudin Yu.N. et al. 1987. Identification key for higher plants of Ukraine. Naukova Dumka, Kyiv. (In Russian)]
- ДСТУ 7160 – 2010.** Насіння овочевих, баштанних, кормових і пряно-ароматичних культур. Сортові та посівні умови. Технічні умови. (Чинний від 2010-07-01). Держспоживстандарт України (Національний стандарт України), Київ.
[SSTU 7160 – 2010. Seeds of vegetables, melons, fodder and aromatic plants. Varieties and crop conditions. Technical specifications. (Effective as of 2010-07-01). Derzhspozhyvchstandart Ukrainy (National standart of Ukraine), Kyiv. (In Ukrainian)]
- ЖУКОВА Л.А. 2013.** Онтогенетический атлас растений. Т. VII. Марийский гос. ун-тет, Йошкар-Ола.
[Zhukova L.A. 2013. Ontogenetical atlas of plants. Vol. VII. Mari State University, Yoshkar-Ola. (In Russian)]

- КОМАРОВ В.А. (ред.) 1963.** Флора СССР. Т. XXVIII. Изд-во АН СССР, Москва – Ленинград.
[Komarov V.L. (ed.) 1963. Flora of USSR. Vol. XXVIII. Publ. of AS of USSR, Moscow – Leningrad. (In Russian)]
- МІНАРЧЕНКО В.М. 2005.** Лікарські судинні рослини України (медичне та ресурсне значення). Фітосоціоцентр, Київ.
[Minarchenko V.M. 2005. Medical vascular plants of Ukraine (medicinal and resource values). Phytosociocenter, Kyiv. (In Ukrainian)]
- МИШУРОВ В.П., ПОРТНЯГИНА Н.В., РУБАН Г.А. 1995.** Интродукция серпухи венценосной на Севере. В сб.: Интродукция растений на европейском Северо-Востоке: 91–100. Сыктывкар.
[Mishurov V.P., Portniagina N.V., Ruban G.A. 1995. Introduction of plumeless saw-wort on North. In: Introduction of plants on european North-East : 91–100. Syktyvkar. (In Russian)]
- НОВИКОВ А., БАРАБАШ-КРАСНИ Б. 2015.** Сучасна систематика рослин. Загальні питання: навчальний посібник. Ліга-Прес, Львів.
[Novikov A., Barabasz-Krasny B. 2015. Modern plant systematics. General issues. Liga-Press, Lviv. (In Ukrainian)]
- НОВОСЕЛЬСКАЯ И.А., ГОРОВИЦ М.Б., АБУБАКИРОВ Н.К. 1998.** Фитоэcdистероиды *Serratula coronata*. Химия природных соединений 5: 668–669.
[Novoselskaya I.L., Gorovits M.B., Abubakirov N.K. 1998. Phytoecdisteroids of *Serratula coronata*. Chemistry of Natural Compounds 5: 668–669. (In Russian)]
- ПЧЕЛЕНКО Л.Д. 2002.** Адаптогенный эффект эcdистероидов серпухи венценосной. Вестник Ин-та биологии Коми НЦ УрОРАН 1: 2–4.
[Pchelenko L.D. 2002. Adaptogenic effect of ecdisteroids of plumeless saw-wort. News Inst. Biol. Sci. Center UrORAN 1: 2–4. (In Russian)]
- РАБОТНОВ Т.А. 1950.** Жизненный цикл многолетних травянистых растений в луговых ценозах. Труды Ботанического ин-та АН СССР 3 (6): 7–204.
[Rabotnov T.A. 1950. Life cycle of perennial herbaceous plants in the meadow coenoses. Works of Botanical Institute of AS USSR 3 (6): 7–204. (In Russian)]
- СЕРЕБРЯКОВ И.Г. 1964.** Жизненные формы высших растений и их изучение. В кн.: Корчагин А.А., Лавренко Е.М. (ред.), Полевая геоботаника. Наука, Москва – Ленинград.
[Serebriakov I.G. 1964. Life forms of higher plants and their research. In: Korchagin A.A., Lavrenko E.M. (eds), Field geobotany. Science, Moscow – Leningrad. (In Russian)]
- СЕРЕБРЯКОВА Т.И. 1972.** Учение о жизненных формах растений на современном этапе. Итоги науки и техники. Серия Ботаника 1: 84–169.
[Serebriakova T.I. 1972. The study about life forms of the plants on current stage. The results of science and technology. Ser. Botany 1: 84–169. (In Russian)]
- СОКОЛОВ П.Д. (ред.) 1993.** Растительные ресурсы СССР: цветковые растения, их химический состав, использование. Семейство Asteraceae. Наука, Санкт-Петербург.
[Sokolov P.D. (ed.) 1993. Plant resources of USSR: Flowering plants, their chemical composition, and application. Family Asteraceae. Science, Saint-Petersburg. (In Russian)]
- УРАНОВ А.А., СМІРНОВА О.В. 1969.** Классификация и основные черты развития популяций многолетних растений. Бюлл. МОИП. Отд. биол. 79 (1): 19–135.
[Uranov A.A., Smirnov O.V. 1969. Classification and general characters of the development of populations of perennial plants. Bull. MOIP. Otd. Biol. 79 (1): 19–135. (In Russian)]
- ХАРИНА Т.Г. 1990.** Эколого-биологические особенности серпухи венценосной в связи с интродукцией в Западной Сибири: автореф. дис... канд. биол. наук. Новосибирск.
[Kharina T.G. 1990. Eco-biological peculiarities of plumeless saw-wort in relation with introduction in Western Siberia. Proc. of PhD thesis. Novosibirsk. (In Russian)]
- ХАРИНА Т.Г., ШВЫДКАЯ Н.В. 1993.** Онтогенетический аспект в изучении лекарственных растений в целях интродукции. Экологические проблемы интродукции растений на современном этапе: Вопросы теории и практики (тезисы докл. Междунар. науч. конф., Краснодар, 1993). Ч. 1: 427–430. Краснодар.
[Kharina T.G., Shvydkaya N.V. 1993. Ontogenetical aspect in study of medical plants with a purpose of introduction. Ecological problems of introduction of the plants on current stage: The questions of theory and practice (Proc. of Internat. Sci. Conf, Krasnodar, 1993). Part 1: 427–430. (In Russian)]
- Холодова Ю.Д. 1979.** Фитоэcdизоны – биологически активные полигидроксилированные стерины. Укр. биохим. журн. 51 (5): 560–575.
[Kholodova Yu.D. 1979. Phytoecdizones - bioactive polihydroxylated sterins. Ukr. Biochem. J. 51 (5): 560–575. (In Russian)]
- ЧЕРЕПАНОВ С.К. 1995.** Сосудистые растения России и сопредельных государств. Мир и семья – 95, Санкт-Петербург.
[Cherepanov S.K. 1995. Vascular plants of Russia and adjacent countries. Mir i semia – 95, Saint-Petersburg. (In Russian)]

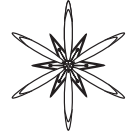
BIOMORPHOLOGICAL FEATURES OF *SERRATULA CORONATA* L. (ASTERACEAE) INTRODUCED IN ZHNAEU' S BOTANICAL GARDENIRYNA V. IVASHCHENKO¹ & DZAMAL B. RAKHMETOV²

Abstract. Peculiarities of growth, evolution and morphology of *Serratula coronata* L. were determined under introduction in conditions of Botanical Garden of Zhytomyr National Agroecological University that belongs to Polissya region of Ukraine. The results of investigation of *S. coronata ex situ* are presented for the next periods of ontogenesis: latent, pregenerative and partly generative. The features of the 6 age states of individuals are specified: achen dormant, sprouts, juvenile, immature, young generative, middle-aged generative. During the first year of life the seeds of *S. coronata* were passing the pregenerative period of ontogenesis. In the second year the plants got into generative period achieving middle-aged generative state in the third year of growth. Plants of *S. coronata* formed vegetative and generative organs, as well as viable seeds and that confirms sufficient species adaptation in conditions of the described region.

Key words: *Serratula coronata*, Asteraceae, introduction, morphological peculiarities, age states, periods of ontogenesis

¹ Zhytomyr National Agroecological University, Stary Boulevard 7, 10008 Zhytomyr, Ukraine; kalateja@ukr.net

² M.M. Gryshko National Botanical Garden NAS of Ukraine, Timiryazivska str. 1, 01014 Kyiv, Ukraine; jamal_r@bigmir.net



УДК 582.949.4: 581.4

**МОРФОСТРУКТУРА СУЦВІТЬ *AGASTACHE BREVIFLORA*
(A. GRAY) EPLING, A. RUGOSA (FISCH. & C.A. MEY.)
KUNTZE TA A. RUPESTRIS (GREENE) STANDL.
(РОДИНА LAMIACEAE) EX SITU**

Галина О. Рудік

Анотація. Наведено результати порівняльного аналізу морфоструктури суцвіть *Agastache breviflora*, *A. rugosa* та *A. rupestris* у Ботанічному саду ім. акад. О.В. Фоміна. Встановлено, що спільними морфологічними ознаками суцвіть рослин є: тип суцвіття (тирс), його розташування на пагоні (термінальне), тип наростання головної й бічних осей (моноподіальне наростання головної осі та симподіальне наростання бічних осей, на яких формуються парціальні суцвіття – цимоїди), будова парціальних суцвіть (система дихазіїв). Відмінності проявляються у лінійних розмірах суцвіть, чисельності та розмірах квіток у парціальних суцвіттях, орієнтації у просторі головної осі й квіток, наявності або відсутності брактей і брактеолей.

Ключові слова: *Agastache breviflora*, *Agastache rugosa*, *Agastache rupestris*, суцвіття, тирс, дихазії

ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Ботанічний сад ім. акад. О.В. Фоміна; вул. С. Петлюри, 1, Київ, 01032, Україна; rudik_gala@ukr.net

Вступ

Дослідження репродуктивних структур рослин, зокрема суцвіть, є одним із класичних напрямків морфології рослин. Існуючі сьогодні системи опису та класифікації, різноманіття трактовок термінів і понять морфології суцвіть викликають необхідність детального дослідження флоральної структури представників окремих таксономічних груп. Нашу увагу привернули види роду *Agastache* Clayt. ex Gronov. (родина Lamiaceae). Рід налічує 22 види, які розподілено на дві секції: *Agastache* (8 видів) та *Brittonastrum* (Briq.) Lint & Epling (14 видів) (Буданцев 1993). Більшість рослин у природі зростають в Північній Америці, один вид (*A. rugosa* (Fisch. & C.A. Mey.) Kuntze) – у Південно-Східній Азії, на Далекому Сході Росії (Wu 1994). Рослини використовують в якості ефіроолійних, лікарських, пряно-ароматичних, медоносних та декоративних культур.

У літературних джерелах зустрічаються розбіжності стосовно морфологічної характеристики типу суцвіть рослин даного роду: «ложные мутовки скучены... в плотные цилиндрические соцветия»

(КОМАРОВ 1954), «inflorescences are usually spike-like being composed of very compact verticillasters» (FUENTES-GRANADOS 1997), «inflorescence thyrsoid, terminal, spike-like or panicle-like» (HARLEY et al. 2004). Результати детального вивчення морфології суцвіть представників роду *Agastache* можуть суттєво допомогти при вирішенні питань філогенії і систематики та ідентифікації видів, що особливо важливо при проведенні інтродукційних досліджень. Таким чином, метою нашої роботи став порівняльний аналіз морфологічної будови та структурований опис морфологічних ознак суцвіть представників роду *Agastache ex situ*.

Матеріали і методи досліджень

Об'єктами наших досліджень були суцвіття *Agastache breviflora* (A. Gray) Epling, *A. rugosa* та *A. rupestris* (Greene) Standl., інтродукованих у Ботанічному саду ім. акад. О.В. Фоміна. Рослини вирощували в умовах відкритого ґрунту розсадним методом з насіння (еремів), отриманого згідно з насінневими списками. Спостереження проводили протягом 2013-2015 рр.

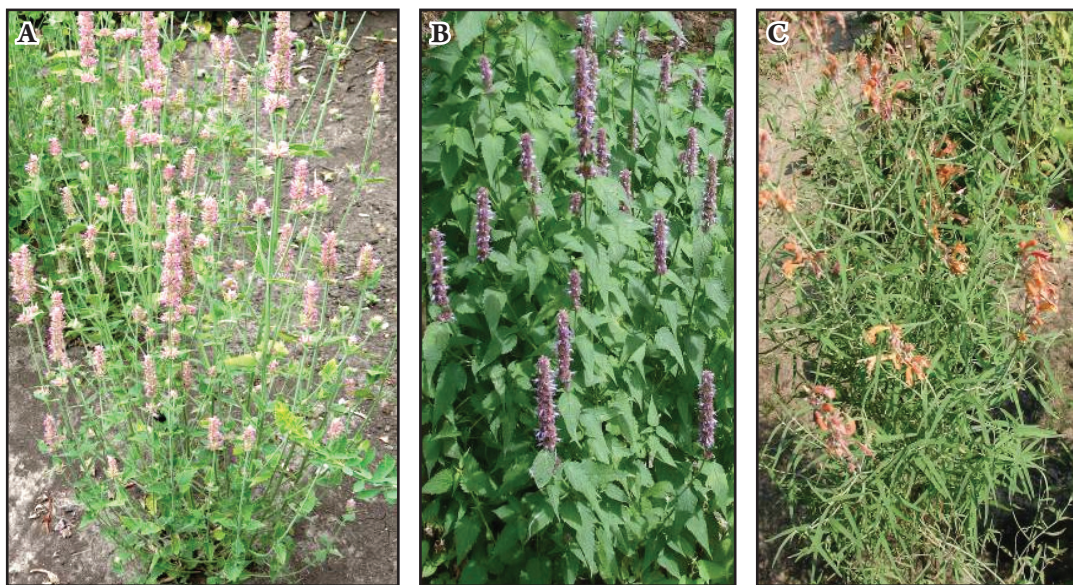


Рис. 1. Загальний вигляд рослин: А – *Agastache breviflora*; В – *A. rugosa*; С – *A. rupestris*.

Fig. 1. General view of plants: А – *Agastache breviflora*; В – *A. rugosa*; С – *A. rupestris*.

Характеристику морфологічних ознак суцвіть надано з використанням загальноприйнятої термінології (ФЕДОРОВ И АРТЮШЕНКО 1979; ЗИМАН *та ін.* 2004). Аналіз структури суцвіть надано з позицій фізіономічного і типологічного підходів (КУЗНЕЦОВА 1992).

Результати та їх обговорення

В умовах лабораторії в чашках Петрі ереми починали проростати через 3-4 доби. Рослини у стані проростків висаджували у пікірувальні ящики в теплиці, де вони проходили ювенільний та імагурний етапи розвитку. В І декаді травня рослини переносили у відкритий ґрунт на постійне місцезростання. Рослини *A. breviflora* та *A. rugosa* при інтродукції характеризувались швидкими темпами розвитку: протягом першого року життя особини проходили три періоди онтоморфогенезу: латентний, віргінільний та генеративний. У рослин *A. rupestris* генеративний період починався протягом другого року життя.

Описові характеристики суцвіть базуються на таких основних морфологічних ознаках, як розташування на пагоні, ступінь та характер галуження головної й бічних осей, тип наростання, будова головної та бічних осей,

чисельність та компактність квіток, орієнтація головної осі й квіток у просторі, наявність чи відсутність приквіток.

Флоральна зона вегетативно-генеративних монокарпічних пагонів всіх досліджених рослин представлена складним політелічним термінальним суцвіттям – тирсом з моноподіальним наростанням головної осі та симподіальним наростанням бічних осей. На бічних осях формуються парціальні бічні суцвіття цимоїдного типу (цимоїди), утворені сукупністю дихазіїв. Залежно від довжини базального міжвузля бічних осей, тирс у рослин може бути колосоподібним (базальна частина бічної осі редукована) або китицеподібним (базальна частина бічної осі видовжена). У напрямку до верхівки суцвіття відбувається зменшення галуження бічних осей та кількості квіток у цимоїдах. Суцвіття фрондулозно-брактеозні з маленькими зеленими приквітками (брактеями) та ланцетними приквіточками (брактеолами) або брактеозні з шилоподібними приквіточками (брактеолами).

***Agastache breviflora*.** Рослини компактні, ортотропні, 30-75 см заввишки, з численними суцвіттями (Рис. 1 А). В умовах Києва є трав'янистими полікарпіками-

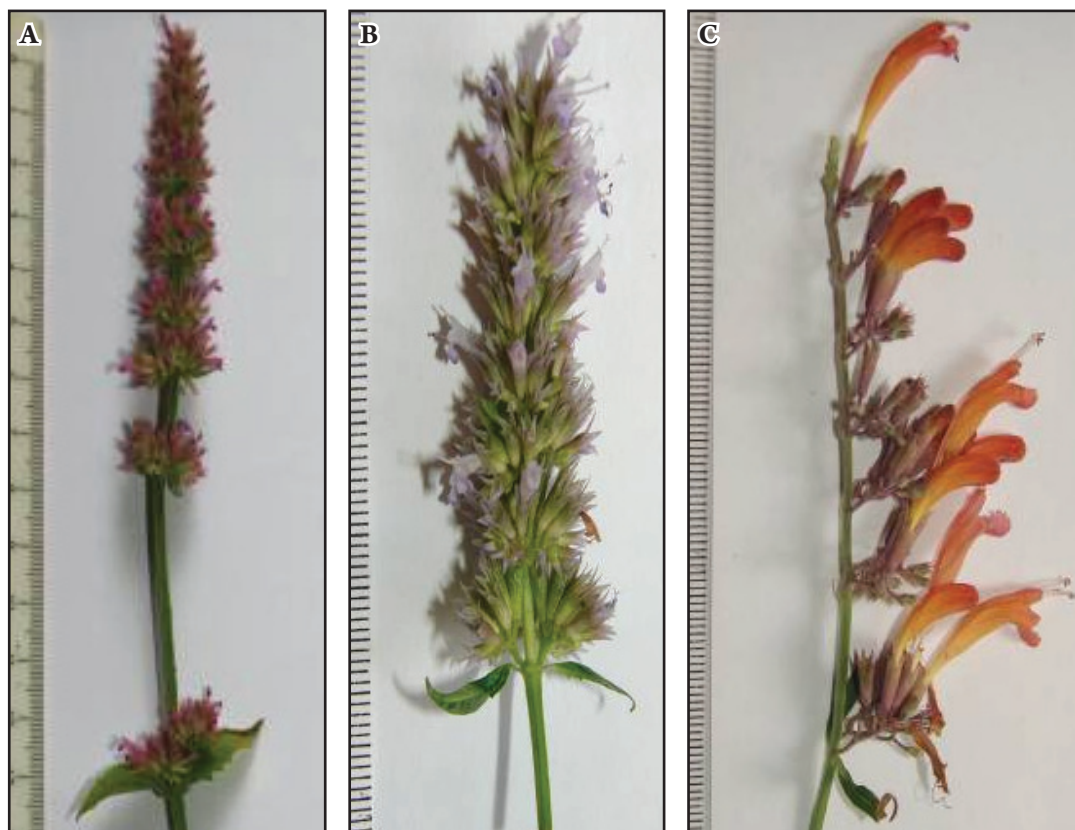


Рис. 2. Окреме суцвіття: А – *Agastache breviflora*; В – *A. rugosa*; С – *A. rupestris*.

Fig. 2. Single inflorescence of: А – *Agastache breviflora*; В – *A. rugosa*; С – *A. rupestris*.

гемікриптофітами, надземна частина яких взимку відмирає, а бруньки поновлення розташовані на базальних частинах пагонів у верхніх шарах ґрунту. У ІІ декаді червня на верхівках пагонів спостерігали формування генеративних структур (фаза бутонізації), цвітіння починалось у І декаді липня і тривало до ІІ декади вересня. Квітки зібрані у верхівкове суцвіття – колосоподібний багатоквітковий монотирс 2-13 см завдовжки. Віночок трубчастий, рожево-пурпурового кольору, 0,6-0,9 см завдовжки; чашечка трубчато-дзвоникоподібна, рожево-бузкова, 0,5-0,7 см завдовжки. Тичинки не виступають назовні віночка. В базальній частині головної осі суцвіття переривчасте, довжина першого від основи міжвузля 3-5 см, другого – 1-1,5 см (Рис. 2 А). Бічні цимоїди нараховують від 7 до 19 квіток, фізіономічно мають форму плейохазія (Рис. 3 А). Проте при більш детальному вивченні можна побачити, що

цимоїд є складною системою численних дихазіїв із вкороченими міжвузлями бічних осей (Рис. 3 А). У процесі морфогенезу на осі першого порядку цимоїда під термінальною квіткою формується пара навхрест розташованих дихазіїв, на яких надалі послідовно розвиваються наступні пари дихазіїв (до 5-6 порядків). Квітки знаходяться на різних стадіях розвитку, більша частина квіток редукована і не цвіте. За наявності приквіток і приквіточок суцвіття є фрондулозно-брактеозном, оскільки верхівкові листки значно менші порівняно зі стебловими, сидячі, у цимоїдах присутні видозмінені ланцетоподібні приквітки (брактеї). В акропетальному напрямку спостерігали спрощення будови цимоїдів і зменшення в них кількості квіток. Згідно сукупності морфологічних ознак суцвіття *A. breviflora* можна охарактеризувати як термінальний політелічний багатоквітковий

щільний колосоподібний фрондулозно-брактеозний монотирс.

Agastache rugosa. Рослини ортотропні, розгалужені, 80-90 см заввишки (Рис. 1 В). В умовах Києва є трав'янистими полікарпіками-гемікриптофітами. У I декаді липня на апексах головного і бічних пагонів починали формуватись генеративні структури (фаза бутонізації), цвітіння тривало з II декади липня до III декади жовтня. Квітки зібрані у верхівкове суцвіття – колосоподібний багатоквітковий монотирс 3-15 см завдовжки (Рис. 2 В). Чашечка трубчато-дзвоникоподібна, бузкового кольору, 0,5-0,8 см завдовжки. Віночок бузково-ліловий, 0,6-1,0 см завдовжки, тичинки виступають назовні з трубки віночка. Бічні цимоїди нараховують від 9 до 23 квіток. Морфоструктура цимоїдів *A. rugosa* подібна до структури цимоїдів *A. breviflora* і теж є складною системою численних дихазій із вкороченими міжвузлями бічних осей (Рис. 3 В). Суцвіття має брактеї і брактеолі. Також в акропетальному напрямку спостерігали спрощення будови цимоїдів і зменшення в них кількості квіток. Суцвіття *A. rugosa* можна охарактеризувати як термінальний політелічний багатоквітковий щільний колосоподібний фрондулозно-брактеозний монотирс.

Agastache rupestris. Рослини компактні, 50-70 см заввишки, цвітіння щорічне з утворенням життєздатного насіння (Рис. 1 С). У природі запилюються метеликами й колібрі. В умовах Києва звичайно є трав'янистими полікарпіками-гемікриптофітами, проте окремі екземпляри можуть бути напівкущиками при умові теплої зими. Надземна частина взимку відмирає, бруньки поновлення розташовані на базальних частинах пагонів у верхніх шарах ґрунту. Рослини зимостійкі, зимують без укриття. Фазу бутонізації спостерігали у II декаді червня, цвітіння починалось у III декаді червня і тривало до I декади вересня. Квітки зібрані у верхівкове суцвіття – видовжений однобічний монотирс, 8-10 см завдовжки (Рис. 2 С). Міжвузля головної осі – 1-2 см завдовжки. Рослини 2-го року життя

утворювали поодинокі суцвіття, особини 3-го року – до 20-25 суцвіть. Віночок витягнуто-трубчастий, рожево-помаранчевого кольору, 3,0-3,5 см завдовжки; чашечка трубчата, бузково-фіолетового кольору, 0,7-0,8 см завдовжки. Тичинки виступають назовні віночка. За кількістю квіток суцвіття є малоквітковим порівняно з *A. breviflora* і *A. rugosa*. Бічні цимоїди нараховують від 3 до 15 квіток, які знаходяться на різних стадіях розвитку. Цимоїди на базальній частині суцвіття фізіономічно мають форму подвійного дихазія (Рис. 3 С). За розмірами квіток суцвіття є великоквітковим, за наявністю приквітточок – брактеозним (несе видозмінені дрібні шилоподібні брактеолі, брактеї відсутні). В акропетальному напрямку спостерігали спрощення будови парціальних суцвіть, які в апікальній частині суцвіття набували вигляду простого дихазія. Тип суцвіття *A. rupestris* можна визначити як термінальний політелічний великоквітковий видовжений китицеподібний однобічний брактеозний монотирс.

Таким чином, згідно спільних морфологічних ознак, тип суцвіття досліджених видів можна визначити як термінальний політелічний монотирс з моноподіальним наростанням головної осі та симподіальним наростанням бічних осей, на яких формуються парціальні бічні суцвіття цимоїдного типу (цимоїди), утворені сукупністю дихазій. Відмінності проявляються у кількісних показниках (розміри суцвіть, чисельність і розміри квіток у цимоїдах), будові головної та бічних осей, орієнтації головної осі й квіток у просторі, наявності або відсутності брактей і брактеолей.

Слід зазначити, оскільки класифікація цимоїдних суцвіть типів дихазій і монохазій не розроблена, у роботі присвяченій вивченню морфології суцвіть рослин роду *Verbascum* (Берко і Грицина 2009), запропоновано вживання таких дефініцій як «множинний потенційно складний дихазій», «множинний простий дихазій з монохазіями» в якості підтипів суцвіть даних типів. Цей підхід заслуговує на увагу при подальших дослідженнях морфоструктури суцвіть представників родини Lamiaceae.



Рис. 3. Цимойди: А – *Agastache breviflora*; В – *A. rugosa*; С – *A. rupestris*.

