

БОТАНИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ТОМ 109

1

январь



НАУКА
— 1727 —



Москва
2024

RUSSIAN ACADEMY OF SCIENCE

**BOTANICHESKII
ZHURNAL**

Volume 109

№ 1

MOSCOW 2024

Founders:

RUSSIAN ACADEMY OF SCIENCES
BRANCH OF BIOLOGICAL SCIENCES RAS
RUSSIAN BOTANICAL SOCIETY
BOTANICHESKII ZHURNAL

Periodicity 12 issues a year
Founded in December 1916

Journal is published the algis of the Branch of Biological Sciences RAS

Editor-in-Chief

L. V. Averyanov, Doctor of Sciences (Biology)

EDITORIAL BOARD

O. M. Afonina (Deputy Editor-in-Chief, Doctor of Sciences (Biology), St. Petersburg, Russia),
I. N. Safronova (Deputy Editor-in-Chief, Doctor of Sciences (Biology), St. Petersburg, Russia),
I. I. Shamrov (Deputy Editor-in-Chief, Doctor of Sciences (Biology), St. Petersburg, Russia),
A. K. Sytin (Deputy Editor-in-Chief, Doctor of Sciences (Biology), St. Petersburg, Russia),
D. S. Kessel (Executive Secretary, St. Petersburg, Russia),
N. V. Bitukova (Secretary, St. Petersburg, Russia),
O. G. Baranova (Doctor of Sciences (Biology), St. Petersburg, Russia),
S. Volis (PhD, Kunming, China),
A. V. Herman (Doctor of Sciences (Geology and Mineralogy), Moscow, Russia),
T. E. Darbayeva (Doctor of Sciences (Biology), Uralsk, Kazakhstan),
L. A. Dimeyeva (Doctor of Sciences (Biology), Almaty, Kazakhstan),
M. L. Kuzmina (PhD, Guelph, Canada),
M.S. Kulikovskiy (Doctor of Sciences (Biology), Moscow, Russia),
M. V. Markov (Doctor of Sciences (Biology), Moscow, Russia),
T. A. Mikhaylova (Candidate of Sciences (Biology), St. Petersburg, Russia),
A. A. Oskolski (Doctor of Sciences (Biology), St. Petersburg, Russia; Johannesburg, RSA),
Z. Palice (PhD., Prùhonice, Czech Republic),
A. A. Pautov (Doctor of Sciences (Biology), St. Petersburg, Russia),
M. G. Pimenov (Doctor of Sciences (Biology), Moscow, Russia),
R. E. Romanov (Candidate of Sciences (Biology), St. Petersburg, Russia),
A. N. Sennikov (Candidate of Sciences (Biology), Helsinki, Finland),
D. D. Sokoloff (Doctor of Sciences (Biology), Moscow, Russia),
I. V. Sokolova (Candidate of Sciences (Biology), St. Petersburg, Russia),
M. J. Tikhodeeva (Candidate of Sciences (Biology), St. Petersburg, Russia),
A. C. Timonin (Doctor of Sciences (Biology), Moscow, Russia),
V. S. Shneyer (Doctor of Sciences (Biology), St. Petersburg, Russia),
G. P. Yakovlev (Doctor of Sciences (Biology), St. Petersburg, Russia)

Managing editor M. O. Nabatova-Azovskaya Executive editor of the issue O. M. Afonina

E-mail: botzhurn@mail.ru, mari.nabatova-azovskaya@mail.ru

Moscow 2024

© Russian Academy of Sciences, 2024
© Compilation Editorial board
of "Botanicheskii Zhurnal", 2024

СОДЕРЖАНИЕ

Том 109, Номер 1, 2024

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

Gamete structure and development in connection with fertilization in angiosperms

I. I. Shamrov, G. M. Anisimova

5

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Low temperature-induced chloroplast relocation in mesophyll cells of *Pinus sylvestris* (Pinaceae):
SBF SEM 3D reconstruction

N. K. Koteyeva, A. N. Ivanova, T. A. Borisenko, M. S. Tarasova, O. E. Mirgorodskaya, E. V. Voznesenskaya

31

СООБЩЕНИЯ

Распространение и особенности биологии *Magadania olaënsis* (Apiaceae)

O. A. Мочалова, М. Г. Хорева, Е. А. Андриянова

44

Полиморфизм геномной ДНК *Myrica gale* (Myricaceae) на территории Государственного
природного заказника “Лебяжий” (южное побережье Финского залива)

O. A. Семичева, У. А. Галактионова, В. Н. Большаков, А. Э. Романович, М. Ю. Тиходеева, О. Н. Тиходеев

67

Сравнительный морфологический и генетический анализ популяций *Corydalis bracteata* sensu lato
(Papaveraceae) из Южной Сибири

К. К. Рябова, И. Е. Ямских, Н. В. Степанов, М. Г. Куцев

83

ФЛОРИСТИЧЕСКИЕ НАХОДКИ

Artemisia verlotiorum (Asteraceae) — новый вид для флоры Азербайджана

Н. П. Мехтиева, К. К. Асадова, Нигяр Мурсал

99

ХРОНИКА

III Всероссийская конференция с международным участием «Систематические и флористические
исследования Северной Евразии» (к 95-летию со дня рождения профессора А.Г. Еленевского)
(Москва, 19–21 октября 2023 г.)