Fig. 3. Cymoids of: А – *Agastache breviflora*; В – *A. rugosa*; С – *A. rupestris*.

Висновки

При інтродукції в Ботанічному саду ім. акад. О.В. Фоміна рослини *A. breviflora*, *A. rugosa* та *A. rupestris* є трав'янистими полікарпіками-гемікріптофітами, які послідовно проходили всі етапи онтогенезу і сезонного розвитку, цвіли і плодоносили з утворенням життєздатного насіння.

Виявлено, що згідно сукупності морфологічних ознак суцвіття *A. breviflora* і *A. rugosa* можна охарактеризувати як термінальний політелічний багатоквітковий щільний колосоподібний фрондулозно-брактеозний монотирс, а суцвіття *A. rupestris* – як термінальний політелічний великоквітковий видовжений китицеподібний однобічний брактеозний монотирс.

Встановлено, що спільними морфологічними ознаками суцвіть цих рослин є: розташування на пагоні (термінальне), тип наростання головної й бічних осей (моноподіальне наростання головної осі та симподіальне наростанням бічних осей, на яких формуються парціальні суцвіття цимоїдного типу), будова парціальних суцвіть (система дихазіїв). Відмінності проявляються у лінійних розмірах суцвіть, чисельності та розмірах квіток у цимоїдах, орієнтації у просторі головної осі й квіток, наявності або відсутності брактей і брактеолей.

Використані джерела

- БЕРКО Й.М., ГРИЦИНА М.Р. 2009.** Розвиток і морфоструктура парціального суцвіття *Verbascum phlomoides* L. (Scrophulariaceae). *Укр. ботан. журнал* **66** (6): 794–804.
- [Berko Y.M., Hrytsyna M.R. 2009. The development and morphostructure of partial inflorescence of *Verbascum phlomoides* L. (Scrophulariaceae) *Ukr. Bot. J.* **66** (6): 794–804. (In Ukrainian)]
- БУДАНЦЕВ А.Л. 1993.** Конспект триби Nepeteae (Lamiaceae). Роды *Lophanthus*, *Dracocephalum*, *Cedronella*, *Schizonepeta* и *Agastache*. *Ботан. журнал* **78** (8): 106–115.
- [Budantsev A.L. 1993. A synopsis of the tribe Nepeteae (Lamiaceae). The genera *Lophanthus*, *Dracocephalum*, *Cedronella*, *Schizonepeta* and *Agastache*. *Russ. Bot. J.* **78** (8): 106–115. (In Russian)]
- ЗИМАН С.М., МОСЯКІН С.Л., БУЛАХ О.В., ЦАРЕНКО О.М., ФЕЛЬБАБА-КЛУШИНА Л.М. 2004.** Ілюстрований довідник з морфології квіткових рослин. Медіум, Ужгород.
- [Zyman S.M., Mosyakin S.L., Bulakh O.V., Tsarenko O.M., Fel'baba-Klushyna L.M. 2004. *Ilyustrovanyi dovidnyk z morfolohii kvitkovykh roslin*. Medium, Uzhhorod. (In Ukrainian)]
- КОМАРОВ В.А. (ред.) 1954.** Флора СССР. Т. 20. Изд-во АН СССР, Москва – Ленинград.
- [Komarov V.L. (ed.) 1954. *Flora of USSR*. Vol. 20. Publ. AN SSSR, Moscow –Leningrad. (In Russian)]
- КУЗНЕЦОВА Т.В. 1992.** О комплементарных подходах в морфологии соцветий. *Ботан. журнал* **77** (12): 7–24.
- [Kuznetsova T.V. 1992. On the complementary approaches in inflorescence morphology. *Russ. Bot. J.* **77** (12): 7–24. (In Russian)]
- ФЕДОРОВ А.А., АРТЮШЕНКО З.Т. 1979.** Атлас по описательной морфологии высших растений. Соцветие. Наука, Ленинград.
- [Fedorov A.A., Artyushenko Z.T. 1979. *Atlas po opisatel'noy morfolohii vyshnykh rasteniy*. Sotsvetiye. Nauka, Leningrad. (In Russian)]
- FUENTES-GRANADOS R.G. 1997.** Genetic studies of *Agastache*. Retrospective theses and dissertations. Paper 11981.
- HARLEY R.M., ATKINS S., BUDANTSEV A.L., CANTINO P.D., CONN B.J., GRAYER R., HARLEY M.M., DE KOK R., KRESTOVSKAJA T., MORALES R., PATON A.J., RYDING O., UPSON T. 2004.** Labiatae. In: KADEREIT J.W., KUBITZKI K. (eds), *The families and genera of vascular plants*. Vol. VII. Flowering plants. Dicotyledons: Lamiales (except Acanthaceae including Avicenniaceae): 167–275. Springer, Berlin.
- WU Z.Y., RAVEN P.H. 1994.** Verbenaceae through Solanaceae. In: *Flora of China*. Vol. 17. Science Press, Beijing and Missouri Botanical Garden Press, St. Louis.

MORPHOLOGICAL STRUCTURE OF INFLORESCENCES OF *AGASTACHE BREVIFLORA* (A. GRAY) EPLING, *A. RUGOSA* (FISCH. & C.A. MEY.) KUNTZE, AND *A. RUPESTRIS* (GREENE) STANDL. (FAMILY LAMIACEAE) EX SITU

GALINA O. RUDIK

Abstract. The results of comparative analysis of morphological structure of inflorescences *Agastache breviflora*, *A. rugosa*, and *A. rupestris* introduced in the O.V. Fomin Botanical Garden are represented. It has been established that the common morphological characteristics for inflorescences of these plants are: the type of inflorescence (thyrs), its location on the shoot (terminal), type of the growth of main and lateral axes (monopodial growth of the main axis and sympodial growth of lateral axes on which are formed the partial inflorescences – cymoids), the structure of the partial inflorescences (system of dichasia). Differences are determined by the linear dimensions of inflorescences, quantity and size of flowers in partial inflorescences, orientation of the main axis and flowers in space, presence or absence of bracts and bracteoles.

Key words: *Agastache breviflora*, *Agastache rugosa*, *Agastache rupestris*, inflorescence, thyrs, dichasium

ESC “Institute of Biology” of Taras Shevchenko Kyiv National University, O.V. Fomin Botanical Garden, Symon Petlyura str. 1, 01032 Kyiv, Ukraine; rudik_gala@ukr.net



МОРФОЛОГО-АНАТОМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ГОРІШКІВ ВИДІВ *ANEMONE* L. (*RANUNCULACEAE* JUSS.) ФЛОРИ УКРАЇНИ

О.М. ЦАРЕНКО

Анотація. Проведено дослідження морфолого-анатомічних особливостей горішків видів роду *Anemone* флори України: *A. narcissiflora*, *A. sylvestris*, *A. nemorosa* та *A. ranunculoides* за допомогою сканувальної електронної та світлової мікроскопії. Виявлені карпологічні ознаки, за якими можна діагностувати види: розміри та форма тіла горішка та стилодія, особливості опушення (довжина волосків, їх локалізація на плодиках), наявність виростів перикарпу у вигляді ребер чи крил, що оточують тіло плодика та їх довжина, товщина перикарпу та особливості потовщення клітин ендокарпу та наведено детальні описи плодиків. За виявленими ознаками складений ключ для визначення видів у неквітучому стані. Отримані дані важливі для систематики та філогенії роду і родини в цілому.

Ключові слова: *Anemone narcissiflora*, *Anemone sylvestris*, *Anemone nemorosa*, *Anemone ranunculoides*, СЕМ, плодики, горішки, анатомія, морфологія, опушення

Інститут ботаніки імені М.Г. Холодного НАН України, вул. Терещенківська, 2, м. Київ, 01604; tsarenko_olga@ukr.net

Вступ

Рід *Anemone* L. є одним з найбільших у родині *Ranunculaceae* Juss. (включає за даними різних авторів від 100 до 200 видів). На території України в природних умовах зростає 4 види анемон, що належать до 3 секцій: *Omalocarpus* DC. (*A. narcissiflora* L.), *Eriosephalus* Hook. f. & Thoms (*A. sylvestris* L.) та *Anemonanthea* DC. (*A. nemorosa* L., *A. ranunculoides* L.).

Для представників роду властиві плоди, що відрізняються за формою, розмірами, наявністю опушення та іншими ознаками. Саме тому в систематиці *Anemone*, як і усієї родини в цілому, традиційно використовуються карпологічні характеристики. Ще в першій системі цього роду DE CANDOLLE (1817, 1824) враховував особливості плодів, а саме їх форму та опушення при виділенні секцій. Ці ж ознаки були взяті до уваги автором першої монографії з роду *Anemone* (PRITZEL 1841). Автор іншої монографії (ULBRICH 1906) у своїх розробках щодо систематики цього роду також використовував карпологічні ознаки, переважно особливості форми плодів

та їх стилодіїв.

Анатомічні дослідження представників роду розпочав Е. JANCZEWSKI (1889, 1892) та продовжив G.N. SMITH (1926). В подальшому важливість морфолого-анатомічних досліджень з метою розробки таксономії роду в цілому та діагностики видів зокрема була обґрунтована в працях С.Ф. Пономаренко і Т.Б. Берестецкої (Пономаренко і Берестецкая 1981), Р.П. Чаудхарі і В.І. Трифонової (Чаудхарі і Трифонова 1988), В.М. Стародубцева (Стародубцев 1989, 1991) та інших дослідників.

Протягом майже десяти років ми також детально вивчали морфолого-анатомічні особливості представників роду *Anemone* у світовому масштабі. Було досліджено понад 100 видів, що належать до 22 секцій, та використано для таксономії роду понад 25 кількісних та якісних характеристик плодів. Отримані результати висвітлені нами в низці праць, присвячених таксономії та філогенії роду (Зиман і Царенко 2003; Зиман *и др.* 2004, 2007; ZIMAN *et al.* 2003, 2004a, 2004b, 2004c, 2005, 2006a, 2006b, 2007; EHRENDORFER *et al.* 2009). Проте в своїх публікаціях ми аналізували

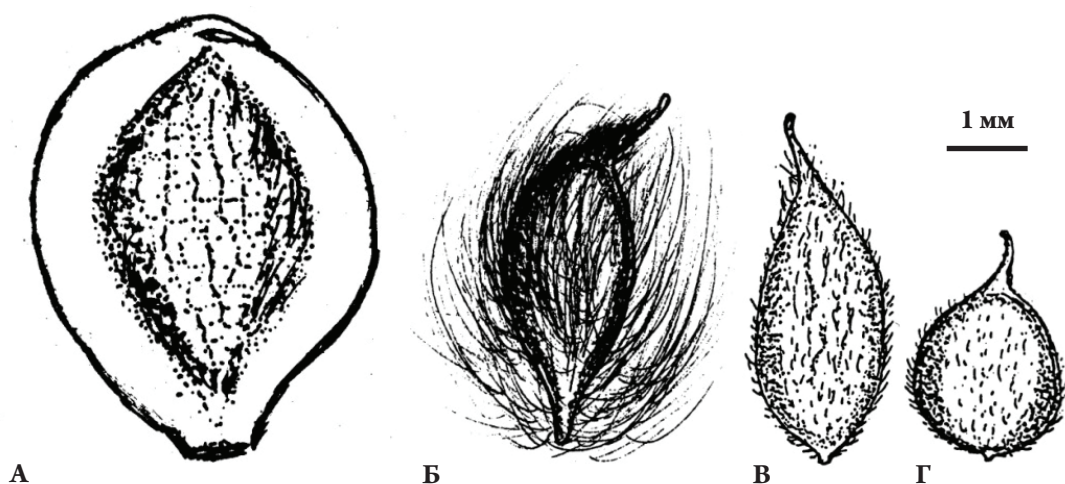


Рис. 1. Загальний вигляд горішків видів роду *Anemone*: А – *A. narcissiflora*; Б – *A. sylvestris*; В – *A. nemorosa*; Г – *A. ranunculoides*.

Fig. 1. General view of achenes in the species of *Anemone*: А – *A. narcissiflora*; Б – *A. sylvestris*; В – *A. nemorosa*; Г – *A. ranunculoides*.

переважно лише узагальнені карпологічні відомості, з розглядом деякими співавторами морфологічних ознак інших генеративних та вегетативних органів, а детальні карполого-анатомічні характеристики природних видів флори України залишилися неопублікованими. Мета цієї роботи – виявлення морфолого-анатомічних особливостей плодів представників *Anemone* флори України для діагностики рослин у неkwітучому стані та формування детальних карпологічних описів досліджених видів і розроблення ключа для їх визначення за цими ознаками. Вивчення структури плодів необхідно також для отримання нових діагностичних ознак, важливих для систематики і філогенії роду та родини в цілому.

Матеріали і методи досліджень

Для дослідження використані зразки плодів чотирьох видів *Anemone*, що зростають в Україні у природних умовах, які були отримані з Національного гербарію Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного (KW) та зібрані нами під час експедицій по Україні. Дослідження анатомічної структури

проводили за стандартною методикою на препаратах, виготовлених з плодів, попередньо оброблених на водяній бані в суміші спирту, гліцерину та води (1:1:1). Для кожного зразка плодів виготовлено по 25 зрізів, перпендикулярних до їх поздовжньої осі. Для достовірного порівняння отриманих даних будови горішків різних видів усі зрізи були зроблені у їх середній частині (Пономаренко 1974). Анатомічну будову вивчали за допомогою світлового (Jenaval) та сканувального мікроскопів (JSM-6060 LA). Зразки для СЕМ фіксували на латунних столиках, напилювали у вакуумному напилювачі тонкий шар золота за стандартною методикою. За допомогою сканувального мікроскопа також були відфотографовані поперечні зрізи та мікроскульптура поверхні горішків.

Результати та їх обговорення

Для видів роду *Anemone* властивий збірний плід – апокарпний багатогорішок, що складається з однонасінних нерозкривних плодиків (горішків). На верхівці тіло горішка закінчується неопадним стилодієм. Плодики часто сплюснуті з боків у більшій

чи меншій мірі та мають латеральні ребра або крила – виступи перикарпу, що охоплюють тіло горішка зі “спинки” та “черевця”. За розмірами, формою, наявністю опушення та іншими ознаками плодики досить різноманітні. За анатомічними характеристиками плодикам анемон, як було доведено нами у попередніх дослідженнях, процитованих вище, властиві наступні ознаки: поперечний зріз еліптичний чи майже округлий, з вузькими виростами перикарпу, в яких містяться судинні пучки. За будовою перикарп різних представників внутрішньородових таксонів роду має низку спільний рис будови. Він добре розвинений й диференційований на екзокарп, мезокарп та ендокарп.

Екзорарп складається з тангенціально витягнутих клітин з потовщеними зовнішніми стінками, вкритий кутикулою. Мезокарп складається з 3-4 шарів дещо потовщених клітин паренхіми, злегка тангенціально витягнутих, ендокарп – з 1-2 чи більше шарів здебільшого товстостінних, склерифікованих клітин, які виконують механічну функцію. Крім цієї механічної тканини, залишки провідного пучка (зберігаються у виростах перикарпу, що оточує тіло плодика зі спинки та черевця) також мають клітини зі склерифікованими оболонками, які додатково надають міцності горішку. Кількість шарів клітин ендокарпу, їх орієнтація відносно поздовжньої осі горішка (радіальна чи тангенціальна), форма їхніх порожнин (округла, овальна, видовжена та ін.) мають діагностичне значення секційного рівня (Царенко та ін. 2002).

Поперечний зріз насінин нагадує такий у плодиків, а спермодерма у представників роду, як правило, щільно прилягає до перикарпу та характеризується одноманітністю ознак. На поперечному зрізі вона, звично, тонша за перикарп та складена з декількох, як правило досить стиснутих, шарів облітерованих тонкостінних клітин.

За результатами карпологічних особливостей видів роду *Anemone* флори України нами сформовано ключ для їхньої ідентифікації.

КЛЮЧ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ВИДІВ РОДУ ANEMONE ФЛОРИ УКРАЇНИ

1. Тіла плодиків голі або з декількома голкоподібними волосками, сплюснуті з боків, з крилоподібними виростами перикарду зі “спинки” та черевця”, стилодії шаблеподібно зігнуті 1. *A. narcissiflora* L.
– Тіла плодиків опушені, з ледь помітними виростами перикарпу зі “спинки” та “черевця” у вигляді ребер, стилодії майже прямі чи нахилені до “черевця” 2
2. Основа плодика звужена та витягнута у довгу ніжку, тіло плодика опущене довгими (до 6-7 мм) волосками, а верхівка тіла плодика та стилодій – короткими (0,5-1,0 мм) 2. *A. sylvestris* L.
– основа плодика округла або видовжено-округла, опушення з коротких волосків (0,1-0,2 мм) 3
3. Тіла плодиків кулясті, 2,2-2,5 × 2,3-2,4 мм, основа плодика округла 3. *A. ranunculoides* L.
– Тіла плодиків дещо виповнені, в обрисі видовжено-еліпсоїдальні, 3,0-4,5 × 1,5-2,5 мм, з видовжено-овальною верхньою частиною, в основі видовжено-округлі 4. *A. nemorosa* L.

Секція *Omalocarpus* DC.

1. *A. narcissiflora* L. (incl. *A. laxa* (Ulbr.) Juz.). Рис. 1; 2 А.

Тіла плодиків сплюснуті з боків, в обрисі овальні, яйцеподібні, еліптичні, 5-8 × 4-6 мм, округлі в основі, переважно голі (рідко з поодинокими волосками); з двома латеральними крилами (виростами перикарпу) з “черевця” та “спинки”, 0,8-1,3 мм завширшки; стилодії шаблеподібно зігнуті від основи та дещо притиснуті до тіла плодика, до 1,4 мм завдовжки. Скульптура поверхні плодиків складчаста, чи зрідка зморшкувата.

На поперечному зрізі плодики еліптичні, з вузькими довгими виростами перикарпу, в яких містяться судинні пучки. Перикарп 35-70 мкм, добре розвинений, диференційований на екзокарп й ендокарп. Екзокарп складається з тангенціально витягнутих клітин з потовщеними зовнішніми стінками, вкритий кутикулою. Мезокарп – з 3-4 шарів клітин, злегка

тангенціально витягнутих, ендокарп – з 1(-2) шарів клітин, радіально витягнутих, склерифікованих, з овальними порожнинами та рівномірно потовщеними стінками. Насіннева шкірка щільно прилягає до шару ендокарпу та складається з декількох шарів, зазвичай, досить стиснутих, 20-65 мкм. Помітний лише один, зовнішній шар клітин, з порівняно великими, дещо витягнутими в тангенціальному напрямку, клітинами з потовщеними зовнішніми стінками.

Секція *Eriosephalus* Hook. f. & Thoms

2. *A. sylvestris* L. Рис. 1; 2 Б.

Тіла плодиків дещо виповнені, в обрисі видовжено-еліпсоїдальні, 3,5-4,5 × 1,7-1,9 мм, з видовжено-округлою верхньою частиною, в основі відтягнуті у ніжку, завдовжки з третину розширеної частини плодика, з двома вузькими, ледь помітними ребрами, що оточують тіло плодика з “черевця” та “спинки”; густо опушені довгими (5-6 мм) волосками та на верхівці, біля основи стилодія, з щільним пучком коротких (до 0,2 мм) волосків, що “заховують” стилодій, який від основи нахилений до “черевця”, до 0,8 мм завдовжки, хвостоподібний, опушений короткими волосками (0,1-0,2 мм). Скульптура поверхні плодиків складчаста.

На поперечному зрізі плодики видовжено-еліптичні, з двома виростами перикарпу (80-100 мкм), в яких містяться судинні пучки. Перикарп 43-55 мкм, добре розвинений, диференційований на екзокарп й ендокарп. Екзокарп складається з тангенціально витягнутих клітин з потовщеними зовнішніми стінками, вкритий кутикулою, мезокарп – з 3-4 шарів клітин, злегка тангенціально витягнутих, ендокарп – з 1 шару клітин, радіально витягнутих, склерифікованих, з конусоподібними порожнинами на поперечному зрізі через нерівномірно потовщені стінки - оболонки клітини, що прилягають до клітин мезокарпу мають меншу товщину ніж основи цих клітин, що міцно зрослися з клітинами тести. Насіннева шкірка складається з декількох шарів, як правило, досить стиснутих, до 20 мкм. Помітний лише один, зовнішній шар клітин

з порівняно великими, дещо витягнутими в тангенціальному напрямку, клітинами з потовщеними зовнішніми стінками.

Секція *Anemonanthea* DC.

3. *A. ranunculoides* L. Рис.1; 2 В.

Тіла плодиків виповнені, майже кулясті, 2,2-2,5 × 2,3-2,4 мм, з видовжено-округлою верхньою частиною, в основі округлі, з округлим випуклим плодовим рубчиком, з двома вузькими, ледь помітними ребрами, що оточують тіло плодика з “черевця” та “спинки”; опушені жорсткуватими відстовбурченими короткими (до 0,1 мм) монотипними волосками, за виключенням ніжки та стилодія, останній прямий або дещо відхилений, до 1,0 мм завдовжки, хвостоподібний, заокруглений на верхівці. Скульптура поверхні плодиків борозенчаста.

На поперечному зрізі плодики округлі, видовжено-округлі, з двома виростами перикарпу (140-190 мкм), в яких містяться судинні пучки. Перикарп 85-100 мкм, добре розвинений, диференційований на екзокарп й ендокарп. Екзокарп складається з тангенціально витягнутих клітин з потовщеними зовнішніми стінками, вкритий кутикулою, мезокарп – з 3-4 шарів клітин, злегка тангенціально витягнутих, ендокарп – з 1 шару клітин, високих, радіально витягнутих, склерифікованих, з конусоподібними порожнинами на поперечному зрізі через нерівномірно потовщені стінки – оболонки клітини, що прилягають до клітин мезокарпу мають меншу товщину ніж основи цих клітин, що міцно зрослися з клітинами тести. Насіннева шкірка складається з декількох шарів, як правило, досить стиснутих, до 10-20 мкм. Помітний лише один, зовнішній шар клітин з порівняно великими, витягнутими в тангенціальному напрямку, клітинами з дещо потовщеними зовнішніми стінками.

4. *A. nemorosa* L. Рис. 1; 2 Г.

Тіла плодиків дещо повнуваті, в обрисі видовжено-еліпсоїдальні, 3,0-4,5 × 1,5-2,5 мм, з видовжено-овальною верхньою частиною, в основі видовжено-округлі, з

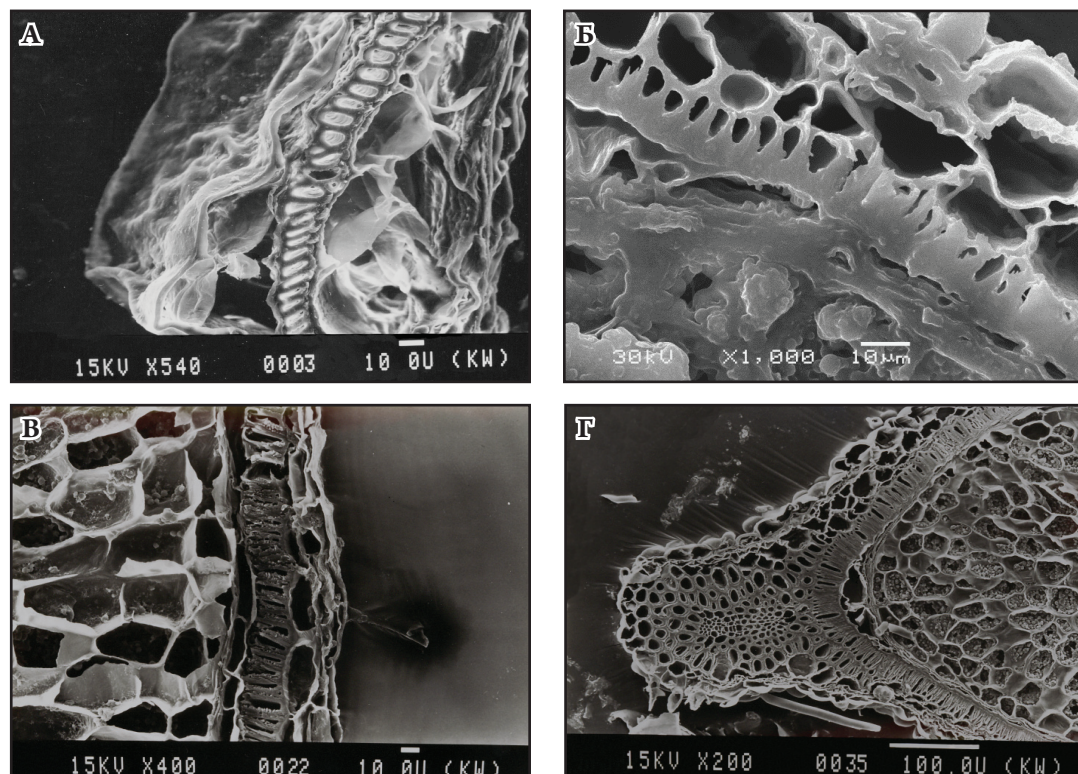


Рис. 2. Фрагменти поперечного зрізу перикарпу та насінневої шкірки горішків *Anemone*: А – *A. narcissiflora*; Б – *A. sylvestris*; В – *A. nemorosa*; Г – *A. ranunculoides*.

Fig. 2. Part of a cross section through the pericarp and seed coat of achenes of the species of *Anemone*: А – *A. narcissiflora*; Б – *A. sylvestris*; В – *A. nemorosa*; Г – *A. ranunculoides*.

округлим випуклим плодовим рубчиком, з двома вузькими, ледь помітними ребрами, що оточують тіло плодика з "черевця" та "спинки"; опушені жорсткуватими відстовбурченими короткими (0,1-0,2 мм) мономорфними волосками, за виключенням ніжки та стилодія, останній інколи опушений від основи до половини своєї довжини, прямий або дещо відхилений, до 1,3 мм завдовжки, хвостоподібний, заокруглений на верхівці. Скульптура поверхні плодиків дрібно зморшкувата.

На поперечному зрізі плодики видовжено-еліптичні, з двома виростами перикарпу (130-170 мкм), в яких містяться судинні пучки. Перикарп 45-65 мкм, добре розвинений, диференційований на екзокарп й ендокарп. Екзокарп складається з тангенціально витягнутих клітин з потовщеними зовнішніми стінками, вкритий

кутикулою, мезокарп – з 3-4 шарів клітин, злегка тангенціально витягнутих, ендокарп – з 1 шару клітин, радіально витягнутих, склерифікованих, з конусоподібними порожнинами на поперечному зрізі через нерівномірно потовщені стінки (оболонки клітини), що прилягають до клітин мезокарпу товстіші ніж основи цих клітин, що міцно зрослися з клітинами тесті. Насіннева шкірка складається з декількох шарів, як правило, досить стиснутих, до 20 мкм. Помітний лише один зовнішній шар клітин з порівняно великими, витягнутими в тангенціальному напрямку, клітинами з дещо потовщеними зовнішніми стінками.

Висновки

Представники роду *Anemone* природної флори України можуть бути ідентифіковані у

неквітучому стані за карполого-анатомічними характеристиками. Суттєвими ознаками для розмежування видів є розміри та форма тіла горішка, а також стилодія, особливості опушення (довжина волосків, їх локалізація на плодиках), наявність виростів перикарпу у вигляді ребер чи крил, що оточують тіло плодика, та їх довжина, а також товщина перикарпу та особливості потовщення клітин ендокарпу. За виявленими ознаками складені ключі для визначення видів. Отримані дані важливі для систематики та філогенії роду та родини в цілому.

Використані джерела

- ЗИМАН С.М., ЦАРЕНКО О.М. 2003.** Дослідження морфолого-анатомічних особливостей плодів для систематики. 1. Рід *Anemone*, підрід *Omalocarpus* DC. (Ranunculaceae Juss.). *Наук. Вісник Ужгород. ун-ту* **12**: 42–56.
- [Zyman S.M., Tsarenko O.M. 2003. Research of morpho-anatomical features of fruits with emphasis on systematics. 1. Genus *Anemone*, subgenus *Omalocarpus* DC. (Ranunculaceae Juss.). *Sci. Proc. Uzhgorod Univer.* **12**: 42–56. (In Ukrainian)]
- ЗИМАН С.М., ЦАРЕНКО О.М., БУЛАХ Е.В. 2004.** Види роду *Anemone* (Ranunculaceae Juss) во флорі Южного півшаря: результати попереднього порівняльно-морфологічного та таксономічного вивчення. *Вісник Нац. Наук.-природ. Музею. Сер. ботаніка* **1** (2-3): 143–160.
- [Zyman S.M., Tsarenko O.M., Bulakh E.V. 2004. Species of the genus *Anemone* (Ranunculaceae Juss) in flora of Southern Hemisphere: results of a preliminary comparative morphological and taxonomic study. *Proc. National Sci.-Nat. Museum Ser. Bot.* **1** (2-3): 143–160. (In Ukrainian)]
- ЗИМАН С.Н., БУЛАХ Е.В., ЦАРЕНКО О.Н., БОШКО Ю.М., МЕДЕЙЛ Ф. 2007.** Таксономія і філогенія *Anemone* sect. *Anemone* (Ranunculaceae). В сб.: *Ботаника и микология: современные горизонты*: 94–122. Академперіодика, Київ.
- [Zyman S.N., Bulakh E.V., Tsarenko O.N., Boshko Yu.M., Medeyl F. 2007. Taxonomy and phylogeny of *Anemone* sect. *Anemone* (Ranunculaceae). In: *Botany and mycology: contemporary horizons*: 94–122. Academperiodics, Kyiv. (In Russian)]
- ПОНОМАРЕНКО С.Ф. 1974.** К методике изготовления микропрепаратов сухих семян. *Ботан. журн.* **59** (4): 534–535.
- [Ponomarenko S.F. 1974. Toward the methods of preparing of micropreparates of dry seeds. *Russ. Bot. J.* **59** (4): 534–535. (In Russian)]
- ПОНОМАРЕНКО С.Ф., БЕРЕСТЕЦКАЯ Т.Б. 1981.** Сравнительно-морфологический анализ перикарпия и спермодермы видов семейства Ranunculaceae Juss. с односемянным нераскрывающимся плодиком. *Известия АН СССР. Сер. биол.* **2**: 237–265.
- [Ponomarenko S.F., Berestetskaya T.B. 1981. Comparative morphological analysis of pericarpium and spermodermis of species from family Ranunculaceae Juss. with one-seed unopening fruitlet. *News of AS USSR. Ser. Biol.* **2**: 237–265. (In Russian)]
- СТАРОДУБЦЕВ В.Н. 1989.** Новые таксоны подтрибы Anemoninae (Ranunculaceae). *Ботан. журн.* **74**: 1344–1346.
- [Starodubtsev V.N. 1989. New taxa from subtribe Anemoninae (Ranunculaceae). *Russ. Bot. J.* **74**: 1344–1346. (In Russian)]
- СТАРОДУБЦЕВ В.Н. 1991.** Ветреницы. Систематика и эволюция. Наука, Ленинград.
- [Starodubtsev V.N. 1991. Anemones. Systematics and evolution. Science, Leningrad. (In Russian)]
- ЦАРЕНКО О.М., ЗИМАН С.М., ЯКУБЕНКО Б.Є. 2002.** Карпологічні дослідження видів роду *Anemone* L. (Ranunculaceae Juss.). *Наук. Вісник Нац. Аграр. Ун-ту* **53**: 265–273.
- [Tsarenko O.M., Zyman S.M., Yakubenko B.Ye. 2002. Carpological studies on species of the genus *Anemone* L. (Ranunculaceae Juss.). *Sci. News Nat. Agrar. Univer.* **53**: 265–273. (In Ukrainian)]
- ЧАУДХАРИ Р.П., ТРИФОНОВА В.И. 1988.** Морфология плодов и сравнительно-анатомическая характеристика перикарпия и семенной кожуры непальских видов рода *Anemone* (Ranunculaceae). *Ботан. Журн.* **73** (6): 803–817.
- [Chaudkhari R.P., Trifonova V.I. 1988. Morphology of fruits and comparative anatomical characteristics of pericarpium and seed cover of Nepalese species from the genus *Anemone* (Ranunculaceae). *Russ. Bot. J.* **73** (6): 803–817. (In Russian)]
- DECANDOLLE A.P. 1824.** *Anemone* L. Prodrromus systematis naturalis regni vegetabilis. Pars 2. Parisiis.
- DECANDOLLE A.P. 1817.** Regni vegetabilis systema naturalis. 1. Parisiis.
- EHRENDORFER F., ZIMAN S.N., KÖNIG C., KEENER C.S., DUTTON B.E., TSARENKO O.N., BULAKH E.V., BOŞCAIU M., MÉDAIL F., KÄSTNER A. 2009.** Taxonomic revision, phylogenetics and transcontinental distribution of *Anemone* section *Anemone* (Ranunculaceae). *Bot. J. Linn. Soc.* **160**: 312–354.
- JANCZEWSKI E. 1889.** On the fruits of the genus *Anemone*. *Trans. Proc. Soc. Edinburgh* **17**: 174–177.
- JANCZEWSKI E. 1892.** Etudes morphologiques sur le genre *Anemone* L. *Rev. Gen. Bot.* **4**: 241–258.
- PRITZEL E. 1841.** Anemonarum revisio. *Linnaea* **15**: 561–698.

- SMITH G.H. 1926. Vascular anatomy of ranalian flowers. I. Ranunculaceae. *Bot. Gaz.* 82: 1–29.
- ULBRICH E. 1906. Über die systematische Gliederung und Geographische Verbreitung der Gattung *Anemone* L. *Bot. Jahrb.* 37: 171–334.
- ZIMAN S., DUTTON B., TSARENKO O. 2003. Study of morphological peculiarities of fruits for taxonomy. 2. Genus *Anemone* L., subgenus *Anemonanthea* D.C. (Ranunculaceae Juss.). *Sci Proc. Uzhgorod Univer. Ser. Biol.* 13: 3–11.
- ZIMAN S., KEENER C.S., KADOTA Y., BULAKH E., TSARENKO O. DUTTON B.E. 2004a. A taxonomic revision of *Anemone* L. subgenus *Anemonanthea* (DC.) Juz. *sensu lato* (Ranunculaceae) I. *J. Jpn. Bot.* 79 (1): 43–71.
- ZIMAN S., KEENER C.S., KADOTA Y., BULAKH E., TSARENKO O., DUTTON B.E. 2004b. A taxonomic revision of *Anemone* L. subgenus *Anemonanthea* (DC.) Juz. *sensu lato* (Ranunculaceae) II. *J. Jpn. Bot.* 79 (3): 196–206.
- ZIMAN S., KEENER C.S., KADOTA Y., BULAKH E., TSARENKO O., DUTTON B.E. 2004c. A taxonomic revision of *Anemone* L. subgenus *Anemonanthea* (DC.) Juz. *sensu lato* (Ranunculaceae) III. *J. Jpn. Bot.* 79 (5): 281–310.
- ZIMAN S., EHRENDORFER F., KADOTA Y., KEENER C.S., TSARENKO O.N., BULAKH E., DUTTON B.E. 2005. A taxonomic revision of *Anemone* L. section *Omalocarpus* DC. *sensu lato* (Ranunculaceae). Part I. *J. Jpn. Bot.* 80 (5): 282–302.
- ZIMAN S., EHRENDORFER F., KADOTA Y., KEENER C.S., TSARENKO O.N., BULAKH E., DUTTON B.E. 2006a. A taxonomic revision of *Anemone* L. section *Omalocarpus* DC. *sensu lato* (Ranunculaceae) Part II. *J. Jpn. Bot.* 81 (1): 1–19.
- ZIMAN S., EHRENDORFER F., KEENER C.S. WANG W.T., MOSYAKIN S.L., BULAKH E.V., TSARENKO O.N., DUTTON B.E., CHAUDHARY R.P., KADOTA Y. 2007. Revision of *Anemone* sect. *Himalayicae* (Ranunculaceae) with three new series. *Edinburgh J. Bot.* 1 (64): 51–99.
- ZIMAN S., KEENER C.S., KADOTA Y., BULAKH E.V., TSARENKO O.N. 2006b. A revision of *Anemone* L. (Ranunculaceae) from the Southern Hemisphere. *J. Jpn. Bot.* 81 (4): 193–224.
- ZIMAN S., SYTNIK K., EHRENDORFER F., KEENER C.S., DUTTON B.E., TRIFONOVA V., FEDORONCHUK M., TSARENKO O., ANISHCHENKO I. TERENTJEVA N. 1997. Taxonomy and evolution of the *Anemone narcissiflora* complex. Chernobylinterinform, Kyiv.

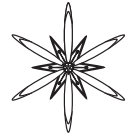
MORPHOLOGICAL AND ANATOMICAL FEATURES OF ACHENES OF ANEMONE L.
(RANUNCULACEAE JUSS.) OF THE FLORA OF UKRAINE

O.M. TSARENKO

Abstract. Based on SEM and LM some morphological and anatomical features of achenes of *Anemone* L. of Ukrainian flora (*A. narcissiflora*, *A. sylvestris*, *A. nemorosa*, *A. narcissiflora*) have been investigated. Carpological features after which it is possible to diagnose species are detected: the dimensions and shape of the achenes and beaks, the peculiarities of pubescence (length and character of localization of the hairs), a presence of different appendages of pericarp (as ribs or wings which surround body of fruit), thickness of pericarp and peculiarities of the thickness of the cell walls of endocarp. Detailed descriptions of fruitlets have been represented. The key for determination of species not in a flourishing condition on the revealed signs have been composed. Data obtained are important for systematics and phylogeny of the genus and the family as a whole.

Key words: *Anemone narcissiflora*, *Anemone sylvestris*, *Anemone nemorosa*, *Anemone ranunculoides*, SEM, fruitlets, achenes, morphology, anatomy, pubescence

M.G. Kholodny Institute of Botany NAS of Ukraine, Tereshchenkivska str. 2, 01604 Kyiv, Ukraine; tsarenko_olga@ukr.net



УДК 581.9:582.992:581.45(447)

МОРФОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА НАСІНИН ВИДІВ ПІДСЕКЦІЇ *HETEROPHYLLA* (NYM.) FED. РОДУ *SAMRANULA* L. ФЛОРИ УКРАЇНИ

НАТАЛІЯ Г. ДРЕМЛЮГА¹ ТА ОКСАНА А. ФУТОРНА^{1,2}

Анотація. Досліджені морфологічні особливості насінин представників чотирьох видів (*Samranula rotundifolia*, *S. kladniana*, *S. polymorpha*, *S. serrata*) підсекції *Heterophylla* роду *Samranula* флори України. Встановлені спільні (розміри, відсутність опушення та придатків, блиск та коричневий колір), а також специфічні (розміри, форма, ультраструктура поверхні) для всіх досліджених видів ознаки.

Ключові слова: *Samranula*, *Heterophylla*, насінина, ультраструктура поверхні, флора України

¹ Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, вул. Терещенківська, 2, МСП-1, Київ, 01601, Україна; natalia.dremluga@bigmir.net

² Київський національний університет імені Тараса Шевченка, вул. С. Петлюри, 1, Київ, 01032, Україна; oksana_drofa@yahoo.com

Вступ

Рід *Samranula* L. є найчисельнішим (близько 300 видів) у родині *Samranulaceae* Juss. та складним таксономічним у відношенні. Обсяг та статус внутрішньовидових таксонів є дискусійним. Варіабельність морфологічних вегетативних ознак ускладнює таксономію роду (BOISSIER 1875; ФЕДОРОВ 1957, 1978; ВІСЮЛІНА 1961; ВИКТОРОВ 2002, ЗИМАН та ін. 2009; ДРЕМЛЮГА і ЗИМАН 2010; ДРЕМЛЮГА та ін. 2011; ДРЕМЛЮГА і ФУТОРНА 2012а, 2012б, 2012с; ДРЕМЛЮГА 2009, 2013а, 2013б, 2013с, 2014, 2015).

Однак, ряд авторів зазначає, що ознаки морфологічної структури насінин є важливими для ідентифікації видів, філогенетичних висновків і з'ясування характеру еволюції (АТТАР et al. 2007; МОАЗЗЕНІ et al. 2007). Результати дослідження багатьох груп рослин показали, що морфологічна будова та анатомічні особливості насінин є досить консервативними ознаками, що робить їх таксономічно важливими (ДАМВОЛДТ 1979; ЭЗАУ 1980; BARTHLOTT et al. 1998; ПЕРЕГРИМ і ВАКУЛЕНКО 2009; ОЛЬШАНСЬКИЙ 2009, 2012; ПЕРЕГРИМ 2013; ПЕРЕГРИМ і ФУТОРНА 2013; ZHYGALOVA & FUTORNA 2013;

ЖИГАЛОВА і ФУТОРНА 2013, 2015; ПЕРЕГРИМ 2014; ZHYGALOVA et al. 2014; ФУТОРНА і ЖИГАЛОВА 2014). Потенціал ультраструктури насінин у таксономічних дослідженнях доведено у ряді й інших праць (JUNIPER 1959; KROCHMAL & HUGUELY 1971; МЕЛИКЯН 1972, 1981; CAROLIN 1980; ОГАНЕСЯН 1985; КОЛАКОВСКИЙ 1986, 1987, 1995; КОЛАКОВСКИЙ и СЕРДЮКОВА 1986; JAUBOLA & THORPE 2000; BUSS et al. 2001). Зокрема, BARTHLOTT (1981, 1984) стверджує, що ультраструктура поверхні насінин є хорошим таксономічним та філогенетичним маркером на родовому та підродовому рівнях. Тим не менше, в систематичних дослідженнях родини *Samranulaceae* ознаки мікроморфології насінин використовувались рідко, незважаючи на їх стабільність. SHETLER & MORIN (1986) також визнають, що ультраструктура тестисів насінин північно-американських та індійських видів родини *Samranulaceae* має діагностичне значення. Описано структуру насінини представників роду *Samranula* й з території Туреччини (АКСІН 2009) та Закавказзя (ОГАНЕСЯН 1982). Детальному вивченню ультраструктури поверхні насінин видів роду *Samranula* присвячені роботи А.А. Беляєва

(Беляєв 1984, 1985, 1986), який досліджував представників *Campanulaceae* флори СРСР. Водночас, дані про морфологію насінин представників роду *Campanula* флори України досить обмежені.

В той же час, обсяг роду *Campanula* та статус його внутрішньовидових таксонів залишається дискусійним. У тому числі на сьогодні не існує єдиного погляду на об'єм та положення підсекції *Heterophylla* (Nym.) Fed. Ця підсекція вперше була описана в ранзі ряду *Heterophylla* Nym. та підвищена Ан.А. Федоровим (1957) до рангу підсекції на основі відсутності придатків чашечки, наявності гострих її лопатей та пониклих квіток. За Ан.А. Федоровим на території України підсекція *Heterophylla* представлена чотирма видами, які належать до двох рядів, що розрізняються за морфологічними ознаками листків та суцвіть: *Vulgares* Witssek (*C. rotundifolia*, *C. kladniana*, *C. polymorpha*) та *Lanceolatae* Witssek (*C. serrata*).

Таким чином, метою нашої роботи було провести детальне дослідження морфології насінини представників підсекції *Heterophylla* роду *Campanula* флори України та виявити додаткові діагностичні ознаки.

Матеріали і методи досліджень

Ми дослідили морфологічну будову насінини чотирьох видів підсекції *Heterophylla* (*Campanula kladniana*, *C. polymorpha*, *C. rotundifolia*, *C. serrata*) флори України.

Для досліджень був використаний гербарний матеріал, зібраний під час експедиційних виїздів у 2007-2010 роках, а також зразки з гербаріїв KW, KWHA, LWKS, LW, SHER, YALT, LE. Зразки фіксували на латунному столику і напилували тонким шаром суміші золота та платини у вакуумній камері. Ультраструктуру поверхні вивчали за допомогою СЕМ JSM-6060 LA. Описи проводились з використанням термінології, узагальненої в ряді праць (Беляєв 1984; SNETLER & MORIN 1986; ВАРТНОТТ *et al.* 1998; ЗИМАН *in in.* 2009). Для окремих видів опрацьовували матеріал, відібраний з різних точок ареалу.

Досліджені зразки:

C. kladniana: 1. Закарпатська обл., Тячівський р-н, с. Широкий Луг, поблизу р. Тереля, лісова галявина, 30.07.1960. М.І. Котов, В.І. Чопик, В.В. Протопопова (KW); 2. Івано-Франковська обл., Косовський р-н, Чивчинские гор, в расщелинах известняковых скал под вершиной горы Гомул, в субальпийском поясе. 15.IX.1965, С.С. Харкевич (LE); 3. Закарпатська обл., Рахівський р-н, хр. Черногора, змішаний ліс, під Брескулом. 27.VII. 1967, В.І. Чопик (KW); 4. Закарпатська обл., Рахівський р-н, окол. с. Богдан, пд.-сх. підніжжя Петросу, на перехресті доріг. 22.07.2008. Н.Г. Дремлюга (KW); 5. Закарпатська обл., Рахівський р-н, окол. с. Черногора, г. Берденеска, кам'янистий схил над озером. 28.VII.1970, Крись (KWHA).

C. napuligera: 1. Львівська обл., Сколівський р-н, с. Топорець, 2 км на схід. На вологих післялісових луках. 17.07.1999, О. Ковпак, Р. Підгребельний, 2.11.1999, О. Ковпак (LWKS); 2. Вост. Карпаты, Мармарош, Поп Иван, под. скалами більшого кара, на трав'яном склоне. № 559. 28.VII.1946, М.Г. Попов (LE); 3. Закарпатська обл., Рахівський р-н, окол. с. Богдан, пд.-сх. схил г. Петрос. 15.07.07, Н.Г. Дремлюга (KW); 4. Станиславская обл., Жабьевский р-н, Черногора, между камей на крутом склоне под. вершиной г. Шпицы. 17.VII.1959, Е.М. Брадис, Т. Андриенко (KW).

C. polymorpha: 1. Івано-Франківська обл., Верховинський р-н, Чивчино-Гринявські гори, Північний схил г. Чивчин. Скелі. 09.07.2003, Н. Сичак, О. Кагало, 05.12.2003, N. Sytshak (LWKS) № 20878; 2. Закарпатская обл., Воловецький р-н, вершина г. Пикуй, каменистая местность. 26.11.1988, N.N. Sytshak (KW); 3. Івано-Франковська обл., Верховинський р-н, 30-33 км к ЮЗ от Верховины, г. Чивчин. Каменистые выходы близ вершины горы, 1750 м.н.у.м., на скалах. 23 июля 1985, Д. Гельтман, В. Дорофеев, О. Семенова, В. Серов. Опр. А.О. Хааре (LE). № 1883; 4. Закарпатська обл., Рахівський р-н, праворуч від дороги від г. Петрос до перемички. 22.07.2008, Н.Г. Дремлюга (KW); 5. Закарпатська обл., Міжгірський р-н, НПП

«Синебір». 15.08.07, Н.Г. Дремляюга (KW).

C. rotundifolia: 1. Київська обл., Обухівський р-н, с. Українка, правий берег р. Стугни, окраїна соснового лісу, 25.08.2009 (KW); 2. Тернопольська обл., Залозецький р-н, с. Турчинів. 20.VII.1940, Л. Яскорська (KWHU); 3. Тернопольська обл., Залозецький р-н, с. Турчинів. 20.VII.1940, Л. Яскорська (KWHU); 4. Черниговская губернія, Летковское лесничество, Остерский уезд. 28. VII.1903, И. Сележинский (KWHU); 5. Закарпатська обл., Тячівський р-н, с. Широкий Луг, пол. Щербан, 18.08.1974, Л. Тасенкевич (LWS); 6. Київська обл., окол. Києва, Голосієво. 10.VII.2011, Н.Г. Дремляюга (KW).

(відношення довжина/ширина – 3,02). Кутикула зморшкуватого типу, добре розвинута в усіх досліджених зразків. Дистальні та проксимальні антиклінальні стінки, дещо звивисті, рівномірно потовщені на відміну від попередніх видів, їх товщина становить 3,53-5,58 мкм. Межі між антиклінальними стінками сусідніх клітин тести чіткі. Зовнішні периклінальні стінки клітин тести ввігнуті, ультраструктура зморшкувата. Довжина клітини тести становить 87,66-108,32 мкм, відстань між внутрішніми межами проксимальних антиклінальних стінок – 6,58-7,28 мкм. Поверхня насінин короткокомірчаста.

Результати та їх обговорення

Нижче подано описи насінин досліджених видів підсекції *Heterophylla*.

Ряд *Vulgares*

C. rotundifolia

Насінини овально-еліптичні, сплюснуті з боків. Рафе виразний, тягнеться від мікропілярного до халазального кінця насінини. Завдовжки 1,36-1,43 мм, завширшки 0,66-0,69 мм (відношення довжина/ширина – 2,06). Кутикула зморшкуватого типу, добре розвинута в усіх досліджених зразків. Дистальні та проксимальні антиклінальні стінки, дещо звивисті, чоткоподібно потовщені, їх товщина становить 5,64-7,34 мкм. Межі між антиклінальними стінками сусідніх клітин тести чіткі. Зовнішні периклінальні стінки клітин тести плаські, ультраструктура зморшкувата. Довжина клітин тести становить 96,46-126,14 мкм, відстань між внутрішніми межами проксимальних антиклінальних стінок – 9,98-15,23 мкм. Поверхня насінин короткокомірчаста.

C. polymorpha

Насінини вузькоовально-еліптичні, сплюснуті з боків. Рафе виразний, як і у насінин *C. rotundifolia*, тягнеться від мікропілярного до халазального кінця насінини. Довжина насінин 1,33-1,39 мм, ширина – 0,44-0,46 мм

C. kladniana

Насінини овально-еліптичні, сплюснуті з боків. Рафе виразний. Як і у насінин *C. rotundifolia*, тягнеться від мікропілярного до халазального кінця. Довжина насінин становить 1,27-1,37 мм, ширина – 0,63-0,71 мм (відношення довжина/ширина – 1,93). Кутикула зморшкуватого типу, добре розвинена в усіх досліджених зразків. Дистальні та проксимальні антиклінальні стінки, дещо звивисті, дещо нерівномірно потовщені, їх товщина становить 6,19-6,92 мкм. Межі між антиклінальними стінками сусідніх клітин тести чіткі. Зовнішні периклінальні стінки клітин тести, на відміну від попереднього виду, ввігнуті, ультраструктура зморшкувата. Довжина клітини тести становить 106,84-188,38 мкм, відстань між внутрішніми межами проксимальних антиклінальних стінок – 7,53-8,75 мкм. Поверхня насінин короткокомірчаста.

Ряд *Lanceolatae*

C. serrata

Насінини вузькоовально-еліптичні, зрідка яйцеподібні, сплюснуті з боків. Рафе виразний. Як і у насінин попередніх видів тягнеться від мікропілярного до халазального кінця насінини. Довжина насінин 1,55-1,62 мм, ширина – 0,90-0,93 мм (довжина/ширина – 1,74). Кутикула зморшкуватого типу, добре розвинена

в усіх досліджених зразків. Дистальні та проксимальні антиклинальні стінки, дещо звивисті, рівномірно товсті, на відміну від попередніх видів, їх товщина становить 8,32-16,07 мкм. Межі між антиклинальними стінками сусідніх клітин тести чіткі. Зовнішні периклинальні стінки клітин тести, як і у *C. rotundifolia*, ввігнуті, ультраструктура зморшкувата. Довжина клітини тести становить 77,46-112,07 мкм, відстань між внутрішніми межами проксимальних антиклинальних стінок – 5,94-6,35 мкм. Поверхня насінин короткоборозенчаста.