В. П. Викторов, В. Н. Годин, Н. М. Ключникова, Н. Г. Куранова, С. К. Пятунина

103

CONTENTS

Vol. 109, Number 1, 2024

REVIEWS

Gamete structure and development in connection with fertilization in angiosperms

I. I. Shamrov, G. M. Anisimova

5

ORIGINAL ARTICLES

Low temperature-induced chloroplast relocation in mesophyll cells of *Pinus sylvestris* (Pinaceae):
SBF SEM 3D reconstruction

N. K. Koteyeva, A. N. Ivanova, T. A. Borisenko, M. S. Tarasova, O. E. Mirgorodskaya, E. V. Voznesenskaya

31

COMMUNICATIONS

Distribution and peculiarities of biology of *Magadania olaënsis* (Apiaceae)

O. A. Mochalova, M. G. Khoreva, E. A. Andriyanova

44

Genomic DNA polymorphism in *Myrica gale* (Myricaceae) in the Lebyazhiy State Nature Reserve
(the southern coast of the Gulf of Finland)

O. A. Semicheva, U. A. Galaktionova, V. N. Bolshakov, A. E. Romanovich, M. Yu. Tikhodeeva, O. N. Tikhodeyev

67

Comparative morphological and genetic analysis of *Corydalis bracteata* sensu lato (Papaveraceae) populations from
Southern Siberia

K. K. Ryabova, I. E. Yamskikh, N. V. Stepanov, M. G. Kutsev

83

FLORISTIC RECORDS

Artemisia verlotiorum (Asteraceae), a new species to the flora of Azerbaijan

N. P. Mehdiyeva, K. K. Asadova, Nigar Mursal

99

CHRONICLES

III All-Russian Conference with international participation «Systematic and floristic research
of Northern Eurasia» (on 95-year anniversary of Professor A.G. Elenevsky) (Moscow, October 19–21, 2023)

V. P. Viktorov, V. N. Godin, N. M. Klyuchnikova, N. G. Kuranova, S. K. Pyatunina

103

GAMETE STRUCTURE AND DEVELOPMENT IN CONNECTION WITH FERTILIZATION IN ANGIOSPERMS

© 2024 г. I. I. Shamrov^{a,b,#}, G. M. Anisimova^{b,##}

^a*Herzen State Pedagogical University of Russia
Moika River Emb., 48, St. Petersburg, 191186, Russia*

^b*Komarov Botanical Institute of RAS
Prof. Popov Str., 2, St. Petersburg, 197022, Russia*

[#]*e-mail: shamrov52@mail.ru*

^{##}*e-mail: galina0353@mail.ru*

Received 17.11.2023

Revised 03.12.2023

Accepted 05.12.2023

The paper analyzes data on the processes occurring before and during fertilization in flowering plants. At the gametophyte stage, the gametes are formed from haploid microspores and megaspores. They are sperms, egg and central cell. The fusion of male and female gametes occurs after the pollen tube enters any synergid. One sperm fuses with the egg cell, and another from the same pollen tube joins with the central cell.

The angiosperms are likely to have four types of fertilization. These types differ in the degree of completion of syngamy. Premitotic and postmitotic types are characterized by complete syngamy, and androgamic and gynandrogamic types are inherent in incomplete syngamy. In this case, the behavior of the sperm nuclei is of great significance. They, as a rule, combine with the nuclei of female gametes (premitotic and postmitotic types), but the sperm nuclei can remain independent (gynandrogamic type) or a female nucleus is replaced by a male one (androgamic type). The premitotic type of fertilization follows the way in which the gamete protoplasts and nuclei are united before the mitosis in the zygote nucleus. As for the postmitotic type, it is carried out on a completely different basis. It is possible that in angiosperms the chromosomes of sperm and egg cell do not unite during mitosis. They further divide independently, and a diploid set of chromosomes arises in a 2-celled embryo.

Keywords: male and female gametes, fertilization, syngamy, triple fusion, fertilization types, angiosperms

DOI: 10.31857/S0006813624010013, **EDN:** FFLKVV

The gametes, represented in angiosperms by sperms and egg cells, unlike somatic cells, have a haploid set of chromosomes. The places of localization, the time of the appearance of gametes during ontogenesis, the features of differentiation and transformation, as well as some other structural characteristics are specific. Of considerable scientific interest is the hypothesis of the similarity of fertilization processes in plants and animals. According to this hypothesis, in plants, like animals, there are two types of fertilization, depending on when the nuclei of sexual cells unite: premitotic (before mitosis of the zygote nucleus) and postmitotic (after the onset or during division

of the zygote) (Gerassimova-Navashina, 1947, 1957, 1960, 1969, 1990). Available information in the literature indicates that general principles of fertilization mechanisms in animals and flowering plants are more conserved than previously thought. Among them there are following aspects: structure of gametes, cell–cell communication events between gametes as well as their physical interaction and fusion during fertilization (Marton, Dresselhaus, 2008; Dresselhaus et al., 2016; Shin et al., 2021). However, the types of fertilization were not considered.

Fertilization of the central cell by sperm has been studied in a small number of flowering plants, and this process is given less attention than the study

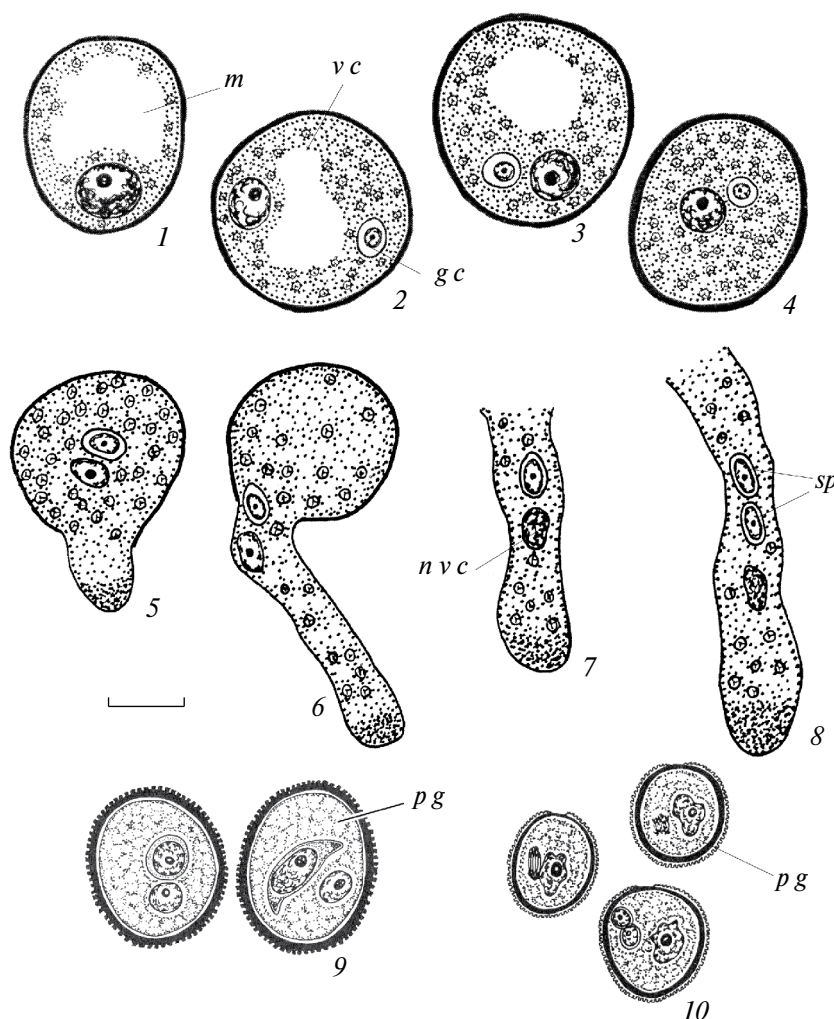


Fig. 1. Formation of pollen grains and pollen tubes. 1–4 – *Ceratophyllum demersum*, 5–8 – *C. platyacanthum* (Ceratophyllaceae), 9 – *Gagea stipitata* (Liliaceae), 10 – *Hemerocallis citrina* (Hemerocallidaceae). (1–8 – after Shamrov, 1983; 9 – after Shamrov, 1990a; 10 – after Shamrov, 1990b). *gc* – generative cell, *m* – microspore, *nvc* – nucleus of vegetative cell, *pg* – pollen grain, *sp* – sperm, *vc* – vegetative cell. Scale bar, μm : 30.