Отже, насінини представників підсекції *Heterophylla* у флорі України овально-еліптичні (*C. kladniana*, *C. polymorpha*, *C. rotundifolia*) чи яйцеподібні (*C. serrata*), сплюснені з боків (Рис. 1). Рафе виразний в усіх досліджених видів. Кутикула зморшкуватого типу, добре розвинена в представників даної підсекції. Антиклинальні стінки клітин епідерми тести чоткоподібно потовщені у представників ряду ряду *Vulgares* та рівномірно – у представників ряду *Lanceolatae*. Найтовщі проксимальні антиклинальні стінки у представників ряду *Lanceolatae*. Зовнішні периклинальні стінки пласкі (види ряду *Vulgares*) або ввігнуті (види ряду *Lanceolatae*). Насінини характеризуються короткокомірчастою (*C. kladniana*, *C. polymorpha*, *C. rotundifolia*) чи короткоборозенчастою (*C. serrata*) ультраструктурою.

Таким чином, мікроморфологічні ознаки насінин представників роду *Campanula* підсекції *Heterophylla* флори України можуть використовуватись в якості таксономічних лише в комплексі з іншими ознаками.

Висновки

У результаті детальних досліджень морфології насінини представників підсекції *Heterophylla* виявлено ознаки, які характеризують усіх представників даної підсекції, а саме середні розміри, відсутність опушення та придатків, блиск та коричневий колір. Також встановлено, що ці види розрізняються розмірами, формою,

характером потовщення антиклинальних стінок, формою периклинальних стінок і ультраструктурою поверхні насінин.

Використані джерела

- БЕЛЯЕВ А.А. 1984.** Ультраструктура поверхности и некоторые морфологические характеристики семян представителей семейства Campanulaceae. *Бот. журн.* **69** (7): 890–898.
- [Beljaev A.A. 1984. Ul'trastruktura poverhnosti i nekotorye morfolozicheskie harakteristiki semjan predstavitelej semejstva Campanulaceae. *Russ. Bot. J.* **69** (7): 890–898. (In Russian)]
- БЕЛЯЕВ А.А. 1985.** Новые данные об анатомическом строении семенной кожуры и ультраструктуре поверхности семян двух представителей рода *Pentaphragma* (Campanulaceae). *Бот. журн.* **70** (7): 955–957.
- [Beljaev A.A. 1985. Novye dannye ob anatomicheskom stroenii semennoj kozhury i ul'trastrukture poverhnosti semjan dvuh predstavitelej roda *Pentaphragma* (Campanulaceae). *Russ. Bot. J.* **70** (7): 955–957. (In Russian)]
- БЕЛЯЕВ А.А. 1986.** Особенности анатомии и ультраструктуры поверхности семенной кожуры отдельных представителей критических родов семейства Campanulaceae. *Бот. журн.* **71** (10): 1371–1375.
- [Beljaev A.A. 1986. Osobennosti anatomii i ul'trastrukтуры poverhnosti semennoj kozhury otdel'nyh predstavitelej kriticheskikh rodov semejstva Campanulaceae. *Russ. Bot. J.* **71** (10): 1371–1375. (In Russian)]
- ВИКТОРОВ В.П. 2002.** Таксономический конспект рода *Campanula* L. (Campanulaceae) России и сопредельных государств. *Нов. системат. высш. раст.* **34**: 197–234.
- [Viktorov V.P. 2002. Taksonomicheskij konspektroda *Campanula* L. (Campanulaceae) Rossii i sopredel'nyh gosudarstv. *Nov. sistemat. vyssh. rast.* **34**: 197–234. (In Russian)]
- ВИСЮЛИНА О.Д. 1961.** Родина Дзвоников – Campanulaceae Juss. В кн.: Котов М.Ш. (ред.), Флора УРСР. **Т. 10**: 401–435. Изд. АН УРСР, Киев.
- [Visjulina O.D. 1961. Rodyna Dzvonykovi – Campanulaceae Juss. In: Kotov M.Sh. (ed.), Flora URSR. Vol. 10: 401–435. Izd. AN URSR, Kiev. (In Ukrainian)]
- ДРЕМЛЮГА Н.Г. 2009.** Історія дослідження систематики роду *Campanula* L. *Укр. ботан. журн.* **66** (6): 805–813.
- [Dremljuga N.G. 2009. Istorija doslidzhennja sistematiki rodu *Campanula* L. *Ukr. Bot. J.* **66** (6): 805–813. (In Ukrainian)]

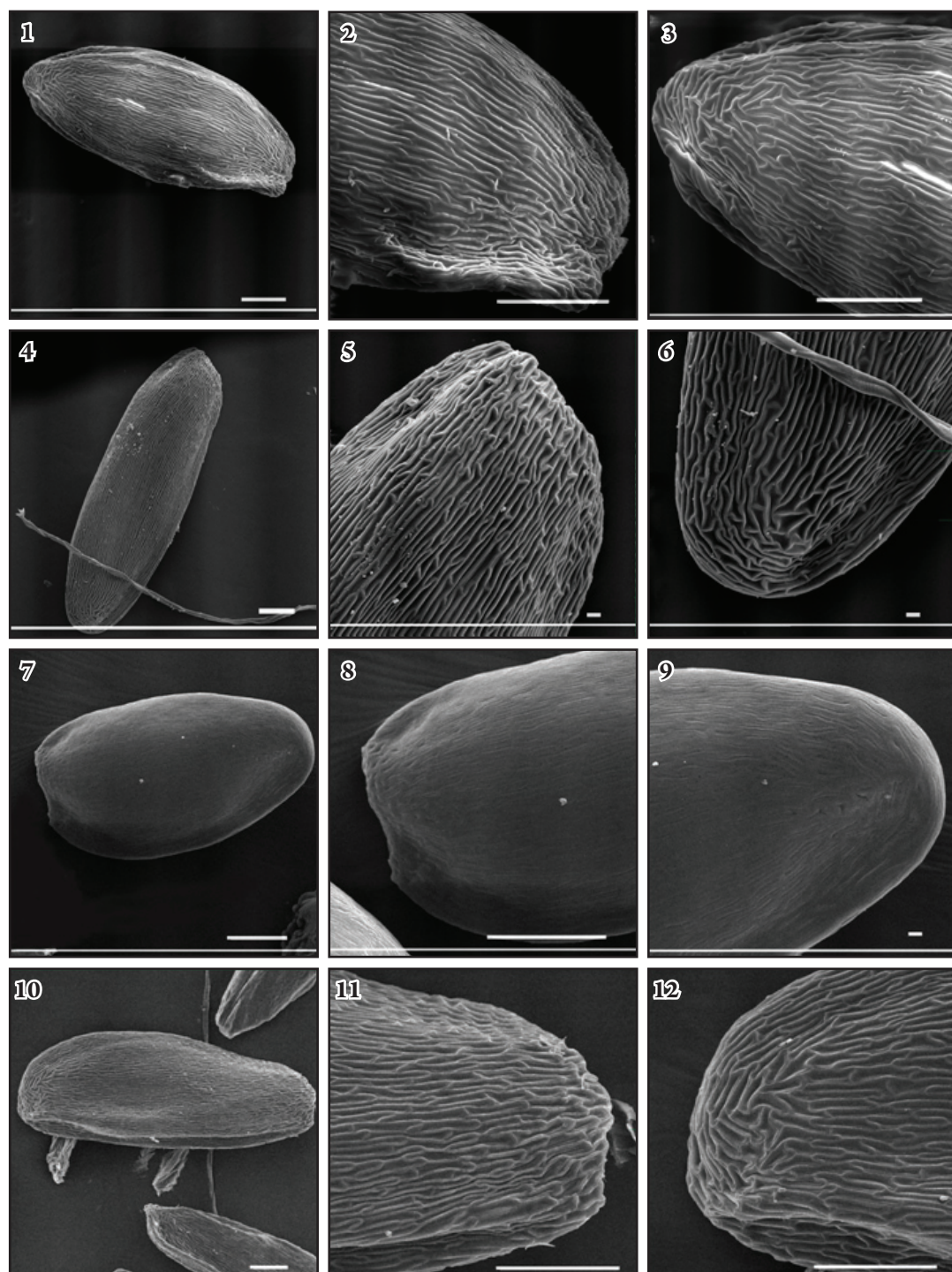


Рис. 1. Насінини та їх поверхні: **1-3** – *Campanula rotundifolia*; **4-6** – *C. polymorpha*; **7-9** – *C. serrata*; **10-12** – *C. kladniana*. Ціна поділки – 50 мкм.

Fig. 1. Seeds and their surfaces: **1-3** – *Campanula rotundifolia*; **4-6** – *C. polymorpha*; **7-9** – *C. serrata*; **10-12** – *C. kladniana*. Scale – 50 μ m.

- ДРЕМЛЯГА Н.Г. 2013а.** Морфологічні особливості плодів видів секції *Rapunculus* (Fourr.) Boiss. роду *Campanula* L. флори України. *Mod. Phytomorphol.* **4**: 275–278.
- [Dremluga N.G. 2013a. Morphological peculiarities of fruits of the species from subgenus *Rapunculus* (Fourr.) Boiss. of genus *Campanula* L. in the flora of Ukraine. *Mod. Phytomorphol.* **4**: 275–278. (In Ukrainian)]
- ДРЕМЛЯГА Н.Г. 2013в.** Морфологічні особливості плодів секції *Medium* D.C. роду *Campanula* L. флори України. *Чорноморський ботан. журн.* **9** (1): 23–28.
- [Dremluga N.G. 2013b. Morfologichni osoblivosti plodiv sekcii *Medium* D.C. rodu *Campanula* L. flori Ukraini. *Chornomorskiy Bot. J.* **9** (1): 23–28. (In Ukrainian)]
- ДРЕМЛЯГА Н.Г. 2013с.** Біоморфологічний аналіз видів роду *Campanula* L. у флорі України. *Біол. системи* **5** (1): 31–38.
- [Dremluga N.G. 2013. Biomorfologichnij analiz vidiv rodu *Campanula* L. u flori Ukraini. *Biol. Systems (Chernivtsi)* **5** (1): 31–38. (In Ukrainian)]
- ДРЕМЛЯГА Н.Г. 2014.** Морфологічні особливості чашечки квітки представників підсекції *Involucratae* (Fom.) Fed. роду *Campanula* L. флори України. *Mod. Phytomorphol.* **6**: 259–262.
- [Dremluga N.G. 2014. Morphological peculiarities of calyx in species from *Campanula* L. subsection *Involucratae* (Fom.) Fed. in flora of Ukraine. *Mod. Phytomorphol.* **6**: 259–262. (In Ukrainian)]
- ДРЕМЛЯГА Н.Г. 2015.** Морфологічні особливості квітки видів підсекції *Heterophylla* (Nym.) Fed. роду *Campanula* L. флори України. *Чорноморський ботан. журн.* **11** (1): 6–11.
- [Dremluga N.G. 2015. Morfologichni osoblivosti vitki vidiv pidsekcii *Heterophylla* (Nym.) Fed. rodu *Campanula* L. flori Ukraini. *Chornomorskiy Bot. J.* **11** (1): 6–11. (In Ukrainian)]
- ДРЕМЛЯГА Н.Г., ЗИМАН С.М. 2010.** *Campanula talievii* Juz. – рідкісний ендемічний вид у флорі Криму. *Укр. ботан. журн.* **67** (2): 225–230.
- [Dremluga N.G., Ziman S.M. 2010. *Campanula talievii* Juz. – ridkisnij endemichnij vid u flori Krimu. *Ukr. Bot. J.* **67** (2): 225–230. (In Ukrainian)]
- ДРЕМЛЯГА Н.Г., ФУТОРНА О.А. 2012а.** Особливості ультраструктури поверхні листків видів роду *Campanula* L. флори України. *Укр. ботан. Журн.* **69** (5): 686–700.
- [Dremluga N.G., Futorna O.A. 2012a. Osoblivosti ul'trastrukturii poverhni listkiv vidiv rodu *Campanula* L. flori Ukraini. *Ukr. Bot. J.* **69** (5): 686–700. (In Ukrainian)]
- ДРЕМЛЯГА Н.Г., ФУТОРНА О.А. 2012б.** Структура поверхні листків видів секції *Rapunculus* L. (Fourr.) Boiss. роду *Campanula* L. флори України. *Mod. Phytomorphol.* **1**: 157–160.
- [Dremluga N.G., Futorna O.A. 2012b. The leaf surface structure of the species from the section *Rapunculus* L. (Fourr.) Boiss. of the genus *Campanula* L. in the flora of Ukraine. *Mod. Phytomorphol.* **1**: 157–160. (In Ukrainian)]
- ДРЕМЛЯГА Н.Г., ФУТОРНА О.А. 2012с.** Структура поверхні листків видів секції *Medium* L. *Чорноморський ботан. журн.* **8** (3): 284–302.
- [Dremluga N.G., Futorna O.A. 2012c. Struktura poverhni listkiv vidiv sekcii *Medium* L. *Chornomorskiy Bot. J.* **8** (3): 284–302. (In Ukrainian)]
- ДРЕМЛЯГА Н.Г., ЗИМАН С.М., БУЛАХ О.В., ГАМОР А.Ф. 2011.** Про забуті чи невизнані рідкісні види роду *Campanula* L. у високогірній флорі Українських Карпат. *Наук. вісник Ужгородського ун-ту. Сер. Біол.* **30**: 10–13.
- [Dremluga N.G., Ziman S.M., Bulah O.V., Gamor A.F. 2011. Pro zabuti chi neviznani ridkisni vidy rodu *Campanula* L. u visokogirnij flori Ukrain's'kih Karpat. *Nauk. Visnik Uzhgorod's'kogo Un-tu. Ser. Biologija* **30**: 10–13. (In Ukrainian)]
- ЖИГАЛОВА С.Л., ФУТОРНА О.А. 2013.** Особливості мікоморфологічної будови *Gladiolus imbricatus* L. (Iridaceae Juss.). *Mod. Phytomorphol.* **3**: 273–280.
- [Zhygalova S.L., Futorna O.A. 2013. The micromorphological features of *Gladiolus imbricatus* L. (Iridaceae Juss.). *Mod. Phytomorphol.* **3**: 273–280. (In Ukrainian)]
- ЖИГАЛОВА С.Л., ФУТОРНА О.А. 2015.** Порівняльно-мікоморфологічна характеристика *Iris pineticola* Klokov та *Iris arenaria* Waldst. et Kit. (Iridaceae Juss.). *Вісник КНУ. Інтродукція та збереження рослинного різноманіття* **1** (33): 40–43.
- [Zhygalova S.L., Futorna O. A. 2015. Porivnjal'no-mikromorfologichna harakteristika *Iris pineticola* Klokov ta *Iris arenaria* Waldst. et Kit. (Iridaceae Juss.). *Visnik KNU. Introdukciya ta zberezhennja roslinnogo riznomanittja* **1** (33): 40–43. (In Ukrainian)]
- ЗИМАН С.М., ДРЕМЛЯГА Н.Г., ГАМОР А.Ф., МАКСИМІВ Т.О., СУХАРЮК Д.Д. 2009.** Рідкісні та ендемічні таксони судинних рослин у високогірній флорі Петроса (Чорногора). *Біол. системи* **1** (1): 63–67.
- [Ziman S.M., Dremluga N.G., Gamor A.F., Maksimiv T.O., Suharyuk D.D. 2009. Ridkisni ta endemichni taksoni sudinnih roslin u visokogirnij flori Petrosa (Chornogora). *Biol. Systems (Chernivtsi)* **1** (1): 63–67. (In Ukrainian)]
- КОЛАКОВСКИЙ А.А. 1986.** Карпология колокольчиковых (*Campanulaceae* Juss.) и вопросы терминологии. *Ботан. журн.* **71** (9): 1155–1166.
- [Kolakovskij A.A. 1987. Karpologia kolokolchikovih (*Campanulaceae* Juss.) i voprosi terminologii. *Russ. Bot. J.* **71** (9): 1155–1166. (In Russian)]

- КОЛАКОВСКИЙ А.А. 1987.** Система семейства Campanulaceae Juss. Старого Света. *Ботан. журн.* **72 (12):** 1572–1579.
- [Kolakovskij A.A. 1987. Sistema semejstva Campanulaceae Juss. Starogo Sveta. *Russ. Bot. J.* **72 (12):** 1572–1579. (In Russian)]
- КОЛАКОВСКИЙ А.А. 1995.** Семейство Campanulaceae. Москва.
- [Kolakovskij A.A. 1995. Semejstvo Campanulaceae. Moskva. (In Russian)]
- КОЛАКОВСКИЙ А.А., СЕРДЮКОВА Л.Б. 1986.** Новые данные к систематике кавказских колокольчиков. *Зам. сист. геогр. раст.* **36:** 44–57.
- [Kolakovskij A.A., Serdjukova L.B. 1986. Novye dannye k sistematike kavkazskih kolokol'chikov. *Zam. sist. geogr. rast.* **36:** 44–57. Tbilisi. (In Russian)]
- МЕЛИКЯН А.П. 1972.** О признаках примитивности и специализации в типах семенных покровов цветковых растений. *Докл. АН АрмССР* **55 (4):** 239–243.
- [Melikjan A.P. 1972. O priznakah primitivnosti i specializacii v tipah semennyh pokrovov cvetkovyh rastenij. *Dokl. AN ArmSSR.* **55 (4):** 239–243. (In Russian)]
- МЕЛИКЯН А.П. 1981.** О некоторых общих тенденциях в эволюции и специализации плодов. В сб.: *Пробл. эволюц. морфол. и биохим. в системат. и филогенезе раст.:* 117–125. Наукова Думка, Киев.
- [Melikjan A.P. 1981. O nekotoryh obshhikh tendencijah v jevoljucii i specializacii plodov. In: *Probl. jevoljuc. morfol. i biokhim. v sistemat. i filogenii rast.:* 117–125. Naukova Dumka, Kiev. (In Russian)]
- ОГАНЕСЯН М.Э. 1982.** Систематика представителей родов *Campanula* L. и *Symphyantra* A. DC. Южного Закавказья. Автореф. дис... канд. биол. наук. АН АрмССР, Ин-т ботаники, Ереван.
- [Oganesjan M.E. 1982. Systematyka predstaviteley rodov *Campanula* L. i *Symphyantra* A. DC. Yuzhnogo Zakavkazia. Avtoref. diss... kand. biol. nauk. AN ArmSSR, In-tut Botaniki, Yerevan. (In Russian)]
- ОГАНЕСЯН М.Э. 1985.** Особенности строения семян родов *Campanula* и *Symphyantra* (Campanulaceae). *Бот. журн.* **70 (7):** 947–955.
- [Oganesjan M.E. 1985. Osobennosti stroenija semjan rodov *Campanula* i *Symphyantra* (Campanulaceae). *Russ. Bot. J.* **70 (7):** 947–955. (In Russian)]
- ОЛЬШАНСЬКИЙ И.Г. 2009.** Морфологична будова та ультраструктура поверхні насінин видів родини Juncaceae Juss. флори України. *Укр. ботан. журн.* **66 (2):** 179–190.
- [Olshanskyi I.G. 2009. Morfologichna budova ta ul'trastruktura poverhni nasinin vidiv rodini Juncaceae Juss. flori Ukraini. *Ukr. Bot. J.* **66 (2):** 179–190. (In Ukrainian)]
- ОЛЬШАНСЬКИЙ И.Г. 2012.** Морфологична будова й ультраструктура поверхні насінин ожики кримської (*Luzula taurica* (V.I. Krecz.) Novikov, Juncaceae). *Mod. Phytomorphol.* **1:** 157–160.
- [Olshanskyi I.G. 2012. Morphology and surface ultrastructure of seed in *Luzula taurica* (V.I. Krecz.) Novikov (Juncaceae). *Mod. Phytomorphol.* **1:** 157–160. (In Ukrainian)]
- ПЕРЕГРИМ О.М. 2014.** Морфологічні особливості поверхні насінин видів секції *Anodontae* (Bunge) Maxim. роду *Pedicularis* L. (Orobanchaceae Vent.) флори Європи. *Mod. Phytomorphol.* **5:** 227–233.
- [Peregrym O.M. 2014. Morphological features of seed surface of the section *Anodontae* (Bunge) Maxim of *Pedicularis* L. in European flora. *Mod. Phytomorphol.* **5:** 227–233. (In Ukrainian)]
- ПЕРЕГРИМ О.М., ВАКУЛЕНКО Т.Б. 2009.** Анатомічна будова та ультраструктура поверхні насінин видів роду *Euphrasia* L. (Orobanchaceae) флори України. *Укр. ботан. журн.* **66 (1):** 111–117.
- [Peregrym O.M., Vakulenko T.B. 2009. Anatomichna budova ta ul'trastruktura poverhni nasinin vidiv rodu *Euphrasia* L. (Orobanchaceae) flori Ukraini. *Ukr. Bot. J.* **66 (1):** 111–117. (In Ukrainian)]
- ПЕРЕГРИМ О.М., ФУТОРНА О.А. 2013.** Морфологія насінин видів роду *Pedicularis* L. секції *Edentulae* Benth. (Orobanchaceae Vent.) Східної Європи. *Mod. Phytomorphol.* **3:** 249–254.
- [Peregrym O.M., Futorna O.A. 2013. Seed morphology of section *Edentulae* Benth. of the genus *Pedicularis* L. (Orobanchaceae Vent.) in the Eastern Europe. *Mod. Phytomorphol.* **3:** 249–254. (In Ukrainian)]
- ФЕДОРОВ А.А. 1957.** Сем. Campanulaceae Juss. В кн.: КОМАРОВ В.А. (ред.), Флора СССР. **Т. 24:** 126–450. Изд-во АН СССР, Москва – Ленинград.
- [Fedorov A.A. 1957. Sem. Campanulaceae Juss. In: Komarov V.L. (ed.), Flora SSSR. Vol. 24: 126–450. Izd-vo AN SSR, Moskva – Leningrad. (In Russian)]
- ФЕДОРОВ А.А. 1978.** Сем. Campanulaceae Juss. В кн.: ФЕДОРОВ А.А. (ред.), Флора Европейской части СССР. **Т. 3:** 219–220. Изд-во АН СССР, Ленинград.
- [Fedorov A.A. 1978. Sem. Campanulaceae Juss. In: Fedorov A.A. (ed.), Flora evropeyskoy chasti SSSR. Vol. 3: 219–220. Izd-vo AN SSR, Leningrad. (In Russian)]
- ФУТОРНА О.А., ЖИГАЛОВА С.Л. 2014.** Ультраструктура поверхні насінин видів роду *Gladiolus* L. (Iridaceae Juss.) флори України. *Чорноморський ботан. журн.* **10 (1):** 15–25.
- [Futorna O.A., Zhigalova S.L. 2014. Ul'trastruktura poverhni nasinin vidiv rodu *Gladiolus* L. (Iridaceae Juss.) flori Ukraini. *Chornomorskiy Bot. J.* **10 (1):** 15–25. (In Ukrainian)]
- ЭЗЛУ К. 1980.** Анатомия растений. Мир, Москва.
- [Esau K. 1980. Anatomija rastenij. Mir, Moskva. (In Russian)]

- AKCIN T.A. 2009.** Seed coat morphology of some Turkish *Campanula* (Campanulaceae) species and its systematic implications. *Biologia* **64** (6): 1089–1094.
- ATTAR F., KESHVARI A., GHAHREMAN A., ZARRE S., AGHABEIGI F. 2007.** Micromorphological studies on *Verbascum* (Scrophulariaceae) in Iran with emphasis on seed surface, capsule ornamentation and trichomes. *Flora* **202** (2): 69–175.
- BARTHLOTT W. 1981.** Epidermal and seed surface characters of plants: systematic applicability and some evolutionary aspects. *Nordic J. Bot.* **1** (3): 345–355.
- BARTHLOTT W. 1984.** Microstructural features of seed surfaces. In: HEYWOOD V.H., MOORE D.M. (eds.), *Current concepts in plant taxonomy*: 95–105. University of Reading, Academic Press, England.
- BARTHLOTT W., NEINHUIS C., CUTLER D., DITSCH F., MEUSEL I., THEISEN L., WILHELMI H. 1998.** Classification and terminology of plant epicuticular waxes. *Bot. J. Linn. Soc.* **126** (3): 237–260.
- BOISSIER E. 1875.** *Flora Orientalis*. 3. Genevae et Basilea.
- BUSS C.C., LAMMERS T.G., WISE R.R. 2001.** Seed-coat morphology and its systematic implications in cyanea and other genera of Lobelioidea (Campanulaceae). *Am. J. Bot.* **88** (7): 1301–1308.
- CAROLIN R.D. 1980.** Pattern of seed surface of *Goodenia* and related genera. *Austral. J. Bot.* **28**: 123–137.
- DAMBOLDT J. 1979.** Campanulaceae Juss. In: DAVIS P.H. (ed.), *Flora of Turkey*. Vol. 6: 2–89. Edinburgh University Press, Edinburgh.
- JAYEOLA A.A., THORPE J.R. 2000.** A scanning electron microscope study of the adaxial leaf surface of the genus *Calyptrochilum* Kmenzl. (Orchidaceae) in West Africa. *Feddes Repert.* **111**: 315–320.
- JUNIPER B.E. 1959.** The surface of plants. *Endeavour* **18** (69): 20–25.
- KROCHMAL A., HUGUELY J. 1971.** Seed descriptions of four common lobelias. *Castanea* **36**: 257–259.
- MOAZZENI H., ZARRE S., AL-SHEHBAZ I.A., MUMMENHOFF K. 2007.** Seed-coat microsculpturing and its systematic application in *Isatis* (Brassicaceae) and allied genera in Iran. *Flora* **202**: 447–454.
- PEREGRYM O.M. 2013.** Seed morphology of species of the genus *Pedicularis* L. (Orobanchaceae Vent.) of the Eastern European flora. *3rd Symposium on the Biology of Non-Weedy Parasitic Plants (Namur, Belgium, 12-15 September 2013)*: 19.
- SHETLER S.G., MORIN N.R. 1986.** Seed morphology in North American Campanulaceae. *Ann. Mo. Bot. Gard.* **73** (4): 653–688.
- ZHYGALOVA S.L., FUTORNA O.A. 2013.** The micromorphology study of *Gladiolus* L. (Iridaceae Juss.) species in Ukraine. *Actual Problems of Botany and Ecology. (Proc. of Int. Sci. Conf. Young Sci., Scholkine, 18-22 June 2013)*: 130–131. Phytosociocenter, Kyiv.
- ZHYGALOVA S.L., FUTORNA O.A., LEVANETS A. 2014.** Micromorphological study (ultrastructure of lamina surface, seeds, ultrasculpture of pollen grains) of *Gladiolus* L. species (Iridaceae Juss.) of Ukrainian flora. *Environ. Socio.-Econ. Stud.* **2** (4): 21–27.

**MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE SEEDS OF SPECIES FROM SUBSECTION
HETEROPHYLLA (NYM.) FED. OF THE GENUS CAMPANULA L. IN THE FLORA OF UKRAINE**

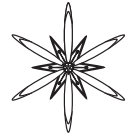
N.G. DREMLIUGA¹ & O.A. FUTORNA^{1,2}

Abstract. The morphological peculiarities of seeds in four species (*Campanula rotundifolia*, *C. kladniana*, *C. polymorpha*, *C. serrata*) from subsection *Heterophylla* (Nym.) Fed. in the flora of Ukraine were studied. Both common (size, lack of pubescence and appendages, shine, brown colour) and specific (sizes, shape, ultrastructure of the surface) features have been revealed.

Key words: *Campanula*, *Heterophylla*, seed, surface ultrastructure, flora of Ukraine

¹ Ukraine, M.G. Kholodny Institute of Botany of NAS of Ukraine, Tereschenkivska str. 2, 01001 Kyiv, Ukraine; natalia.dremluiga@bigmir.net

² O.V. Fomin Botanical Garden, Educational-Scientific Centre «Institute of Biology», National Taras Shevchenko University of Kyiv, Symon Petlyura str. 1, 01601 Kyiv, Ukraine; oksana_drofa@yahoo.com



МОРФОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ЛИСТКІВ *DELPHINIUM SERGII* WISSJUL. В ОНТОГЕНЕЗИ

АЛЛА М. ГНАТЮК

Анотація. Представлено результати дослідження морфологічної різноманітності листків у особин *Delphinium sergii* Wissjul., ендеміка східного Причорномор'я, при вирощуванні його в культурі в Національному ботанічному саду ім. М.М. Гришка НАН України. Встановлено, що для *D. sergii* характерна гетерофілія та морфологічна мінливість форми листкових пластинок, що проявляється в онтогенезі при формуванні вегетативного і генеративного пагонів. Встановлено зв'язок ступеня розчленованості листкових пластинок з ярусами їх формування та віком. Більш розчленовані листки є «старшими», а прості – більш «молодими». В межах пагона спостерігається ускладнення форми листкових пластинок у напрямку від низової формації до середньої і поступове спрощення у листків верхової формації. Формування різних за формою листків у одновікових особин однакового вікового стану залежало від освітлення, зволоженості ґрунту, щільності посівів, генетичної неоднорідності особин, а отже пластичності виду в різних умовах зростання.

Ключові слова: Ranunculaceae, *Delphinium sergii*, морфологічна мінливість листків, гетерофілія, поліморфізм, онтогенез

Національний ботанічний сад ім. М.М. Гришка НАН України, вул. Тімірязєвська, 1, 01014, м. Київ, Україна; colchicum@i.ua

Вступ

Явище гетерофілії – утворення на одному стеблі листків різної форми, яке супроводжується змінами їх структурно-функціональної організації, описане у багатьох видів судинних рослин, в тому числі у суходільних і вищих водних рослин. Зміна форми листків – це вияв пластичності їхнього росту на всіх рівнях організації: починаючи зі зміни напрямку поділу клітин, і закінчуючи змінами на субклітинному та молекулярному рівнях (Недиха 2011). У суходільних рослин гетерофілія спостерігається як під час росту вегетативного пагона, так і при формуванні квітоносного пагона (Givnish 1987; Givnish *et al.* 1994; Наумов 2009).

Особливий інтерес у дослідників завжди викликали ті рослини, в яких ще на початку структурування є видимими значні відмінності ювенільних етапів розвитку від більш пізніх. Ця різниця є особливо помітною в характері листків, які у молодих рослин значно відрізняються від таких у дорослих особин. Подібний тип розвитку був названий

К. Гебелем (Goevel 1882) гетеробластним. Н.П. Кренке (1933-1935) відмічав, що у окремих видів рослин існує значна кореляція ступеня розчленованості листкової пластинки з ярусами їх формування, що вказує на те, що їх розчленованість є віковою ознакою. Збільшення глибини розчленування у кожному черговому ярусі виражає ступінь зрілості даної групи рослин.

Відомо, що в стресових умовах реалізується ширший спектр морфогенетичних траєкторій чи «морфозів», який в звичайних «нормальних» умовах зарегульований і не проявляється у повній мірі. Будь-яка мінливість характеризує фенотипічну пластичність і рухливість організму та вказує на можливості і шляхи його формоутворення. В ході розвитку метамери стикаються з великою різноманітністю умов його реалізації, і за їх фенотипічною різноманітністю можна судити про морфогенетичну «широту норми реакції» даної особини (Васильєв 2009). Дослідження морфологічної мінливості рослин в умовах інтродукції (*ex situ*) є

особливо актуальним для раритетних видів, оскільки воно демонструє адаптивні можливості особин.

Безумовний інтерес у цьому відношенні має родина Ranunculaceae, представники якої вирізняються значною адаптивною та еволюційною пластичністю (Барькіна 1995). Часто зовнішні ознаки, що самі по собі не мають пристосувального значення, можуть бути показниками біологічних і фізіологічних властивостей і можуть допомогти зрозуміти спрямування тих процесів, в результаті яких виробляються екотипи (Синская 1948).

Вихідною формою у родині Ranunculaceae вважають трійчато-лопатеві або розсічені листки, а пальчато-розсічені або роздільні листки – як такі, що утворились за рахунок розділення середнього сегмента трійчатої пластинки на три, а бокових – на дві частини. Складні листки розвивались з простих в результаті розділення пластинки на сегменти до основи і формування самостійних черешків (Зиман 1985).

Значна внутрішньо- та міжвидова варіабельність форми, розмірів та характеру розчленування листкових пластинок часто спостерігається у видів роду *Delphinium* L., що дещо ускладнює їх систематику (Мухаметзянова *и др.* 2001; Федоров 2003). Незважаючи на велику кількість публікацій, присвячених представникам роду та їх онтоморфогенезу, усе ще недостатньо уваги приділено дослідженню поліморфізму листків на різних етапах розвитку рослин цього роду. В зв'язку з цим були здійснені дослідження морфологічної різноманітності листків у особин *D. sergii* при вирощуванні його в культурі в Національному ботанічному саду ім. М.М. Гришка НАН України.

Матеріали і методи досліджень

Дослідження здійснювали протягом 5 років. Матеріалом слугували рослини *D. sergii* колекції ділянки «Рідкісні рослини флори України» НБС ім. М.М. Гришка НАН України. Рослини розмножували генеративно і слідували за розвитком і ростом в умовах культури (насіння висівали

в ґрунт на різні ділянки у дворазовій повторності). Щороку здійснювали дослідження їх розвитку. З появою нових органів, рослини вимірювали та здійснювали фотофіксацію. Дослідження проводили окремо по кожній групі особин у однаковому віковому стані: досліджували форму та розмір їх листкових пластинок у різних особин різного віку та особливості та черговість появи листків на окремій особині. За основу класифікації вікових станів прийнято термінологію та схему Т.А. Работнова (1950), доповнену в подальшому його послідовниками (Семенова 1989). Розміри встановлювали за результатами вимірювання 10-30 листків. Такий показник як діаметр листової пластинки відповідає найбільшому діаметру кола, в яке можна її вписати. Для опису ступеня розчленування листової пластинки підраховували кількість її сегментів (часток), не враховуючи глибину розсічення (Рис. 1).

Результати та їх обговорення

D. sergii – ендемік східного Причорномор'я, занесений до Червоної книги України зі статусом «вразливий». В природних умовах трапляється в Понтичній провінції та на Кавказі. В Україні знайдений на Донецькому кряжі та Приазовській височині. *D. sergii* – багаторічна трав'яниста ефемероїдна рослина 40-100 см заввишки, з прямостоячим простим або розгалуженим стеблом і пальчаторозсіченими листками. Вид поліморфний і рослини варіюють за забарвленням квіток, опушенням та порізаністю листків (Дідух 2009).

D. sergii відносять до секції *Diedropetala* Huth підроду *Oligophyllon* Dimitrova, куди занесено види, представлені безрозетковими бульбодореневищними трав'янистими полікарпіками з характерним бульбодореневищним потовщенням базальних частин пагонів та раннім відмиранням системи головного кореня. Види цієї групи – геліофіти-ксерофіти, оскільки приурочені до відкритих більш-менш сухих ділянок в горах та на рівнинах (Зиман 1985).

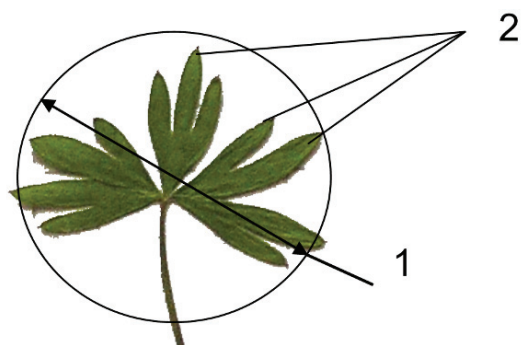


Рис. 1. Параметри листової пластинки *Delphinium sergii*: 1 – діаметр; 2 – сегменти.

Fig. 1. Parameters of *Delphinium sergii* leaf blade: 1 – diameter; 2 – segments.

Прегенеративні особини розвивають поліциклічні або дициклічні розеткові пагони з різною кількістю листків. Перші фази розвитку пагона у *D. sergii*, як у класичного геофіта, проходять в ґрунті. Проростки безепікотильні, гіпокотиль короткий. Вони формуються навесні наступного після сівби року (проростання спостерігається при підвищенні температури вдень від 15-19 °С), проростання надземне (проте насінні оболонки не завжди виносяться на поверхню). Сім'ядольних листочків два, близько 0,4-1 см. завдовжки та 0,5-0,8 см завширшки, з округлими чи еліптичними загостреними на верхівці листовими пластинками, на черешках, які зрослися в базальній частині (Рис. 2). На даному етапі розвитку не спостерігалось відхилень у формі листових пластинок, особини відрізнялись лише їх розмірами. У частини рослин через 4-5 тижнів після появи сім'ядольних листків розгортається перший справжній листок. Він має черешок від 2 до 10 см завдовжки та листову пластинку 1-2(3) см в діаметрі, дво-, три-, чоти- та п'ятилопатеву, пальчато-роздільну чи розсічену. У деяких рослин згодом відростає ще один або 2 листки з різним ступенем розсіченості листової пластинки: від трійчато-розсічених до майже пальчато-роздільних, трійчато-роздільних і двичлопатевих. Внаслідок розчленування листової пластинки утворюються від 2 до 8 сегментів і можна прослідкувати послідовний ряд їх утворення (Рис. 3). Перший справжній

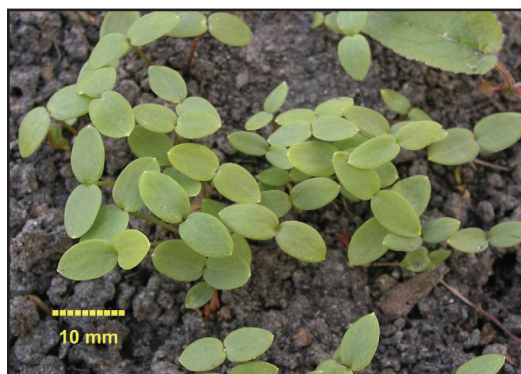


Рис. 2. Проростки *Delphinium sergii*.

Fig. 2. Seedlings of *Delphinium sergii*.

та наступні листки візуально розміщуються поряд із сім'ядольними, оскільки піхви їх черешків знаходяться в ґрунті біля бруньки відновлення.

Вже у перший рік вегетації спостерігається відмінність у морфологічній будові листків особин однієї вікової групи та окремої особини і поступове ускладнення форми листової пластинки в процесі онтогенезу (Гнатюк 2014). Існує певна адаптивна різниця у формуванні листових пластинок у особин, що перебувають у різних умовах освітлення: в напівтіні формувались менш розсічені листки з більшою площею фотосинтетичної поверхні, ніж у рослин в умовах повного освітлення (Рис. 3 а, б).

На другий рік вегетації формуються іматурні, віргінільні та молоді генеративні особини. Іматурні і віргінільні особини утворюють 2-3 справжніх листки, що можуть суттєво різнитися за розмірами у окремих особин, вони від 1 до 6 см в діаметрі і розділені на 4-16 сегментів (Рис. 4 а). Листки менші та мають листові пластинки іншої форми, ніж у генеративних особин. Кожний наступний листок, що формується на особині (старший за віком), переважно, має більш складну за формою листову пластинку і вже у віргінільних особин листки мають від 6 до 34 сегментів (Рис. 4 б). В онтогенезі *D. sergii* спостерігається перехід біоморфи рослини від розеткової з моноподіальним типом наростання і напіврозеткової до безрозеткової. *D. sergii* в прегенеративному

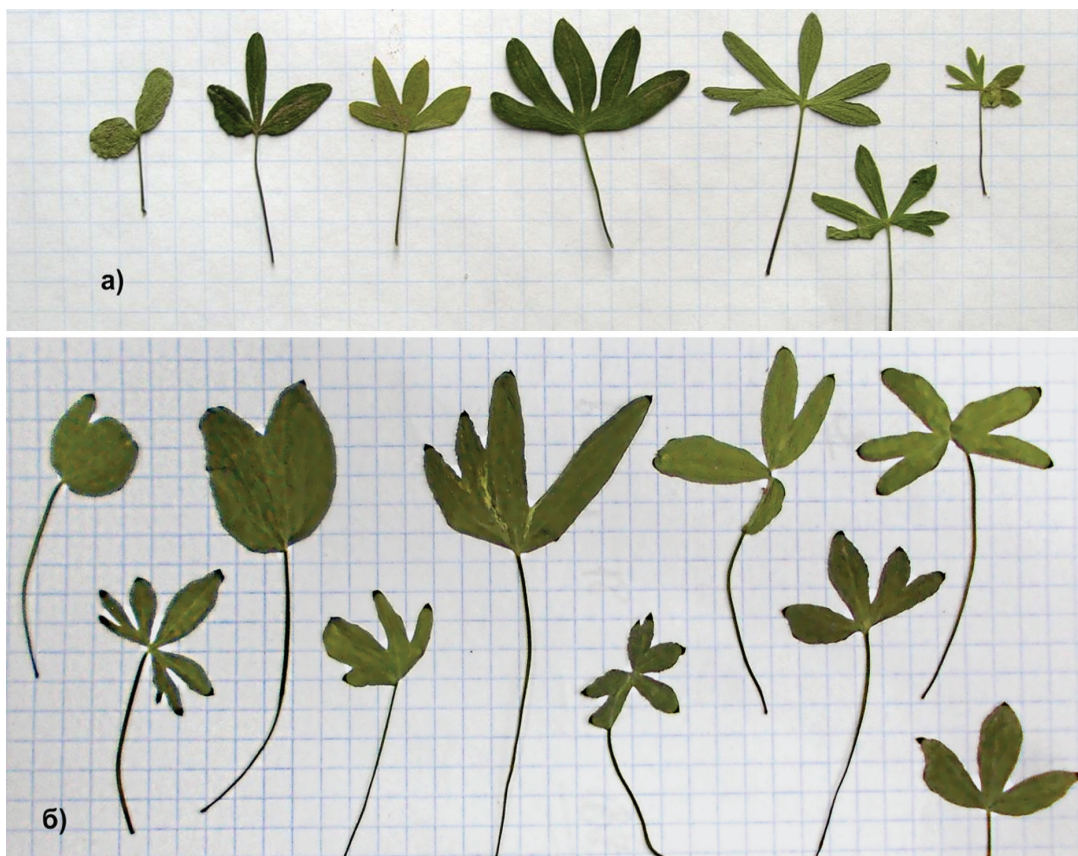


Рис. 3. Листки одновікових (однорічних) ювенільних особин *Delphinium sergii*: **а** – в освітлених умовах; **б** – у затінку. 1 клітинка = 5 × 5 мм.

Fig. 3. Leaves of same-aged (annual) juvenile individuals of *Delphinium sergii*: **a** – in bright conditions; **b** – in shaded conditions. 1 scale cell = 5 × 5 mm.

періоді розвитку знаходиться у стані відкритого вкороченого пагона, утворюючи розетку прикореневих (приземних) листків, а у генеративному віковому стані головний пагін завершує свій розвиток як відкритий та формує безрозетковий пагін з почерговим листорозміщенням, ріст якого закінчується утворенням суцвіття.

Неодноразність розвитку листків у генеративних особин, а також наявність на одному пагоні різновікових листків, що відрізняються морфологією, дають можливість говорити про гетерофілію у особин *D. sergii* і виділяти листкові серії. В листкову серію входить ряд послідовно сформованих листків: від найстарших до молодих. Листки одного віку у складі серії формують листкову формацію.

У *D. sergii* виділяємо наступні три листкові формації: 1) низову – представлену розетковими листками, піхви черешків яких знаходяться в ґрунті біля бруньки); 2) серединну – це зрілі, дефінітивні листки розміщені надземно на квітконосному пагоні; 3) верхову – недорозвинені видозмінені листки, що утворюються по мірі росту суцвіття та приквітти. Перехід між формаціями на квітконосному пагоні поступовий і полягає у спрощенні їх структури, зокрема, у редукції черешка, зменшенні числа часток листкової пластинки та їх загального розміру. Листки низової формації на момент квіткування відмирають.

Листки верхової формації розташовані на рівні суцвіття. Це сидячі листки-приквітти, які на нижніх рівнях мають розсічену

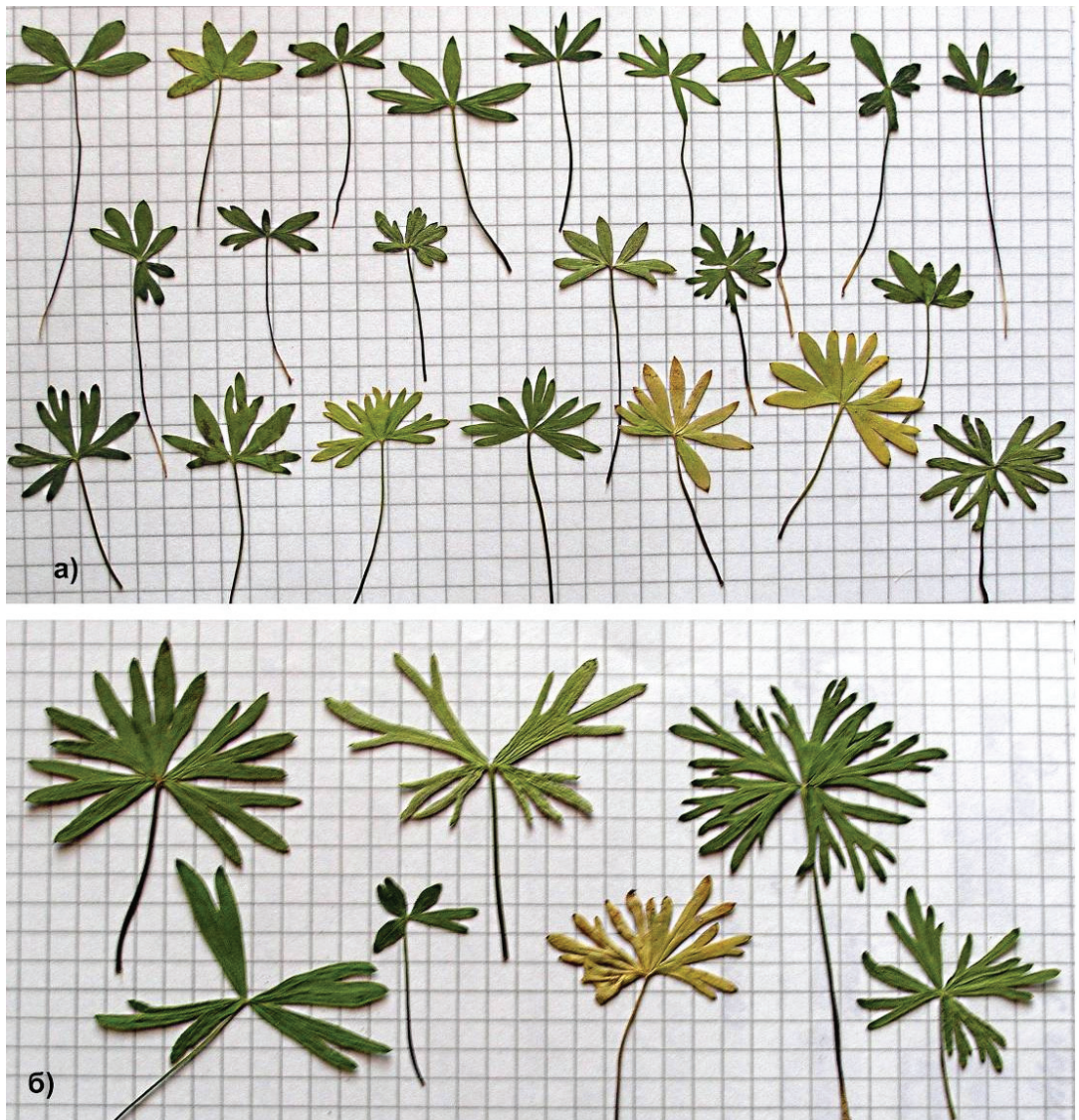


Рис. 4. Листки дворічних іматурних (а) та віргінільних (б) особин *Delphinium sergii*. 1 клітинка = 5 × 5 мм.

Fig. 4. Leaves of biennial immature (a) and virginile (b) individuals of *Delphinium sergii*. 1 scale cell = 5 × 5 mm.

пластинку, що поступово змінюється на майже цілісну або цілісну ланцетоподібну на вищих рівнях. Процес переходу від листків серединної формації до верхової проявляється у зменшенні довжини черешка до майже повної його редукції та зменшенні розмірів і розчленованості листкової пластинки (Рис. 5).

Найбільшими за розмірами і ступенем розсіченості є дефінітивні листки серединної формації. Їх 3-7, вони від 5 до 23 см в діаметрі

(їх розмір насамперед залежить від розміру самої рослини і умов вирощування) і переважно тричі розсічено п'ятироздільні за формою.

На генеративній стадії розвитку поліморфізм листків між особинами виражений менше і проявляється у різній ширині часток на які розділена листкова пластинка (від 0,2 до 0,7 см) та кількості цих часток (від 70 до 105), при цьому у кожній окремій особини можна чітко

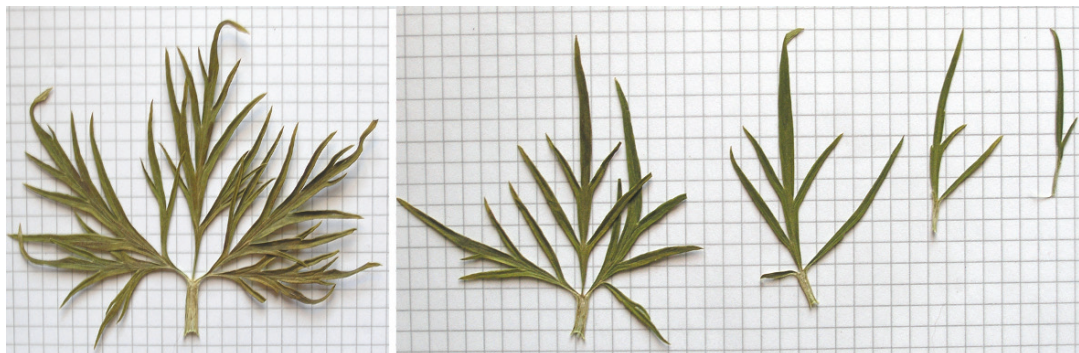


Рис. 5. Листки верхової формації у окремої особини *Delphinium sergii* (зліва направо – від основи до верхівки суцвіття). 1 клітинка = 5 × 5 мм.

Fig. 5. Leaves of the upper formation of *Delphinium sergii* individual (from left to right – from the base to the top of the inflorescence). 1 scale cell = 5 × 5 mm.



Рис. 6. Листки генеративних особин *Delphinium sergii* (перший листок верхової формації). 1 клітинка = 5 × 5 мм.

Fig. 6. Leaves of generative individuals of *Delphinium sergii* (the first leaf of upper formation). 1 scale cell = 5 × 5 mm.

прослідкувати зміни у формі листків серединної та верхової формації (Рис. 6).

Нашим дослідженням встановлено, що в результаті генеративного розмноження *D. sergii* утворює покоління особин, що відрізняються між собою формою та ступенем розсіченості листкових пластинок. Ця різниця є помітною не лише у прегенеративних особин, а також у генеративних особин під час цвітіння (Рис. 7).

Висновки

Таким чином, *D. sergii* характерна як гетерофілія, що проявляється в онтогенезі при формуванні вегетативного і генеративного пагонів так і морфологічна мінливість, що

проявляється у розвитку різних за формою листкових пластинок у різних особин.