of the egg (syngamy). Since in flowering plants the endosperm resulting from triple fusion is necessary for coordinating the development of the embryo and seed germination, its formation usually begins before the division of the zygote. That is why the way of endosperm formation does not always correspond to the type of fusion of female and male gametes during syngamy and most often occurs according to the premitotic type or is characterized by signs of premitotic and postmitotic types. Thus, for *Triticum aestivum* L. and *Zea mays* L. (Poaceae), it was shown that, although double fertilization occurs according to the premitotic type, the sperm chromosomes of the resulting nucleus of the primary endosperm cell enter prophase separately from the chromosomes of the polar nuclei. Complete union of sperm

chromatin and polar nuclei occurs in metaphase, as in the postmitotic type (Batygina, 1974; Korobova, 1982). In *Zephyranthes candida* Lindl., *Z. grandiflora* Lindl. and *Z. macrosiphon* Baker (Amaryllidaceae), syngamy occurs according to the premitotic type; in the first two species the fusion of the central cell and sperm is also premitotic, while in *Z. macrosiphon* it is postmitotic (Vorsobina, Solntseva, 1979). In *Dioscorea caucasica* Lipsky (Dioscoreaceae) the triple fusion is similar to the syngamy of the premitotic type. In another species, *D. nipponica* Makino, an intermediate nature of the fusion of sperm and central cell was revealed (Torshilova, 2018).

For a number of flowering plants, it was shown that the process of syngamy is simultaneously characterized by traits of different types. An electron

microscopic study revealed that the fusion of the sexual nuclei is carried out according to a united plan, while they actually represent a single lobed nucleus, and the patterns of different types of fertilization at the light-optical level represent differences in the rate of their complete union (Plyushch, 1992).

A comparative analysis of syngamy in plants and animals revealed that in the postmitotic type in plants, sperm enters the egg, while in many animals, the spermatozoid penetrates into developing oocyte during the first or second division of meiosis and activates it for further development (Shamrov, 2015b). It was the presence of a number of contradictions in the literature that prompted us to analyze the available data not only on syngamy, but also on the features of the formation of sexual cells that are involved in its passage.

Gametogenesis. In flowering plants, male gametogenesis is a long process and occurs within specialized gametophytes that develop in anthers. The male gametophyte is represented by pollen grains, 2-celled (Fig. 1, 1–4, 9) or 3-celled (Fig. 1, 10). In 2-celled pollen grains, gametes are not yet formed, and they arise during the growth of the pollen tube (Fig. 1, 5–8). In both variants, the gametes are sperm-cells (Shamrov, 2015a).

Sperms are connected to each other by a common median cell plate or by protrusions of their protoplasts using structures resembling plasmodesmata (Russel, Cass, 1981). Detailed studies on sperm formation have been carried out. In *Hordeum* species (Poaceae), during the division of the generative cell, organelles move to the peripheral regions of the cytoplasm. Microtubules, individual cisterns of the granular endoplasmic reticulum, and many free ribosomes are found in the area of the spindle. In the late telophase, vesicles of dictyosomes and microtubules are located in the center of the phragmoplast, where the median cell plate is formed between the sperms (Charzynska et al., 1988). In *Nicotiana tabacum* L. (Solanaceae), the division of the generative cell is also accompanied by the formation of a phragmoplast between the protoplasts of two sperms (Palevitz, 1993), while in *Tradescantia virginiana* L. (Commelinaceae), this process occurs without the participation of the phragmoplast and is characterized by the formation of a constriction (Palevitz, Cresti, 1989). In flowering plants, one sperm cell has a cytoplasmic projection with the nucleus of a vegetative cell. The *Male Germ Unit* (MGU) appears and moves towards the embryo

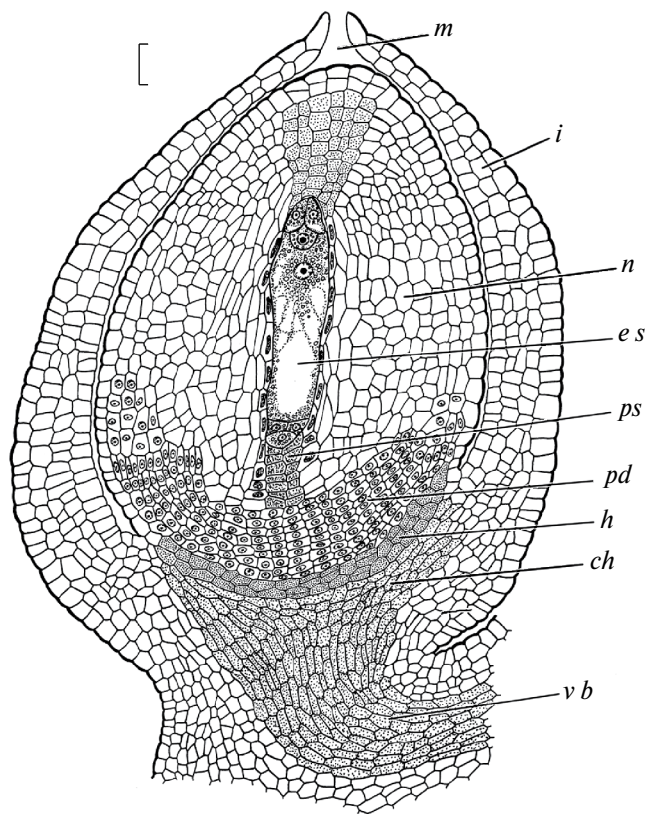


Fig. 2. Mature ovule structure in *Ceratophyllum demersum* (Ceratophyllaceae) (after Shamrov, 1997). *es* – embryo sac, *h* – hypostase, *i* – integument, *m* – micropyle, *n* – nucellus, *pd* – podium, *ps* – postament, *vb* – vascular bundle. Scale bar, μm : 30.