Зарозміщенням на рослині можна виділити наступні листові формації (серії): низову, серединну та верхову. Перехід між низовою і серединною формаціями поступовий і полягає в збільшенні розсіченості та розмірів листкових пластинок. Процес переходу від листків серединної формації до верхової проявляється у зменшенні довжини черешка до майже повної його редукції та зменшенні розмірів і розчленованості листової пластинки.

В онтогенезі відбувається ускладнення цілісної форми листової пластинки шляхом поступового розчленування до трійчастої і наступного розділення бічних сегментів трійчастої пластинки на 2 і 4



Рис. 7. Листки серединної формації особин *Delphinium sergii* за однакових умов вирощування.

Fig. 7. Leaves of the middle formation of *Delphinium sergii* individuals under identical growing conditions.

частки у ювенільних особин і середнього сегмента на 3 і більше часток – у іматурних і віргінільних особин. Як наслідок, в межах пагона спостерігається ускладнення форми листових пластинок у напрямку від низової формації до серединної і поступове спрощення у листків верхової формації. Найхарактернішою є тричленна структура листка, яка проглядається і у дефінітивних листків серединної формації у генеративних особин, що виглядають майже п'ятичленими за рахунок значного розсічення бічних сегментів.

Існує кореляція ступеня розчленованості листової пластинки з ярусами їх формування та їх віком. Більш розчленовані листки є «старшими», а прості – більш «молодими» що вказує на те, що їх розчленованість є віковою ознакою. Збільшення глибини та ступеня розчленування у кожному черговому ярусі та віковій групі особин виражає ступінь зрілості рослин.

Слід відмітити, що формування різних за формою листків у одновікових особин однакового вікового стану по різному проявлялось під впливом зовнішніх факторів. Їх розмір та різноманітність залежить від освітлення, зволоженості ґрунту, щільності посівів та конкуренції: найбільшою різноманітністю форм листових пластинок вирізнялись рослини, що зростали у затіненому місці, проте варіабельність спостерігалась на всіх дослідних ділянках, що підтверджує генетичну неоднорідність

особин та пластичність виду в різних умовах зростання.

Найбільшою різноманітністю форм листових пластинок вирізняються прегенеративні особини. З переходом до генеративного стану поліморфізм листків менш виражений, спостерігається тенденція збереження більшої або меншої розсіченості листових пластинок при консервативності інших ознак, зокрема, форми та розмірів квіток.

Використані джерела

- БАРЫКИНА Р.П. 1995.** Морфолого-экологические закономерности соматической эволюции в семействе лютиковых (Ranunculaceae Juss.). Автореф. дис... д.б.н. Москва.
- [Barykina R.P. 1995. Morpho-ecological trends of somatic evolution in the buttercup family (Ranunculaceae Juss.). Abstr. Dr thesis. Moscow. (In Russian)]
- ВАСИЛЬЕВ А.Г. 2009.** Феногенетическая изменчивость и популяционная мерономия. *Журнал общей биологии* **70** (3): 195–209.
- [Vasiljeva A.G. 2009. Phenogenetic variation and populational meronomics. *J. Common Biol.* **70** (3): 195–209. (In Russian)]
- ГНАТЮК А.М. 2014.** Особливості онтоморфогенезу *Delphinium sergii* Wissjul. в умовах культури в Національному ботанічному саду ім. М.М. Гришка НАН України. *Інтродукція рослин* **4**: 39–44.
- [Gnatiuk A.M. 2014. Peculiarities of ontomorphogenesis of *Delphinium sergii* Wissjul. in conditions of culture in M.M. Gryshko National botanical garden of NAS of Ukraine. *Plant Introduct.* **4**: 39–44. (In Ukrainian)]
- ДІДУХ Я.П. (ред.) 2009.** Червона книга України. Рослинний світ. Глобалконсалтинг, Київ.

- [Didukh Ya.P. (ed.) 2009. Red book of Ukraine. Plant world. Globalconsulting, Kyiv. (In Ukrainian)]
- ЗИМАН С.Н. 1985.** Морфология и филогения семейства лютиковых. Наук. думка, Київ.
- [Zyman S.N. 1985. Morphology and phylogeny of buttercup family. Nauk. dumka, Kyiv. (In Russian)]
- КРЕНКЕ Н.П. 1933-1935.** Феногенетическая изменчивость. Т. 1. Москва.
- [Krenke N.P. 1933-1935. Phenogenetic variation. Vol. 1. Moscow. (In Russian)]
- МУХАМЕТЗЯНОВА К.Ф., КАНЧУРИН М.Н., ФЕДОРОВ Н.И., РЕДЬКИНА Н.Н. 2001.** Морфологические особенности растений рода *Delphinium* L. на ранних этапах онтогенеза. Труды Сибайского института Башкирского гос. университета **1**: 117–121. Сибай.
- [Mukhametzianova K.F., Kantchurin M.N., Fedorov N.I., Red'kina N.N. 2001. Morphological peculiarities of plants from the genus *Delphinium* L. on early stages of ontogenesis. Proc. Sibai Inst. Bashkir. State Univer. **1**: 117–121. Sibai. (In Russian)]
- НАУМОВ С.Ю. 2009.** Морфология и анатомия листа сельдерейных. Этон-2, Луганск.
- [Naumov S.Yu. 2009. Morphology and anatomy of celeries leaf. Elton-2, Luhansk. (In Russian)]
- НЕДУХА О.О. 2011.** Гетерофілія у рослин. Альтерпрес, Київ.
- [Nedukha O.O. 2011. Heterophylly in plants. Altpress, Kyiv. (In Ukrainian)]
- РАБОТНОВ Т.А. 1950.** Определение возрастного состава популяций видов в сообществе. Полевая геоботаника. Наука, Москва – Ленинград.
- [Rabotnov T.A. 1950. Determination of the age composition of species populations in the community. Field geobotany. Science, Moscow – Leningrad. (In Russian)]
- СЕМЕНОВА Г.П. 1989.** Интродукция редких растений как один из методов ускоренного изучения онтогенеза. В сб.: Рекомендации: онтогенез высших цветковых растений: 117–122. ЦУОП Госагропрома УССР, Киев.
- [Semenova G.P. 1989. Introduction of rare plants as a method of accelerated learning method of ontogenesis. In: Recommendations: ontogeny of higher flowering plants: 117–122. TSUOP Gosagroproma URSR, Kyiv. (In Russian)]
- СИНСКАЯ Е.Н. 1948.** Динамика вида. Огизсельхозгиз, Москва.
- [Sinskaya Ye.N. 1948. Species dynamics. Ogizselhozgiz, Moscow. (In Russian)]
- ФЕДОРОВ Н.И. 2003.** Род *Delphinium* L. на Южном Урале: экология, популяционная структура и биохимические особенности. Гилем, Уфа.
- [Fedorov N.I. 2003. Genus *Delphinium* L. in Southern Ural: ecology, population structure and biochemical peculiarities. Gilem, Ufa. (In Russian)]
- GIVNISH T.J. 1987.** Comparative studies of leaf form: assessing the relative roles of selective pressures and phylogenetic constraints. *New Phytol.* **106 (Suppl.)**: 131–160.
- GIVNISH T.J., SYTSA K.J., SMITH J.F., HAHN W.J. 1994.** Thorn-like prickles and heterophylly in *Cyanea*: adaptations to extinct avian browsers on Hawaii. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* **91**: 2810–2814.
- ГОЕВБЕЛ К. 1882.** Beiträge zur Morphologie und Physiologie des Blattes III. Über die Anordnung der Staubblätter in einigen Blüten. *Bot. Ztg.* **40**: 353–364.

MORPHOLOGICAL FEATURES OF *DELPHINIUM SERGII* WISSJUL. LEAVES IN ONTOGENY

A.M. GNATIUK

Abstract. There are represented results of the study on leaf shape and its morphological diversity of the *Delphinium sergii* Wissjul. which is an endemic species of Eastern Black Sea Coast and was introduced in the culture at the M.M. Gryshko National Botanical Garden NAS of Ukraine. It is found that *D. sergii* is characterized by heterophylly and morphological variability of leaf blades which is manifested during ontogeny, in process of formation of its vegetative and generative shoots. The correlation of the dissection degree of the leaf blades with their formation and age has been established. More deeply dissected leaves are «older» while with complete laminas are more «younger». During the ontogenesis firstly occurs the complication of a simple lamina in seedlings by its division into segments. And, as a result, along the shoot the complication from lower to middle formations and further simplification of leaf structure in upper formation in generative individuals is observed. Formation of different by shape leaves in individuals of the same age stage as well as of the same age depends from conditions of lighting, soil moisture, crop density, and genetic heterogeneity, and therefore – from morphological plasticity of individuals in different conditions of growth.

Key words: Ranunculaceae, *Delphinium sergii*, morphological variability, polymorphism, heterophylly, ontogenesis

M.M. Gryshko National Botanical Garden NAS of Ukraine, Timiryazevska str. 1, 01014 Kyiv, Ukraine; colchicum@i.ua



УДК 581.441:633.111.1

РІСТ І ПРОДУКТИВНІСТЬ КОЛОСА *TRITICUM AESTIVUM* L. ЗА РІЗНИХ УМОВ МІНЕРАЛЬНОГО ЖИВЛЕННЯ

ОЛЬГА І. ЖУК

Анотація. Вивчали ріст колоса озимої пшениці за оптимального і недостатнього забезпечення головними елементами мінерального живлення (азотом, фосфором і калієм). Показано, що дефіцит мінерального живлення спричиняв передчасне припинення росту колоса і скорочення його довжини у пшениці сортів 'Миронівська 808' і 'Фаворитка'. Недостатня кількість живлення призводила до зниження маси колоса головного і бічного пагонів, маси крупних і середніх зерен, маси зерен у колосі. У пшениці сортів 'Миронівська 808' і 'Фаворитка' виявлена редукція нижніх колосків у колосі за дефіциту живлення, що спричиняло зменшення кількості колосків, зерен у колосі. Період росту колосу у обох досліджених нами сортів в оптимальних умовах був однаковим, що обумовлено близькою тривалістю фаз онтогенезу. Дефіцит мінерального живлення прискорював дозрівання рослин, однак зменшував виповненість зерна у сорту 'Миронівська 808'. Зрілі зернівки у сорту 'Фаворитка' були виповненими навіть в умовах недостатнього мінерального живлення.

Ключові слова: *Triticum aestivum*, озима пшениця, колос, мінеральне живлення

Інститут фізіології рослин та генетики НАН України, вул. Васильківська 31/17, м. Київ, 03022, Україна;
zhuk_bas@voliacable.com

Вступ

Визначна роль у формуванні врожаю у пшениці належить процесам росту і розвитку репродуктивних органів, колоса (BANCAL 2009). Розміри колоса значною мірою визначають кількість зерна у ньому і продуктивність рослини, тому сучасні сорти пшениці мають великий колос. Нові технології створення сортів включають залучення генів з житніх транслокацій, що дозволяє підвищити урожайність та стійкість озимої пшениці до чинників середовища, більш ефективно використовувати мінеральне живлення коренями з ґрунту (WHITFORD *et al.* 2013). Встановлено, що рівень забезпечення живленням, зокрема азотом, і його утилізація з верхніх листків та стебла належить до важливих складових у забезпеченні наливу зерна у пшениці та рису (МАКІНО 2011). Нашими попередніми дослідженнями показано, що рівень забезпечення рослин озимої пшениці мінеральним живленням обумовлював інтенсивність росту і розвитку елементів

стебла, які транспортують у колос необхідні ресурси води і вуглеводів (ЖУК 2013; ЗНУК 2014). Виявлено, що дефіцит основних елементів мінерального живлення спричиняв затримку росту підколосового міжвузля та зменшення діаметру соломини, товщини шарів паренхіми і флоєми, які не лише постачають асиміляти до колоса, але й одночасно слугують запасним резервом вуглеводів у період старіння прапорцевого листка. Однак зв'язок між інтенсивністю росту колоса і забезпеченням рослин озимої пшениці мінеральним живленням залишився нез'ясованим.

Метою наших досліджень було вивчення специфіки росту колоса озимої пшениці і його продуктивності за різного забезпечення рослин основними елементами мінерального живлення.

Матеріали і методи досліджень

Роботу проводили в умовах вегетаційного дослідю. Рослини озимої м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.) сортів 'Миронівська 808'

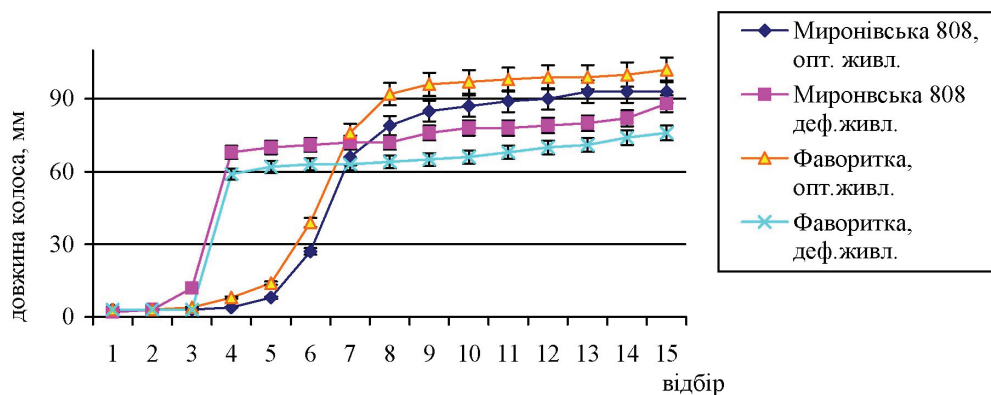


Рис. 1. Динаміка росту колоса головного пагона пшениці за різного забезпечення мінеральним живленням.

Fig. 1. Growth dynamics of wheat ear from the main stem under different mineral nutrition support.

і 'Фаворитка' вирощували на суміші дерново-підзолистого ґрунту з піском у посудинах місткістю 7,5 кг. Оптимальне живлення складало $N_{90}P_{90}K_{90}$ за діючою речовиною, недостатнє – $N_{32}P_{32}K_{32}$. Добрива вносили частинами в ґрунт під час набивки посудин і у фазі виходу рослин в трубку. Повторність досліджували шість разів. Протягом вегетаційного періоду від початку видовження стебла, під час якого відбуваються закладання і ріст колоса до фази молочно-воскової стиглості зерна проводили відбір і виміри лінійних розмірів колоса з інтервалом у 3 доби. Для кожного визначення використовували 15-20 колосів головного пагона. Після дозрівання рослин у період їх повної стиглості проводили аналіз структури врожаю, який включав визначення маси головного і бічного колосів, зерен на колос, 1000 зерен трьох фракцій, кількості зерен у колосі. Результати усіх дослідів обробляли статистично з використанням програми Microsoft Excel.

Результати та їх обговорення

Встановлено, що дефіцит мінерального живлення спричиняв зупинку росту колоса головного пагона у пшениці сортів 'Миронівська 808' і 'Фаворитка' раніше, ніж у рослин, які були достатньо забезпечені мінеральним живленням (Рис. 1).

Передчасне припинення росту колоса в умовах недостатнього забезпечення

рослин пшениці живленням зумовлювало зменшення його розмірів у обох сортів пшениці. Завершення росту колоса у довжину у пшениці сортів 'Миронівська 808' і 'Фаворитка' відбувалось одночасно і в умовах достатнього забезпечення рослин мінеральним живленням, що може бути обумовлено однаковою тривалістю вегетаційного періоду у цих сортів пшениці.

Оптимально забезпечені живленням рослини пшениці сорту 'Миронівська 808' формували колос, який мав не менше 16 колосків з виповненими крупними зернами (Рис. 2). Дефіцит мінерального живлення спричиняв не лише зменшення довжини колоса, а й кількості колосків у ньому до 12-14 (Рис. 3). Зернівки мали менший розмір, ніж у оптимально забезпечених рослин.

Пшениця сорту 'Фаворитка' в умовах оптимального забезпечення мінеральним живленням формувала колос, який містив 16-18 колосків (Рис. 4). На відміну від сорту 'Миронівська 808', у колосі сорту 'Фаворитка' не відзначена редукція нижніх колосків. Колоски центральної частини колоса містили 4-5 зерен, які були виповненими. Дефіцит мінерального живлення спричиняв зменшення розмірів колоса і кількості колосків у ньому у пшениці сорту 'Фаворитка' за рахунок редукції нижніх колосків (Рис. 5). У центральній частині колоса розмір і озерненість колосків не зменшувались, порівняно з такими у оптимально

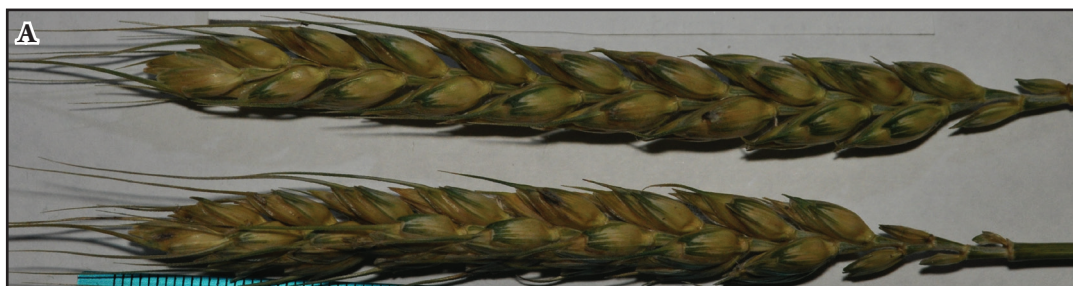


Рис. 2. Колос (А) і зернівки (Б) пшениці сорту 'Миронівська 808' вирощені за умов оптимального мінерального живлення.

Fig. 2. Ear (A) and grains (B) of wheat cultivar 'Mironivska 808' grown under optimal mineral nutrition.



Рис. 3. Колос (А) і зернівки (Б) пшениці сорту 'Миронівська 808' вирощені за умов дефіциту мінерального живлення.

Fig. 3. Ear (A) and grains (B) of wheat cultivar 'Mironivska 808' grown under deficit of mineral nutrition.



Рис. 4. Колос (А) і зернівки (Б) пшениці сорту 'Фаворитка' вирощені за умов оптимального мінерального живлення.

Fig. 4. Ear (A) and grains (B) of wheat cultivar 'Favoritka' grown under optimal mineral nutrition.



Рис. 5. Колос (А) і зернівки (Б) пшениці сорту 'Фаворитка' вирощені за умов дефіциту мінерального живлення.

Fig. 5. Ear (A) and grains (B) of wheat cultivar 'Favoritka' grown under deficit of mineral nutrition.

Табл. 1. Вплив мінерального живлення на урожай пшениці.**Tab. 1.** Effect of mineral nutrition on wheat yield.

Сорт, варіант	Маса	Маса	Кільк.	Кільк.	Маса 1000	Маса 1000	Маса 1000	Маса
	голов. кол., г	бічн. кол., г	зер. гол. кол., шт.	зер бічн. кол., шт.	зерен, г, круп.	зерен, г, серед.	зерен, дрібні	зерен на колос, г
'Миронівська 808', опт. живл.	2,8±0,6	1,6±0,5	37±4	27±5	46,8±0,5	38,6±0,5	19,7±0,6	0,72±0,2
'Миронівська 808', деф. живл.	2,2±0,6	0,9±0,4	34±2	19±5	44,4±0,6	37,5±0,6	20,8±0,5	0,43±0,2
'Фаворитка', опт. живл.	3,5±0,6	1,7±0,4	42±5	32±3	50,8±0,8	39,4±0,3	18,2±0,3	0,84±0,3
'Фаворитка', деф. живл.	3,1±0,5	0,5±0,3	39±4	23±5	44,7±0,6	32,6±0,5	19,7±0,5	0,66±0,3

забезпечених живленням рослин. Зернівки в колосі були виповненими, але дещо меншими за розміром порівняно з оптимальним варіантом.

Аналіз структури врожаю після дозрівання рослин дозволив встановити, що дефіцит мінерального живлення спричиняв зменшення маси головного і бічного колоса, кількості зерен у колосі і їх маси у сортів пшениці 'Миронівська 808' і 'Фаворитка' (Табл. 1). Розподіл зерен на три фракції за розмірами дозволив встановити, що найзначніше зменшення маси виявлено для крупних зернівок. Маса дрібних зерен залишалась незмінною.

Висновки

Дефіцит мінерального живлення спричиняв передчасну зупинку росту колоса озимої м'якої пшениці сортів 'Миронівська 808' і 'Фаворитка', що спричиняло зменшення кількості колосків і зерен у колосі. Інгібування ростових

процесів у колосі призводило до зменшення маси головного і бічного колоса, маси зерен у колосі, що може викликати зменшення врожаю цих сортів пшениці.

Використані джерела

- Жук О.І. 2013.** Ріст міжвузлів пшениці за різних умов мінерального живлення. *Mod. Phytomorphol.* **4:** 377–381.
- [Zhuk O.I. 2013. The growth of wheat internodes under different mineral nutrition conditions. *Mod. Phytomorphol.* **4:** 377–381. (In Ukrainian)]
- BANCAL P. 2009.** Early development and enlargement of wheat floret primordial suggest a role of partitioning within spike to grain set. *Field Crops Res.* **110:** 44–53.
- МАКИНО А. 2011.** Photosynthesis, grain yield and nitrogen utilization in rice and wheat. *Plant Physiol.* **155:** 125–129.
- WHITFORD R., FLEURY D., REIF J., CARCIA M., OKADA T., KORZUN V., LANGRIDGE P. 2013.** Hybrid breeding in wheat: technologies to improve hybrid wheat seed production. *J. Exper. Bot.* **64:** 5411–5428.
- ЖУК О.І. 2014.** The stem structure of *Triticum aestivum* L. under different mineral nutrition. *Mod. Phytomorphol.* **6:** 109–113.

THE EAR GROWTH AND PRODUCTIVITY OF *TRITICUM AESTIVUM* L. UNDER DIFFERENT MINERAL NUTRITION

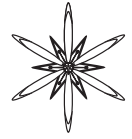
OLGA I. ZHUK

Abstract. The growth of winter wheat ear was studied under optimal and deficit support of main mineral nutrition elements – nitrogen, phosphor and potassium. It is shown that mineral nutrition deficit caused the completing of ear growth prematurely and reduced ear length in cultivars 'Mironivska 808' and 'Favoritka'. Nutrition deficit decreased ear

mass of main and side stem, mass of big and middle grains, grain mass in ear. It is detected reducing of lower spikelets in wheat cultivars 'Mironivska 808' and 'Favoritka' under nutrition deficit that caused decreasing quantity of spikelets and grains in ear. Period of ear growth in both investigated cultivars was equal in optimal conditions that was determined by the same duration of ontogenesis phasis. Deficit of mineral nutrition accelerated the plant germination but decreased the grain fullness in cultivar 'Mironivska 808'. Mature grains in cultivar 'Favoritka' were fulfilled even under mineral nutrition deficit conditions.

Key words: *Triticum aestivum*, winter wheat, ear, mineral nutrition

Institute of Plant Physiology and Genetics National Academy of Sciences of Ukraine Vasylykvska str. 31/17, 03022 Kyiv, Ukraine; zhuk_bas@voliacable.com



УДК 633.111.1; 632.4; 661.743.1

СПЕЦИФІКА ДІЇ ЕЛІСИТОРІВ НА МАКРОМОРФОГЕНЕЗ У *TRITICUM AESTIVUM* ЗА УМОВ ОДНОЧАСНОГО УРАЖЕННЯ *SEPTORIA TRITICI* ТА *PUCCINIA RECONDITA*

І.В. Жук^{1*}, О.П. ДМИТРІЄВ¹, Г.М. ЛІСОВА²

Анотація. Фітопатогенні гриби порушують макроморфогенез пшениці (*Triticum aestivum*), однак біотичні еліситори здатні стимулювати неспецифічну стійкість, ріст і розвиток пагонів рослин. Показано, що щавлева кислота в якості біотичного еліситора та донор сигнальної молекули оксиду азоту нітропрурид натрію сприяють росту стебла у висоту та прапорцевих листків у довжину, підвищують кількість зерен в колосі та продуктивність озимої пшениці сортів 'Поліська 90' та 'Столична' за умов ураження збудниками септоріозу (*Septoria tritici*) та бурої іржі (*Puccinia recondita*) в польових умовах. Відзначено у обох оброблених сортів зменшення ступеня ураження листків за шкалою Саарі-Прескотта. Сорт 'Поліська 90' більш чутливий до обох грибних патогенів, ніж 'Столична', однак вплив еліситора на його архітектоніку був не менший, ніж у сорту 'Столична'.

Ключові слова: *Triticum aestivum*, *Septoria tritici*, *Puccinia recondita*, щавлева кислота, оксид азоту

¹ Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, вул. Заболотного, 148, м. Київ, 03143, Україна;
* iren_zhuk@mail.ru

² Інститут захисту рослин НААН України, вул. Васильківська, 33, м. Київ, 03022, Україна; mail_gl@mail.ru

Вступ

Фітопатогенні гриби здатні значно впливати на макроморфогенез пшениці, перешкоджаючи тим самим реалізації її продуктивності. Порушення розвитку колоса, зменшення фотосинтетично активної поверхні листків – все це негативно відбивається на архітектоніці рослин. Фунгіциди направлені на знищення збудника захворювання, що не вирішує проблеми збереження архітектоніки рослин. Однак речовини, що стимулюють неспецифічну стійкість рослин, біотичні еліситори, здатні не лише зменшувати фітопатогенне навантаження, а й стимулювати ріст і розвиток пагонів рослин. Застосування еліситорів дозволяє підвищити адаптивний потенціал культурних рослин до біотичного стресу та зменшити пестицидне навантаження на навколишнє середовище. До найбільш вивчених еліситорів належать саліцилова та жасмонова кислоти, а також хітозан (ТЮТЕРЕВ 2015). Однак їх ефективність не завжди достатня для

індукування природної стійкості рослин до фітопатогенних грибів. Тому триває пошук нових еліситорів для індукції фітоімунітету. Зазвичай дослідження присвячені проявам одного грибного захворювання, в той час як у природі досить часто трапляються випадки ураження посівів одночасно кількома видами фітопатогенів, що значно ускладнює боротьбу з ними. До переваг біотичних еліситорів відносять підвищення рівня екологічної безпеки та неспецифічність дії за рахунок активації експресії багатьох генів, що особливо важливо при контамінації посівів кількома фітопатогенами.