sac (Dumas et al., 1985). The cytoplasmic projection plays a structural role in linking the male germ unit, but potentially can perform other important roles (McCue et al., 2011). There is an opinion that such a complex arises already in a 2-celled pollen grain, while the nucleus of the vegetative cell contacts the cytoplasmic “tail” of the generative cell (a large number of microtubules are located here) (Ermakov et al., 2016).

In most flowering plants, the sperms are isomorphic, but in some, their dimorphism is noted – the sperms of one pair differ in size, amount of cytoplasm, and volume of nuclei. In *Plumbago zeylanica* L. (Plumbaginaceae), the larger sperm is in contact with the nucleus of the vegetative cell (Russell, 1984). In *Nicotiana tabacum*, the sperm that is not associated with the nucleus of a vegetative cell is smaller, richer in plastids, and poor in mitochondria compared to the associated sperm (Yu et al., 1992). Dimorphism was found in members of other families of flowering plants:

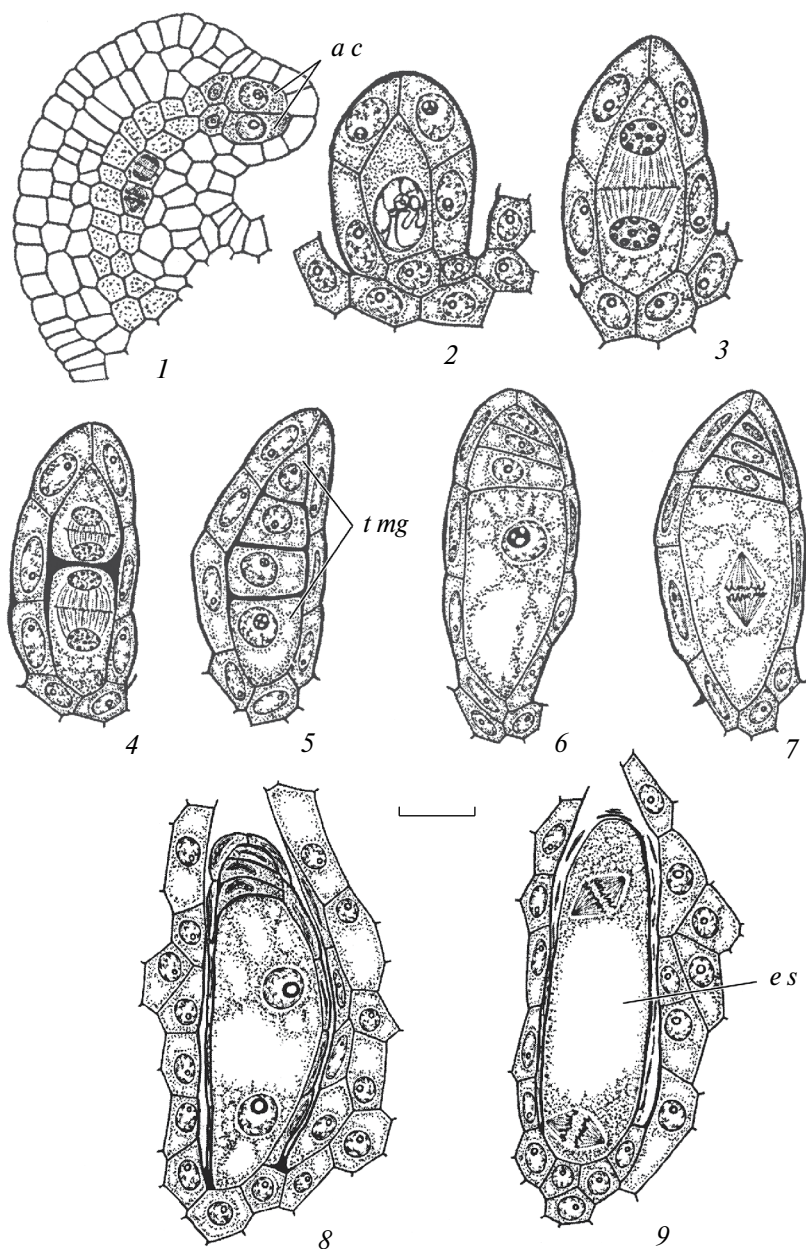


Fig. 3. Ovule structure at archesporium stage (1), megasporogenesis (2–5) and first stages of embryo sac development in (6–9) in *Gentiana lutea* (Gentianaceae) (after Shamrov, 1988). 1–9 – stages of development. *ac* – archesporial cells, *es* – embryo sac, *tmg* – tetrad of megaspores. Scale bar, μm : 30.

Chenopodiaceae – *Spinacia oleracea* L. (Wilms, 1986), Brassicaceae – *Brassica campestris* L. and *B. oleracea* L. (Dumas et al., 1985), Poaceae – *Zea mays* (Rusche, Mogensen, 1988), Euphorbiaceae – *Euphorbia dulcis* L. (Murgai, Wilms, 1988), Ericaceae – *Rhododendron macgregoriae* F. Muell. (Taylor et al., 1989), Liliaceae – *Gagea lutea* (L.) Ker Gawl. (Yang et al., 1995). The contractile proteins (myosin and actin), which are part of microfilaments, were found in the cytoplasm of a vegetative cell. Myosin is located on the nucleus of a vegetative cell and

is associated with male gametes using short actin microfilaments (Heslop-Harrison J., Heslop-Harrison Y., 1989; Russell, 1992; Knox et al., 1993).

Female gametophytes are represented by embryo sacs of different structures, depending on the type of their development. Their formation occurs in the ovule (Johri, 1963; Shamrov, 2008; Rudall, 2021). The ovule of angiosperms is an organ comprising the nucellus, integuments, chalaza, and funiculus. The events of archesporium differentiation, megasporogenesis and embryo sac formation take place

in it (Fig. 2). After fertilization both the embryo and endosperm arise. The complex transformations of the embryo, endosperm and surrounding tissues developing in conjunction with them result in the seed formation. The ovules and seeds are characterized by considerable diversity in the shape, the degree of development and the structure (Shamrov, 2018). Various specific structures are formed in the nucellus, that provide differentiation. The postament is a column-like tissue located below the sporogenous or gametophytic structures. The podium is a cup-shaped structure arising in the chalazal zone of the nucellus. The hypostase is a boundary tissue between the nucellus, integuments and chalaza. The major function of all the special structures in question appears to be that of directed translocation of nutrients: the hypostase – to the nucellus and integuments; the podium – to the lateral (lateral transport through integumentary tapetum and central cell) and, presumably, apical nucellar regions (apical transport through synergids and parietal tissue); and the postament – to the basal nucellar region (basal transport through antipodals) (Shamrov, 2008, 2022).

Female gametophyte in angiosperms consists of egg apparatus, antipodals, and central cell. The egg apparatus is presented by egg and two synergids (*Female Germ Unit* – FGU). This notion was proposed by Dumas et al. (1984). Subsequently, the content of this concept was expanded. Now the female germ unit is comprised of the egg, two synergids, and the central cell (Huang, Russell, 1992). The female gametes are the egg and the central cell (Fig. 3, 1–9; 4, 1–6). The egg is located on the side, usually slightly below the synergids. It, as a rule, has a pear-shaped shape and is characterized by morphological polarity: the nucleus is located at the apical end, and the vacuole is located at the basal pole. The synergids are egg-like and are also characterized by polarity, with the nucleus at the basal end and the vacuole at the apical pole or center of the cells (Fig. 4, 5, 6; 5, 1–3). In the largest central cell of the embryo sac, 2 polar nuclei most often form (Fig. 4, 4), which usually fuse to form a secondary nucleus before fertilization (Fig. 4, 6; 5, 1–3). The antipodal cells are arranged in the form of a triangle or a line of three cells and are localized at the chalazal pole of the embryo sac (Fig. 4, 6; 5, 1). They may be ephemeral and disappear before or during fertilization. Remaining after fertilization, the antipodes can increase in size, while they

show polyploidization of nuclei (Ceratophyllaceae, Gentianaceae, Ranunculaceae, etc. – Zhukova, Sokolovskaya, 1977; Shamrov, 2008; Butuzova, 2018) (Fig. 5, 2). In some plants, there is an increase in the number of antipodes (Nelumbonaceae – Titova, 1988), which is accompanied by an increase in the ploidy of nuclei in cells (Poaceae, etc. – Batygina, 1974). Antipodal cells are equipped with complete cell walls. They are organized according to the transfer cells, and play an important role in the nutrition of the embryo sac, performing the functions of adsorption, transport, and synthesis of a number of metabolites.