Відомо, що щавлева кислота має високу здатність до хелатації катіонів та інгібує утворення активних форм кисню (АФК) при окиснювальному вибусі (КІМ *et al.* 2008). H_2O_2 продукується під час окиснювального вибуху і вимагає постійного входу Ca^{2+} , який активує локалізовану в мембрані НАДФ Н-оксидазу. Компартменталізація клітини забезпечує обмеження локалізації H_2O_2 і формування його локальних рівнів (МІТГЛЕР 2002). Універсальною

відповіддю на H_2O_2 є зростання експресії антиоксидантних ферментів. H_2O_2 може взаємодіяти з цистеїновими та тіоловими залишками білків, що спричиняє конформацію білків і впливає на їх активність. Пероксидази відновлюють H_2O_2 до води і послідовно окиснюють вторинний відновник, такий як глутатіон або аскорбат. H_2O_2 здатен активувати каскад мітоген-активованих протеїнкіназ (МАПК) і забезпечувати зв'язок між сигналом H_2O_2 і генною експресією (VAN BREUSEGEM *et al.* 2001; SOLTIS & КЛІВЕНSTEIN 2015). Раніше нами була показана ефективність еліситуру щавлевої кислоти за умов ураження озимої пшениці септоріозом (ЗНУК *et al.* 2014). Зокрема, нами встановлено, що щавлева кислота та оксид азоту активують неспецифічну стійкість шляхом впливу на антиоксидантні системи, зокрема пероксидази. Одна з функцій фенольних пероксидаз – участь у лігніфікації клітинної стінки, що є одним з найважливіших механізмів знешкодження гіф гриба у відповідь на ураження рослини (ОВРУЦЬКА 2007).

Мета цієї праці – дослідити вплив щавлевої кислоти та донора оксиду азоту на макроморфогенез озимої пшениці *Triticum aestivum* L. за умов одночасного ураження збудниками септоріозу (*Septoria tritici* Desm.) та бурої іржі (*Puccinia recondite* Rob. et Desm.).

Матеріали і методи досліджень

Об'єктом дослідження були сорти озимої м'якої пшениці *T. aestivum* 'Поліська 90' і 'Столична', котрі вирощували у Київській області з застосуванням типової для цієї зони агротехніки. Оригінації обох сортів – Національний науковий центр "Інститут землеробства НААН України". У фазі виходу в трубку рослини обприскували 0,1 мМ розчином щавлевої кислоти та 0,5 мМ водним розчином донору оксиду азота – нітропрусиду натрію, після чого проводилась інокуляція збудником септоріозу (*S. tritici*) та бурої іржі

(*P. recondita*) у концентрації 10^6 спор/мл. У фазу молочно-воскової стиглості зерна вимірювали морфометричні параметри (висоту рослин, довжину колоса) Оцінку ступеню розвитку захворювання проводили за шкалою Саарі-Прескотта (БАБАЯНЦ *и др.* 1988). Повторність дослідів була триразовою. Результати обробляти статистично з використанням програмного пакету Microsoft Excel.

Результати та їх обговорення

В Україні поширена європейська форма бурої іржі. Це специфічне захворювання пшениці, яке найбільш розповсюджене в Лісостепу та на Поліссі. Хвороба проявляється на листі та піхвах пшениці. Спочатку на листках і піхвах з'являються бурі пустули (урединії), потім вони перетворюються у чорні, з глянцевою відтінком, телії. Урединії і телії найчастіше розташовані на верхньому боці листків. Навколо них можуть утворюватись хлоротичні та некротичні плями. Так само, як і *S. tritici*, збудник бурої іржі *P. recondita* f. *tritici* Eriks. et Jenn. (*Puccinia triticina* Eriks.) уражує листки пшениці, зменшуючи асиміляційну поверхню, сприяючи їх передчасному відмиранню та формуванню неповноцінних зернівок, але при цьому є облігатним паразитом.

Розрив епідермісу внаслідок ураження патогенами призводить до підвищення транспірації та порушення водного балансу рослин, передчасного відмирання листків, зниження зимо- і посухостійкості рослин. Недобір урожаю внаслідок сильного розвитку хвороби може становити 15-20%.

Порогом шкодочинності бурої іржі вважається поява перших пустул на листках у період від фази кушіння до молочно-воскової стиглості за сприятливих для розвитку хвороби погодних умов.

Листки сприйнятливої сорту 'Поліська 90' можуть повністю покриватися іржастими пустулами, що призводить до їхнього скручування і передчасного відмирання (Рис. 1 А). На листках сорту

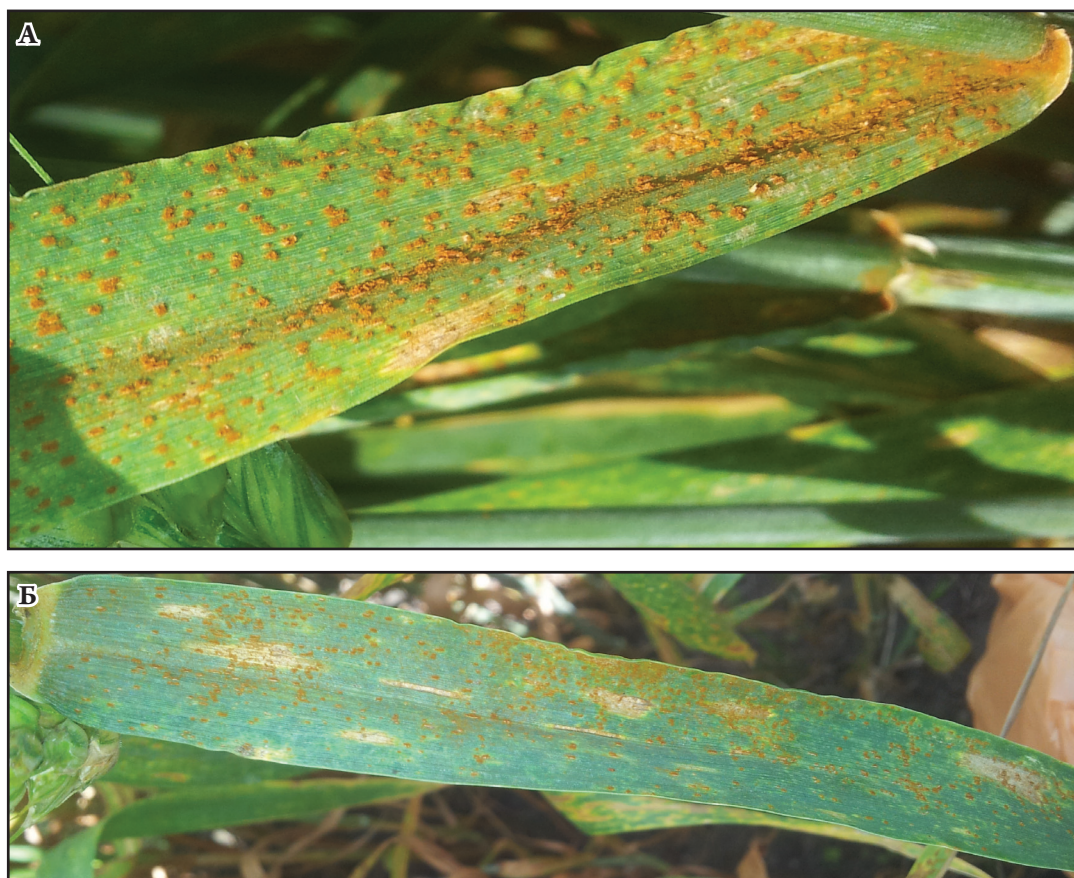


Рис. 1. Ураження септоріозом і бурюю іржею на листках пшениці сорту 'Поліська 90' (А) та сорту 'Столична' (Б).
Fig. 1. The lesion of the leaf blotch and the wheat leaf rust on wheat leaves of cv. 'Poliska 90' (A) and cv. 'Stolychna' (B).

'Столична' із підвищеною стійкістю проти хвороби формуються хлоротичні плями, а пустули часто не здатні розірвати епідерміс листка (Рис. 1 Б).

У другій половині вегетації пшениці (після фази молочної стиглості) на нижньому боці уражених листків формуються чорні блискучі теліопустули з теліоспорами – зимуюча стадія гриба. Процес зараження рослин збудником бурюю іржі відбувається лише в краплині води і починається з проростання урединіоспор шляхом утворення ними росткових трубок. Інфекційний гіф проникає у тканину рослини-господаря через продихи. Протягом вегетації патоген формує кілька генерацій урединіоспор. Цей показник залежить від стійкості сорту і

погодних умов. Перші симптоми хвороби можна спостерігати ще у фазу кущіння, а максимальний її розвиток проявляється у фазі молочно-воскової стиглості.

Перші симптоми септоріозу з'являються у вигляді дрібних хлоротичних або жовтуватих плям. Пізніше плями збільшуються, стають світло-бурими з темною облямівкою або без неї. У центрі плям утворюються темно-коричневі, блискучі пікніди у вигляді чорних крапок. Септоріоз призводить до зменшення асиміляційної поверхні, передчасного всихання листків і рослин, зниження врожаю зерна і погіршення його посівних та технологічних якостей. Старіючі тканини уражуються сильніше, ніж молоді. Втрати врожаю можуть становити 40%.



Рис. 2. Ураження септоріозом і бурюю іржею на листках пшениці сорту 'Столична' (А) та сорту 'Поліська 90' (Б) за умов попередньої обробки елісатором щавлевою кислотою та донором оксиду азоту (НПН).

Fig. 2. The lesion of the leaf blotch and the wheat leaf rust on wheat leaves of cv. 'Stolychna' (A) and cv. 'Poliska 90' (B) after preventive treatment by oxalic acid elicitor and nitric oxide donor (SNP).

Септоріоз найбільш поширений у зонах достатнього зволоження, особливо на Поліссі і у північній частині Лісостепу.

Показано, що у обох сортів щавлева кислота та НПН стимулювали ріст та розвиток стебла, збільшення довжини листків та кількості зерен в колосі, зростання врожайності на 10-15% (Рис. 3-6). Встановлено, що за шкалою Саарі-Прескотта ступінь ураження септоріозом та бурюю іржею за обробки нітропрусидом натрію та оксалатом у обох сортів озимої пшениці знижувався

на 1-2 бали, уражена поверхня листка при цьому зменшувалась на 10-25%. Місцями навіть було відзначено формування лише хлоротичних плям без утворення пікнід. Ріст стебла та прапорцевого листка хоча і стимулювався елісатором, однак в уражених рослин озимої пшениці не перевищував рівня контрольного варіанту. Зростання врожайності за дії елісатора обумовлене формуванням виповнених зернівок та збільшенням їх кількості у колосі.

Фази розвитку фітопатогенних грибів співпадають з періодом найактивнішого

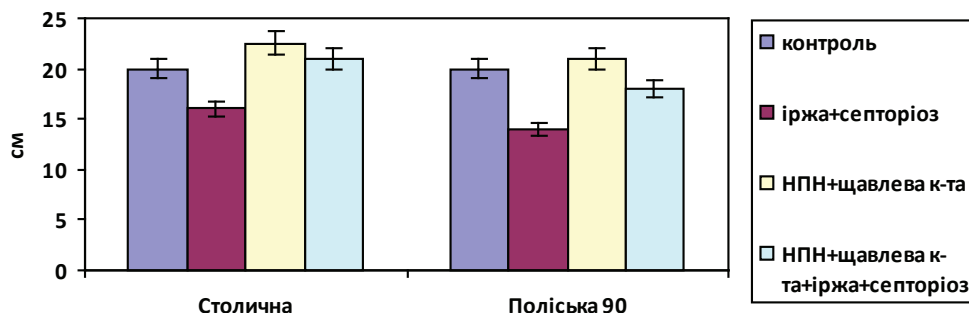


Рис. 3. Вплив обробки донором оксиду азоту, нітропрусидом натрію (НПН), та щавлевою кислотою на довжину прапорцевого листка озимої пшениці сорту 'Поліська 90' та сорту 'Столична'.

Fig. 3. The influence of nitric oxide donor, sodium nitroprusside (SNP), and oxalic acid on the length of the last leaf in winter wheat of cv. 'Poliska 90' and cv. 'Stolychna'.

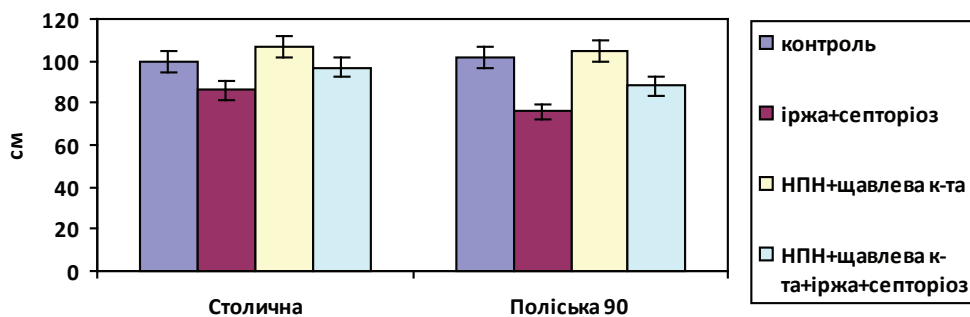


Рис. 4. Вплив обробки донором оксиду азоту, нітропрусидом натрію (НПН), та щавлевою кислотою на висоту рослин озимої пшениці сорту 'Поліська 90' та сорту 'Столична'.

Fig. 4. The influence of nitric oxide donor, sodium nitroprusside (SNP), and oxalic acid on the plant height in winter wheat of cv. 'Poliska 90' and cv. 'Stolychna'.

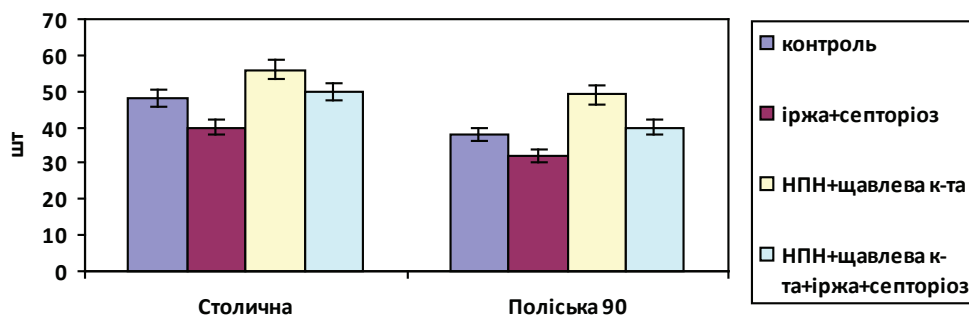


Рис. 5. Вплив обробки донором оксиду азоту, нітропрусидом натрію (НПН), та щавлевою кислотою на кількість зерен в колосі озимої пшениці сорту 'Поліська 90' та сорту 'Столична'.

Fig. 5. The influence of nitric oxide donor, sodium nitroprusside (SNP), and oxalic acid on the number of grains per ear in winter wheat of cv. 'Poliska 90' and cv. 'Stolychna'.

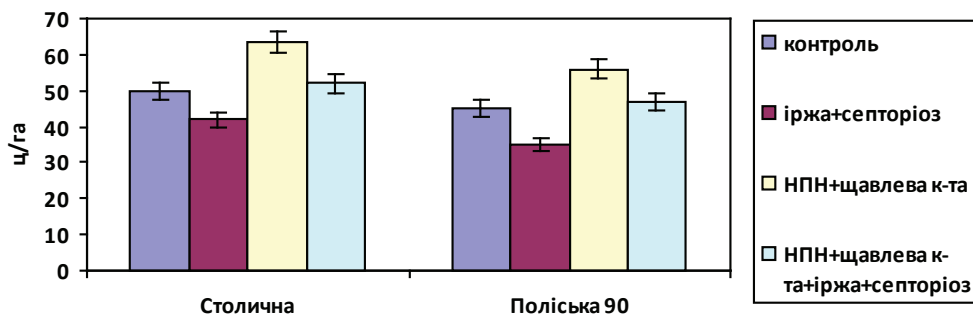


Рис. 6. Вплив обробки донором оксиду азоту, нітропрусидом натрію (НПН), та щавлевою кислотою на продуктивність рослин озимої пшениці сорту 'Поліська 90' та сорту 'Столична'.

Fig. 6. The influence of nitric oxide donor, sodium nitroprusside (SNP), and oxalic acid on the plant productivity in winter wheat of cv. 'Poliska 90' and cv. 'Stolychna'.

росту вегетативних органів у пшениці. Обробка біотичними елісаторами у найчутливіший період таким чином не лише попереджає розвиток захворювання, але й збільшує ймовірність формування повноцінних генеративних органів за умов високого природного фону, а отже, і врожаю.

Висновки

Показано, що донор оксиду азоту та щавлева кислота підвищували стійкість та продуктивність пшениці за умов ураження грибними захворюваннями. Дія щавлевої кислоти зменшувала втрати врожаю за рахунок зниження ступеню ураження зернівок патогеном. Донор NO виявляв властивості сигнальної молекули та регулятора росту в умовах дії біотичного стресу, що сприяло реалізації потенційної продуктивності пшениці. Встановлено, що донор оксиду азоту та щавлева кислота є неспецифічними елісаторами, ефективними при сумісному розвитку ураження пшениці гемібіотрофним грибом *S. tritici* і облигатним паразитом *P. recondite*. Таким чином, застосування щавлевої кислоти в якості елісатора для індукування фітоімунітету пшениці є перспективним та безпечним, оскільки не буде порушувати екологічну рівновагу в агрофітоценозах.

Використані джерела

- БАБАЯНЦ А.Т., МЕШТЕРХАЗИ А., ВЕХТЕР Ф., НЕКЛЕСА Н., ДУБІНИНА Л.А. 1988.** Методы селекции и оценки устойчивости пшеницы и ячменя к болезням в странах-членах СЭВ. Прага. [Babajants L.T., Meshterhazi A., Vexter F., Neklesa N., Dubinina L.A. 1988. Methods of selection and evaluation of wheat and barley tolerance to diseases in countries – Comecon members. Praga. (In Russian)]
- ОВРУЦЬКА І.І. 2007.** Уявлення про лігніфікацію клітинних стінок. *Укр. ботан. журн.* **64** (5): 720–729. [Ovrutska I.I. 2007. The conception of cell walls lignification. *Ukr. Bot. J.* **64** (5): 720–729. (In Ukrainian)]
- ТЮТЕРЕВ С.Л. 2015.** Экологически безопасные индукторы устойчивости растений к болезням и физиологическим стрессам. *Вестник защиты растений* **1** (83): 3–13. [Tjuterev S.L. 2015. The ecologically safe inducers of plant tolerance to diseases and physiological stresses. *Bull. Plant Protect.* **1** (83): 3–13. (In Russian)]
- MITTLER R. 2002.** Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* **7** (9): 405–410.
- KIM K.S., MIN J.-Y., DICKMAN M.B. 2008.** Oxalic acid is an elicitor of plant programmed cell death during *Sclerotinia sclerotiorum* disease development. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **21** (5): 605–612.
- SOLTIS N.E., KLIEBENSTEIN D.J. 2015.** Natural variation of plant metabolism: genetic mechanisms, interpretive caveats, and evolutionary and mechanistic insights. *Plant Physiol.* **169** (3): 1456–1468.
- VAN BREUSEGEM F., VRANOVA E., DAT J.F., INZE D. 2001.** The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Sci.* **161**: 405–414.
- ZHUK IV., LISOVA G.M., DOVGAL Z.M., DMITRIEV A.P. 2014.** Induction of *Triticum aestivum* L. tolerance to *Septoria tritici* by oxalic acid. *Mod. Phytomorphol.* **6**: 105–108.

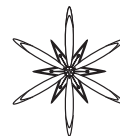
THE SPECIFICS OF ELICITOR EFFECT ON *TRITICUM AESTIVUM* L. MACROMORPHOGENESIS UNDER SIMULTANEOUS LESION BY *SEPTORIA TRITICI* AND *PUCCINIA RECONDITA*І.В. ЖУК^{1*}, А.П. ДМИТРИЄВ¹, Г.М. ЛІСОВА²

Abstract. Phytopathogenic fungi interrupt the macromorphogenesis of wheat (*Triticum aestivum*) but biotic elicitors stimulate the nonspecific tolerance, growth and development of plant stems. It is shown that oxalic acid as a biotic elicitor and donor of nitric oxide signal molecule (sodium nitroprusside) stimulate stem growth in height and last leaves length, as well as grain quantity and productivity both in cv. 'Poliska 90' and cv. 'Stolychna' under *Septoria tritici* and *Puccinia recondita* infection in field trials. It is detected that the degree of infected leaf area decreased in both treated cultivars under Saari-Prescott scale. Cv. 'Poliska 90' is more sensitive to both fungal pathogens than cv. 'Stolychna', but elicitor influence on its architectonics was no less than on cv. 'Stolychna'.

Key words: *Triticum aestivum*, *Septoria tritici*, *Puccinia recondita*, oxalic acid, nitric oxide

¹ Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, Zabolotnogo str. 148, 03680 Kyiv, Ukraine; * iren_zhuk@mail.ru

² Institute of Plant Protection, Vasilkivska str. 33, 03022 Kyiv, Ukraine; mail_gl@mail.ru



УДК 581.844

АНАТОМИЯ КОРЫ *POPULUS TREMULA* L. И *P. DAVIDIANA* DODE В СВЯЗИ С ИХ СИСТЕМАТИКОЙ

НАТАЛЬЯ В. ШКУРАТОВА

Аннотация. В статье рассматриваются результаты сравнительной анатомии коры стеблей двух викарирующих видов – *Populus tremula* L. и *P. davidiana* Dode. Методика работы общепринятая в анатомии растений. Установлено, что обладая большим сходством в структуре коры, что вполне оправдано принадлежностью к одному роду *Populus* L., исследованные виды четко различаются по анатомическим признакам коры. *P. davidiana* отличается от *P. tremula* гетерогенной феллемой в молодых стеблях, отсутствием склеренд в первичной коре, формированием склеренхимы уже во вторичной флоэме однолетнего стебля, отсутствием склеренд во вторичной флоэме в коре стволовой части.

Ключевые слова: *Populus*, анатомические признаки коры, стебель

Учреждение образования «Брестский государственный университет имени А.С. Пушкина», бульвар Космонавтов, 21, 224016, Брест, Беларусь; schkuratova_n@tut.by

Введение

Представители подрода *Leuce* Duby ряда *Trepidae* Dode – *Populus tremula* L. и *P. davidiana* Dode – являются викарирующими видами. Первый, имея огромный ареал на Евразийском континенте, постепенно сменяется вторым, широко распространенным на Дальнем Востоке (Усенко 1984). Используя имеющийся опыт по анализу внутренней структуры коры стеблей аборигенных и интродуцированных в Беларуси тополей (*P. alba* L., *P. tremula*, *P. nigra* L., *P. pyramidalis* Rozier., *P. deltoides* Marsh., *P. suaveolens* Fisch., *P. balsamifera* L., *P. simonii* Carr.; ШКУРАТОВА 2011), провели сравнительное исследование анатомического строения коры указанных видов по выявлению анатомических признаков коры стебля, имеющих значение как для видовой диагностики, так и для решения таксономических вопросов.

Материалы и методы исследований

В качестве материала для исследования послужила кора 1-3-летних стеблей,

из средней и нижней частей стволов, отобранная с модельных деревьев 30–40-летнего возраста *P. tremula* (Брестская область, Беларусь) и *P. davidiana* (о. Сахалин, Россия), произрастающих в естественных местообитаниях. Образцы коры фиксировали в 95% спирте и выдерживали в смеси спирта и глицерина (3:1). Срезы изготавливали на санном микротоме с замораживающим столиком. Методика изготовления постоянных препаратов общепринятая в анатомии растений (Прозина 1960). Анализ микропрепаратов осуществляли на световых микроскопах Биолам Р-15, Микмед-5.

Результаты и их обсуждение

В однолетнем стебле кора состоит из эпидермы, покрывающей стебель, субэпидермально располагающейся перидермы, последовательно залегающих колленхимы, паренхимы первичной коры, кольца механических элементов, первичной флоэмы и вторичной флоэмы. Гистологический состав коры многолетних стеблей и средней части ствола повторяет состав однолетнего стебля (сохраняются

перечисленные выше ткани, за исключением эпидермы), в связи с поздним заложением ритидома. Однако морфологические особенности слагающих кору многолетних стеблей тканей изменяются вследствие дилатации паренхимы и облитерации проводящих элементов. После формирования ритидома в нижней части ствола кора приобретает иной облик и состоит только из корки и вторичной флоэмы.

Эпидерма исследованных видов однослойная, трихом нет, слой кутикулы мощный. Клетки овально-квадратные, с куполообразной внешней стенкой, которая сильно утолщена почти до половины радиуса клетки. Радиальный размер эпидермальных клеток равен или меньше тангентального. Уже в однолетнем стебле протопласт эпидермальных клеток отмирает.