In the formed embryo sac of many plants, all cells of the egg apparatus have a complete cell walls. In the process of maturation of the embryo sac in the apical parts of the egg and synergids, some of the cell walls are lost (possibly, substances cease to accumulate in them), and before fertilization, the protoplasts of these cells (on the side of the central cell) are surrounded only by the plasmalemma (Russell, 1992). In the basal part of the synergids, a filiform apparatus differentiates – a system of winding, highly branched outgrowths of the cell wall (Fig. 4, 6; 5, 1). Such outgrowths increase the surface of the plasmalemma, which gives it the properties of transfer cells for the transport of substances. The central cell in the area of contact with the egg is also covered with a plasmalemma. Here, an extracellular space, or “gap”, is formed, where sperms enter. It is designated as the gamete interaction zone (Sprunck et al., 2012).

Fertilization traits in angiosperms and gymnosperms in the light of endosperm origin.

In gymnosperms (Goroschankin, 1880) and angiosperms (Strasburger, 1884; Guignard, 1886), like other higher plants, single fertilization was first described. It was believed that the second sperm of the pollen tube is destroyed and does not participate in fertilization. However, double fertilization was later found in flowering plants, which is one of the distinguishing characteristics of these plants. It includes the union of one sperm with an egg (later, an embryo is formed from the resulting zygote), and the second sperm (of the same pair) with the central cell of the embryo sac (endosperm develops).

The phenomenon of double fertilization was discovered in the study of fertilization in *Fritillaria tenella* M. Bieb. and *Lilium martagon* L. from the Liliaceae family (Nawaschin, 1898a, b). Both

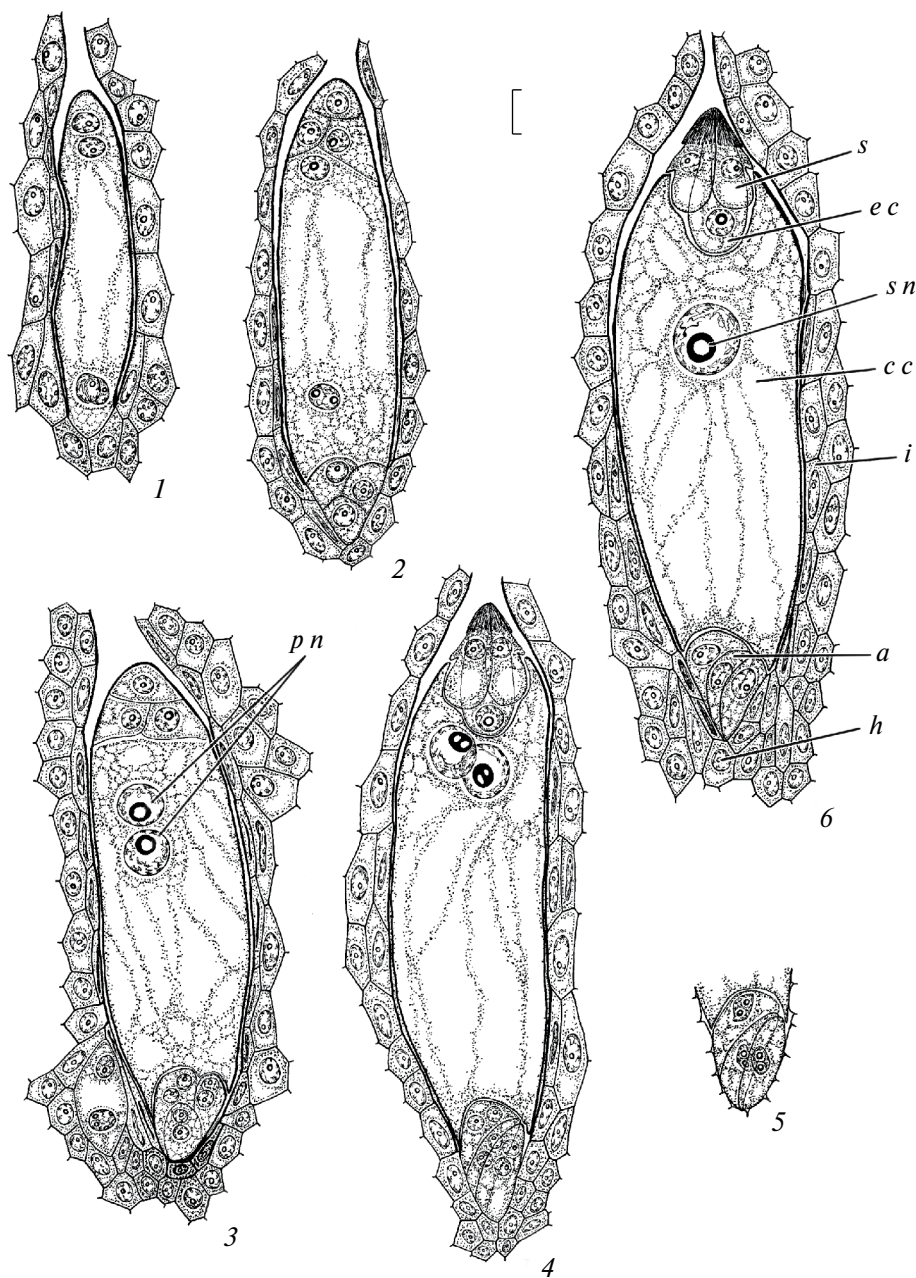


Fig. 4. Final stages of embryo sac formation in *Gentiana lutea* (Gentianaceae). 1–6 – stages of development (after Shamrov, 1988). *a* – antipodal cells, *c c* – central cell, *e c* – egg cell, *h* – hypostase, *i* – integument, *p n* – polar nuclei, *s* – synergid, *s n* – secondary nucleus of central cell. Scale bar, μm : 30.