Перидерма включает феллему, феллоген и феллодерму. Феллоген и феллодерма специфическими особенностями не обладают, обе ткани однослойные, тонкостенные, живые. Феллема *P. tremula* гомогенная, 3-4-слойная, тонкостенная, сложена квадратно-прямоугольными в поперечном сечении клетками, вытянутыми в радиальном направлении. Стенки клеток несколько волнистые в силу деформации, полости клеток без содержимого. Феллема *P. davidiana* двухслойная: периферический слой феллемы сложен тонкостенными клетками, заполненными фенольными соединениями, а внутренний слой клеток имеет мощные внешнюю периклиналиную и радиальные стенки. В перидерме однолетнего стебля этого вида начинают формироваться чечевички. Отложение феллемы происходит ежегодно, как и ее сращивание, при этом в многолетних стеблях у *P. davidiana* она сохраняет гетерогенный характер, а у *P. tremula* – остается гомогенной. Число слоев клеток феллемы в многолетних стеблях и средней части ствола достигает 14 и более у обоих видов.

Ниже по стволу и в комлевой части только начинают формироваться повторные

перидермы и образуется ритидом. Повторные перидермы закладываются под острым углом друг к другу. Феллема повторных перидерм гомогенная, тонкостенная, вначале светлая, затем полости заполнены бурым содержимым. При переходе в состав ритидома клетки тканей коры изменяют свои очертания, и структура ритидома кажется однородной.

Колленхима у исследованных видов пластинчато-уголковая, сложена 4-7 слоями клеток. Эта ткань хорошо выражена в однолетних стеблях обоих видов.

Паренхима первичной коры сложена рыхло. Её клетки на поперечном срезе овальные и округлые, несколько вытянутые в тангентальном направлении. У *P. davidiana* в первичной коре выделяются крупные, толстостенные танидоносные клетки и более мелкие тонкостенные клетки, изредка в клетках встречаются друзы оксалата кальция, склереиды отсутствуют. У *P. tremula* на границе первичной коры и колленхимы присутствуют группы брахисклереид, образующие рыхлый пояс склереидных групп, сопровождаемых прерывистыми кристаллоносными обкладками, содержащими монокристаллы оксалата кальция. В паренхиме этого вида обилён оксалат кальция в виде друз.

В многолетних стеблях *P. davidiana* колленхима и первичная кора становятся более плотными по сложению, однако склерификации не наблюдается. У *P. tremula* степень склерификации первичной коры не увеличивается.

Первичные механические элементы в однолетнем стебле образуют гомогенное кольцо, сложенное из округлых и шапкообразных групп волокон. Около указанных групп в коре *P. tremula* располагаются кристаллоносные клетки с монокристаллами, реже друзами оксалата кальция, а в коре *P. davidiana* около групп волокон не обнаруживаются монокристаллы, изредка в прилегающих клетках паренхимы обнаруживаются друзы. В многолетних стеблях *P. tremula* между группами волокон первичного происхождения развиваются

мощные группы склереид, формируя сплошное кольцо механических элементов.

Первичная флоэма в конце уже первого вегетационного сезона имеет полностью облитерированы ситовидные элементы, дилатированую паренхиму.

Вторичная флоэма включает проводящие, паренхимные и механические элементы. Однако в коре однолетнего стебля *P. tremula*, в отличие от второго вида, отсутствуют флоэмные волокна. В клетках аксиальной паренхимы, сопровождающих группы флоэмных волокон *P. davidiana*, присутствуют монокристаллы оксалата кальция.

Ситовидные трубки с клетками-спутниками, флоэмные лучи и аксиальная паренхима двух видов близки по структуре. Членики ситовидных трубок в поперечном сечении почти правильно прямоугольные, на поперечных стенках расположены ситовидные пластинки с округло-эллипсоидными ситовидными полями. У *P. davidiana* ситовидные элементы располагаются хорошо различимыми радиальными рядами, во флоэме преобладают ситовидные элементы. У *P. tremula* радиальное расположение менее четкое, членики образуют группы по 3-4 элемента, аксиальная паренхима образует хорошо просматривающиеся тангентальные полосы.

Флоэмные лучи гетерогенные, преобладают однорядные лучи, встречаются единичные двухрядные лучи. В коре многолетних стеблей количество лучей уменьшается, резко изменяется соотношение между группами лучей разной слоистости: вдвое уменьшается число 1-5-слойных лучей и практически вдвое увеличивается число 6-10-слойных. В ствольной части лучи, проходя через группы волокон и склереид, подвергаются склерификации.

Уже со второго года во вторичной флоэме *P. tremula* формируется слой волокон. У обоих видов резко возрастает количество друз оксалата кальция. В ствольной части доля проводящей флоэмы составляет 100-120 мкм у *P. davidiana* и более 200 мкм

у *P. tremula*. Остальная часть флоэмы у *P. tremula* почти поровну делится на две зоны: дилатационную и непроводящую. У *P. tremula* основным признаком, по которому можно выделить зоны является наличие склереидных групп, образующихся между группами волокон. Группы сложены брахисклереидами округлой, как на поперечном, так и тангентальном срезах, формы. Во флоэме *P. davidiana* склереиды не образуются, поэтому границы дилатационной зоны не выделяются.

Заключение

Анализ строения коры *P. tremula* и *P. davidiana* показал, что обладая большим сходством в структуре коры, что вполне оправдано принадлежностью к одному роду *Populus*, исследованные виды четко различаются по анатомическим признакам коры. *P. davidiana* отличается от *P. tremula* гетерогенной феллемой в молодых стеблях, отсутствием склереид в первичной коре, формированием склеренхимы уже во вторичной флоэме однолетнего стебля, а также отсутствием склереид во вторичной флоэме в коре ствольной части.

Цитируемые источники

- Прозина М.Н. 1960.** Ботаническая микротехника. Высшая школа, Москва.
[Prozina M.N. 1960. Botanical microtechnics. Higher school, Moscow. (In Russian)]
- Усенко Н.В. 1984.** Деревья, кустарники и лианы Дальнего Востока. Книжное изд-во, Хабаровск.
[Usenko N.V. 1984. Trees, shrubs and vines of Far East. Book Publ., Khabarovsk. (In Russian)]
- Шкуратова Н.В. 2011.** О возможности диагностики аборигенных и интродуцированных в Республике Беларусь видов *Populus* L. по анатомическим признакам коры однолетнего стебля. *Вестн. Брѣст. ун-та. Сер. 5* 1: 66-71.
[Shkuratova N.V. 2011. About diagnostic possibility of aboriginal and introduced in Republic Belarus *Populus* L. species on the base of anatomical features of the bark of one-year stem. *Proc. Brest Univer. Ser. 5* 1: 66-71. (In Russian)]

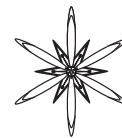
**ANATOMY OF BARK OF *POPULUS TREMULA* L. AND *P. DAVIDIANA* DODE IN RELATION WITH
THEIR SYSTEMATICS**

NATALYA V. SHKURATOVA

Abstract. The data of comparative-anatomical study of structure of stem bark of two vicarious species (*Populus tremula* L. and *P. davidiana* Dode) are represented in this article. Methodic of the study was traditional in anatomy of plants. It was established that having a great similarity in the structure of the bark, which is justified by belonging to the same genus of *Populus* L., nevertheless studied species differ clearly on the anatomical features of the bark. In particular, *P. davidiana* different from *P. tremula* by heterogeneous phellem in young stems, lack of sclereids in the primary bark, the formation of sclerenchyma already in the secondary phloem of one-year stem, as well as by lack of sclereids in secondary phloem in the bark of the trunk region.

Key words: *Populus*, bark anatomical features, stem

Brest State University, Cosmonauts boulevard 21, 224016 Brest, Belarus; schkuratova_n@tut.by



ВЛИЯНИЕ НОВОСИНТЕЗИРОВАННЫХ КОМПЛЕКСОВ ЦИНКА С АМИНОКИСЛОТАМИ НА ЭНЕРГИЮ ПРОРАСТАНИЯ СЕМЯН И СОДЕРЖАНИЕ ХЛОРОФИЛЛА В ПРОРОСТКАХ ПШЕНИЦЫ

ИБРАГИМ АЗИЗОВ¹, ЭЛЬШАН ШАМИЛОВ^{2,3*}, АСИМ АБДУЛЛАЕВ²

Аннотация. Синтезированы комплексы аминокислот на основании биогенного цинка и изучено влияние этих комплексов на всхожесть семян и содержание хлорофилла в проростках пшеницы. Выявлено положительное действие комплекса цинка сернокислого с аминокислотой цистеином на всхожесть и содержание хлорофилла.

Ключевые слова: пшеница, синтез, аминокислоты, энергия прорастания, всхожесть, хлорофилл

¹ Институт Молекулярной Биологии и Биотехнологии Национальной Академии Наук Азербайджана, Бадамдарское шоссе, 40, г. Баку, AZ 1073, Азербайджан; ibrahim.azizov47@gmail.com

² Институт Радиационных Проблем Национальной Академии Наук Азербайджана, ул. Б. Вагабзаде, 9, г. Баку, AZ 1143, Азербайджан; * elshanshamil@gmail.com

³ Институт Почвоведения и Агрохимии Национальной Академии Наук Азербайджана, ул. М. Рагима, 5, г. Баку, AZ 1073, Азербайджан

Введение

Известно, что микроэлементы положительно влияют на транспорт веществ и активность ферментов, на количество и качество урожая, повышают засухоустойчивость и толерантность растений к болезням (Алиев 1958а, 1958б; Абуталыбов и Алиев 1965). Высокая потребность злаковых растений в микроэлементах отмечается на разных этапах развития: при прорастании семян, в связи с активизацией микроэлементами принимающих участие в гидролизе запасных веществ; в фазе кущения, в связи с образованием боковых побегов и придаточных корней из подземных стеблевых узлов; в фазе выхода в трубку, в связи с удлинением междоузлий и активными ростовыми процессами. На этой стадии развития растения активно используют фотосинтетически активной солнечной радиации и активная роль микроэлементов проявляется в синтезе хлорофилла и других пигментов фотосинтеза (Школьник и Макарова

1957; Школьник и др. 1967; Осипова 1990; Остапенко и Ниловская 1994; Пухальская 1997; Гундарева 2006). При внесении микроэлементов в виде растворимых солей большая часть их абсорбируется почвенными частицами и становится труднодоступной для корневых систем растений. Поэтому эффективным способом внесения микроэлементов является внесение их в виде хелатных комплексов и внекормовая подкормка растений такими комплексами. Преимущество хелатных микроудобрений заключается в том, что они усваиваются растениями более легко и эффективно, однако следует отметить, что они действуют как ксенобиотики и при их разложении образуются токсичные для растений вещества. В настоящее время ведутся работы по созданию комплексов биогенных металлов с использованием полезных органических кислот, принимающих участие в метаболизме растений.

Целью данной работы являлось синтез аминокислотных комплексов цинка и изучение влияния их на всхожесть семян,

Табл. 1. Влияние комплекса $ZnSO_4$ с аминокислотами на энергию прорастания (А) и всхожесть (Б) проростков пшеницы.

Tab. 1. Influence of complex of $ZnSO_4$ with amino acids on the energy of germination (A) and germination ability (B) of wheat seedlings.

Показатели	Возраст проростков, дней	Контроль (H_2O)	$ZnSO_4$	$ZnSO_4$ -цистеин	$ZnSO_4$ -метионин
А. Энергия прорастания, %	3	30	29	33	32
Б. Всхожесть, %	7	65	63	67	67

рост и развитие проростков, на содержание хлорофилла в листьях пшеницы.

Материалы и методы исследований

Синтез аминокислотных комплексов цинка проводили при температуре 50 °С добавлением к раствору сернокислого цинка растворов цистеина, метионина и глицина с перемешиванием и дальнейшей кристаллизацией (Османов и др. 2013). Объектом исследования служили семена твердой пшеницы *Triticum durum* Desf.

Семена пшеницы намачивали растворами комплексов в течение 24 ч. Контрольные семена намачивали водой. Контрольные и опытные семена проращивали на фильтровальной бумаге в чашках Петри при 20 °С в условиях термостатирования. Определяли энергию прорастания и всхожесть семян. Содержание хлорофилла определяли на спектрофотометре при длине волны 663 и 645 нм. В качестве растворителя использовали 80% раствор ацетона.

Результаты и их обсуждение

Энергия прорастания и всхожесть семян, обработанных комплексами цинка с аминокислотами определены на трехдневных и семидневных проростках (Табл. 1). Как видно из таблицы, семена, обработанные комплексом цинка с цистеином обладают высокой энергией прорастания и всхожестью. Стимулирующее действие низких концентраций раствора сернокислого цинка на всхожесть, энергию прорастания и рост проростков отмечалось также в работах ряда авторов

(VIETS 1966; MORTVERDT & GIORDANO 1969; ALAM & SHEREEN 2002; ТАУЕВА *et al.* 2013). В этих работах отмечено, что низкие концентрации сернокислого цинка оказывают положительное влияние на синтез фотосинтетических пигментов, в то время как при внесении цинка с фосфором наблюдается обратный эффект. По мнению авторов, такое отрицательное действие связано с взаимодействием между цинком и фосфором, что в конечном счете приводит к явлению хлорозиса. Некоторые исследователи считают, что при содержании высоких концентраций цинка, фосфора и железа в питательной среде затрудняется усвоение цинка корневой системой растений.

Однако при внесении цинка и фосфора в низких концентрациях усиливался рост и развитие растений, и увеличивалось содержание хлорофилла в листьях. Отсюда был сделан вывод, что низкие концентрации этих элементов обеспечивают нормальное развитие растений пшеницы.

В наших опытах 10-дневные проростки пшеницы подвержены водному стрессу. Через однонедельный период засухи начали поливать водой и проследили за выходом растений из стрессового положения. Выход растений из стрессового состояния проводился следующей последовательностью: $ZnSO_4$ -цистеин, $ZnSO_4$ -метионин, $ZnSO_4$ -глицин, контроль.

В Табл. 2 приведены данные по определению содержания хлорофилла в листьях проростков пшеницы. Как видно из таблицы, $ZnSO_4$ -цистеин оказывал положительное влияние на содержание хлорофилла, а также на отношение $chl\ a / chl\ b$.

Табл. 2. Влияние комплекса $ZnSO_4$ с аминокислотами на содержание хлорофилла в листьях проростков пшеницы.

Tab. 2. Influence of complex of $ZnSO_4$ with amino acids on the content of chlorophyll in leaves of wheat seedlings.

Образцы	<i>Chl a+b</i> , мг/100 г	<i>Chl a/b</i> , мг/100 г
Контроль	6,75±0,2	2,5
$ZnSO_4$ -метионин	7,25±0,3	2,7
$ZnSO_4$ -цистеин	7,95±0,2	3,20

Заключение

На основе полученных данных можно сделать заключение, что комплекс цинка с цистеином оказывает положительное влияние на рост и развитие проростков пшеницы и повышают их засухоустойчивость.

Работа выполнена при поддержке гранта научного фонда "SOCAR" Азербайджана.

Цитируемые источники

АБУТАЛИБОВ М.Г., АЛИЕВ ДЖ.А. 1965. Роль микроэлементов в передвижении углеводов в растительном организме. *Изв. Азерб. ССР. Сер. Биол.* 5: 35–39.

[Abutalibov M.G., Aliev J.A. 1965. The role of microlelements in transportation of carbohydrates in plants. *News of Azerbaijan SSR. Ser. Biol.* 5: 35–39. (In Russian)]

АЛИЕВ Д.А. 1958а. Влияние молибдена, кобальта и других микроэлементов на урожай пшеницы. *Докл. АН Азерб. ССР* 14 (4): 425–430.

[Aliev J.A. 1958a. Influence of molybdenum, cobalt, and other microlelements on the wheat crop. *Reports of AS of Azerbaijan SSR* 14 (4): 425–430. (In Russian)]

АЛИЕВ Д.А. 1958б. Влияние молибдена и кобальта на окислительно-восстановительные процессы в растениях. *Докл. АН Азерб. ССР* 14 (6): 541–545.

[Aliev J.A. 1958b. Influence of molybdenum and cobalt on the redox processes in plants. *Reports of AS of Azerbaijan SSR* 14 (6): 541–545. (In Russian)]

ГУНДАРЕВА А.Н. 2006. Влияние микроэлементов на рост и развитие злаковых растений (на примере пшеницы). *Вестник АГТУ* 3 (32): 197–201.

[Gundareva A.N. 2006. Effect of microlelements on growth and development of cereals (on example of wheat). *Vestnik AGTU* 3 (32): 197–201. (In Russian)]

ОСИПОВА Л.В. 1990. Влияние уровня азотного питания на устойчивость яровой пшеницы к засухе. *Бюл. ВИУА* 94: 26–29.

[Osipova L.V. 1990. Effect of nitrogen nutrition level on spring wheat resistance to drought. *Bull. VIUA* 94: 26–29. (In Russian)]

ОСМАНОВ Н.С., КАХРАМАНОВА Ш.И., КУЛИЕВА Э.А., ОСМАНОВА С.Н., КЕРИМОВА У.А., АСКЕРОВА Т.Я., ХУДАВЕРДИЕВ Р.А. 2013. Синтез и исследование комплексных соединений марганца (II) с глицином и цистеином. *Мат. научн. конф., Баку, 2013:* 120–122.

[Osmanov N.S., Kahramanova Sh.I., Kulijeva E.A., Osmanova S.N., Kerimova U.A., Askerova T.Ya., Khudaverdiev R.A. 2013. Synthesis and study of complex compounds of manganese (II) with glycine and cysteine. *Proc. of Sci. Conf., Baku, 2013:* 120–122. (In Russian)]

ОСТАПЕНКО Н.В., НИЛОВСКАЯ Н.Т. 1994. Роль дробного внесения азотных удобрений и предшественника на формирование урожая зерна озимой пшеницы. *Агрохимия* 1: 5–10.

[Ostapenko N.V., Nilovskaya N.T. 1994. The role of the fractional fertilization of nitrogen and a precursor on the formation of grain crop of winter wheato *Agrochemistry* 1: 5–10. (In Russian)]

ПУХАЛЬСКАЯ Н.В. 1997. Закономерности формирования продуктивности зерновых культур при изменении уровня углеродного и азотного питания в оптимальных и экстремальных условия выращивания. Автореф. дисс... д.б.н. Москва.

[Pukhalskaya N.V. 1997. Patterns of formation of grain crops productivity during the changes of level of carbon and nitrogen nutrition in optimal and extreme growing conditions. *Abstr. Doct. Thesis. Moscow.* (In Russian)]

ШКОЛЬНИК М.Я., ПАРИБОК Т.А., ДАВЫДОВ В.Н. 1967. Физиологическая роль цинка у растений. *Агрохимия* 5: 133–139.

[Shkolnik M.Ya., Paribok T.A., Davydov V.N. 1967. The physiological role of zinc in plants. *Agrochemistry* 5: 133–139. (In Russian)]

ШКОЛЬНИК М.Я., МАКАРОВА Н.А. 1957. Микроэлементы в жизни растений. Ботанич. ин-т им. В.Л. Комарова, Ленинград.

[Shkolnik M.Ya., Makarova N.A. 1957. Microelements in the life of plants. V.L. Komarov Bot. Inst., Leningrad. (In Russian)]

- ALAM S.M., SHEREEN A. 2002.** Effect of different levels of zinc and phosphorus on growth and chlorophyll content of wheat. *Asian J. Plant Sci.* 3: 304–306.
- MORTVERDT J.J., GIORDANO P.M. 1969.** Availability to com of zinc applied with macro nutrient fertilizers. *Soil. Sc.* 108: 180–187.
- TAYYEVA H., HUMID U.SH., MUHAMMAD J. 2013.** Zink effect on grown rate, chlorophyll, protein and mineral contents of hidroponically mungbeans plant (*Vigna radiata*). *Arabian J. Chem.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.07.005>
- VIETS F.J. 1966.** Zn deficiency in the soil plant system: 90–127. C. Thomas publisher, Springfield, USA.

INFLUENCE OF NEWLY SYNTHESIZED COMPLEXES OF ZINC WITH AMINO ACIDS ON SEED VIGOR AND CHLOROPHYLL CONTENT IN WHEAT SEEDLINGS

IBRAHIM AZIZOV ¹, ELSHAN SHAMILOV ^{2,3*}, ASIM ABDULLAYEV ²

Abstract. Based on the biogenic zinc the complexes with amino acids have been synthesized and the impact of them on seed germination and chlorophyll content in wheat seedlings was studied. The positive effect of complex of zinc sulfate with cysteine on the germination and chlorophyll content has been revealed.

Key words: wheat, synthesis, amino acids, germination energy, germination, chlorophyll

¹ Institute of Molecular Biology and Biotechnology of National Academy of Sciences of Azerbaijan, Badamdar Highway 40, AZ 1073 Baku, Azerbaijan; ibrahim.azizov47@gmail.com

² Institute of Radiation Problems of National Academy of Sciences of Azerbaijan, B. Vahabzade str. 9. AZ 1143 Baku, Azerbaijan; *elshanshamil@gmail.com

³ Institute for Soil Science and Agrochemistry Research of National Academy of Sciences of Azerbaijan, M. Ragima str. 5, AZ 1073 Baku, Azerbaijan

AUTHOR INDEX

A	N	Ж
Abbasian S. 25	Nazem Bokae Z. 39	Жук І.В..... 117
Abdullayev A. 129	Nuzhyna N. 47	Жук О.І. 111
Açıkğöz B. 19		
Azizov I. 129	R	I
	Rakhmetov Dz.B. 69	Іващенко І.В. 69
B	Rudik G.O. 81	
Baglay K. 47	S	K
Behzadifar M. 39	Sesal C. 19	Калашник Г.В. 53
	Shamilov E. 129	Котюк Л.А. 59
Ç	Shkuratova N.V. 125	
Çobanoğlu G. 19		Л
	T	Лісова Г.М. 117
D	Teixeira da Silva J.A. 3	
Dmitriev A.P..... 117	Teixeira da Silva J.A. 11	H
Dremluga N.G. 95	Tsarenko O.M. 87	Нужина Н.В. 47
	Z	
F	Zhuk I.V..... 117	P
Futorna O.A. 95	Zhuk O.I. 111	Рахметов Дж.Б. 69
		Рудік Г.О. 81
G	A	Ф
Gajdarzhy M.M. 53	Абдуллаев А. 129	Футорна О.А. 95
Gnatiuk A.M. 103	Азизов И. 129	
	B	Ц
I	Баглай К.М. 47	Царенко О.М. 87
Ivashchenko I.V. 69		
	Г	Ш
K	Гайдаржи М.М. 53	Шамилов Э. 129
Kalashnyk G.V. 53	Гнатюк А.М. 103	Шкуратова Н.В. 125
Karalti İ. 19		
Keshavarzi M. 25, 39		
Kotyuk L.A. 59		
	Д	
L	Дмитрієв О.П. 117	
Lisova G.M. 117	Дремлюга Н.Г. 95	

INFORMATION FOR AUTHORS

Modern Phytomorphology is an annual journal (2 volumes are published at the same time per year) with open access policy. It publishes original research articles, reviews and short reports covering plant biology. *Modern Phytomorphology* is specialized on anatomical, morphological, physiological and taxonomical investigations of plants and fungi in wide sense but also publishes research results from other fields of botany. Some of the issues of journal are closely related to the international conference on plant morphology. Journal prefers manuscripts written in English, but also accepts papers in Russian and Ukrainian.

The manuscript size is unlimited; font – Times New Roman, size – 12 pt., indentation – 1,25 cm, 1,5-spaced, width fitted; margins 2 cm on all four sides.

Text sequence: 1) article title, 2) author's names, 3) abstract (no less than 100 words) and keywords in the language of main text, 4) institute, postal address, e-mail, 5) main text, 6) references by the following examples, 7) titles for figures and tables in the language of main text and in English. If the language of the main text is different from English, than you also must write in English by 10 pt.: 1) article title, 2) author's names, 3) abstract (no less than 100 words) and keywords, 4) institute, postal address, e-mail.

References in the text should be quoted as follows. For one author: (KONDRACKI 1978); for two authors: (CAPELLETTI & POLDINI 1984); for three or more authors: (CIEŚLIŃSKI *et al.* 2009). Also can be quoted as KONDRACKI (1978: 55-60) OR (KONDRACKI 1978, 1980). All Cyrillic references in References List should be supported by translation or, at least, transliteration into Romanian alphabets (e.g. English).

References examples:

CAPELLETTI E., POLDINI L. 1984. Seed morphology in some European aconites (*Aconitum*, Ranunculaceae). *Plant Syst. Evol.* **145**: 193-201.

CIEŚLIŃSKI S., CZYŻEWSKA K., FABISZEWSKI J. 2003. Red list of extinct and threatened lichens in Poland. In: K. CZYŻEWSKA (ed.), The threat to lichens in Poland. *Monogr. Bot.* **91**: 13-49 (in Polish).

PACZOSKI J. 1927. Aconitum. In: W. SZAFER (ed.), *Flora Polska.* **3**: 19-25. PWN, Warszawa-Krakow.

KONDRACKI J. 1978. Karpaty. Wydawnictwo Szkolne i Pedagogiczne, Warszawa.

Pdf of each paper are supplied to each author free of charge.

Editorial board reserves the right to edit and decline the papers which have format errors or do not correspond to the journal thematics. Please note, by sending the paper you accept this statement.

<https://phytomorphology.org/>

To submit the paper, please use online submission form (<https://phytomorphology.org/journal/manuscript-submission/>) or send it directly to the editor (novikoffav@gmail.com). Text should be saved as «.doc», «.docx» or «.rtf» files. Images should be given as separate “.jpg” or “.tiff” files (300 dpi), or they also may be placed at the end of the main file on the separated pages. Tables should be given as separate “.xls” or “.xlsx” files, or they can be placed at the end of the main file on the separate pages too.



5 YEARS
ANNIVERSARY
2011-2016

ISSN 2226-3063



9 770222 630637 >

ISSN 2227-9555



9 770222 795558 >