fertilizations were recognized as real sexual acts and compared with polyembryony. Later, also on the example of lily plants, the concept of double fertilization was confirmed, while the author, Guignard (1899) refers to the results obtained earlier by Nawaschin (1898a, b). But the French researcher not only confirmed the fusion of two male gametes of one pollen tube with the egg and the central cell, but also accompanied the descriptions with illustrations of these processes. By the way, the term

“double fertilization” appeared later (Nawaschin, 1900). Unfortunately, there is still a point of view that Nawaschin (1898a, b) and Guignard (1899) discovered independently the phenomenon of double fertilization in flowering plants (Friedman, 1998; Faure, Dumas, 2001).

At the end of the 20th century, it was shown that double fertilization can occur in some gymnosperms from the Gnetales (*Ephedra*, *Gnetum*) (Friedman, 1990, 1991; Carmichael, Friedman 1995). However,

the question legitimately arises, are the processes of double fertilization homologous in angiosperms and gymnosperms? A detailed study revealed that in *Ephedra nevadensis* S. Watson and *E. trifurca* (Stapf) V.A. Nikitin, the second sperm fuses with the abdominal (ventral) tubular cell, which is preserved in the archegonial cavity, forming an additional embryo (Friedman, 1990, 1991). This was also noted in other gymnosperms, but the second embryo did not develop. In gymnosperms, the formation of an additional embryo is more similar to the simultaneous formation of two embryos of flowering plants, when not only the egg is fertilized, but also one of the synergids.

Angiosperm synergid can probably be compared to the ventral tubular cell of the gymnosperms, which shares a common genesis with the egg cell, since both originate from the same cell. When an egg and a synergid are fertilized by two sperms from one pollen tube, flowering plants lose the possibility of fertilization of the central cell, and without endosperm the embryo is destroyed (Lakshmanan, Ambegaokar, 1984). In *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Brassicaceae) mutants with impaired auxin biosynthesis, all cells of the embryo sac can develop either along the synergid pathway or the egg cell pathway (Pagnussat et al., 2009), or two egg cells and one synergid are formed in the egg apparatus, and after fertilization in the latter case, 2 embryos are formed, and the endosperm does not appear (Berger, Twell, 2011). In *lis* mutants of *A. thaliana*, accessory cells of female gametophyte (synergids, antipodals) differentiate gametic cell fate, indicating that LIS is involved in a mechanism that prevents accessory cells from adopting gametic cell fate. The temporal and spatial pattern of LIS expression suggests that this mechanism is generated in gametic cells (Groß-Hardt et al., 2007).

It is known that Nawaschin (1898a, b) compared double fertilization with polyembryony. The same point of view is shared by Friedman (1994), who believes that two embryos arise in angiosperms as a result of fertilization, one of which gradually began to function as an endosperm. These ideas were developed by him in subsequent works (Friedman, Williams, 2004). However, simultaneously developing embryos inevitably enter into competition for nutrients, and it is difficult to imagine that one of the embryos “voluntarily” would begin to feed the remaining embryos. If this could happen, then only

when one or several embryos ceased to develop further, and the resulting plastic substances were used by the plant for the final formation of a single embryo. Raghavan (2003) assessed the presence of double fertilization in some gymnosperm species. The product of the second fusion in gymnosperms is a transient embryo, rather than the endosperm as in angiosperms.

According to the second hypothesis (Strasburger, 1900; Coulter, 1911) endosperm of flowering plants represents a homolog of a portion of the gymnosperm gametophyte that later became sexualized. The second fertilization event of the central cell by an additional sperm cell might have provided some unknown fitness advantages to the growing embryo. The endosperm would then have originated from mutation the female gametophyte of gymnosperms, which predestine these cells for a supporting nonreproductive role (Linkies et al., 2010). According to Baroux et al. (2002), this theory is supported by the fact that the addition of the paternal genome to the maternal central cell might create hybrid vigor.

It should be emphasized that the endosperms in angiosperms and gymnosperms, while performing a similar function, have a different origin. In gymnosperms, the endosperm is the female gametophyte. One or more peripheral cells in its micropylar part give rise to archegonia. The cells adjacent to the archegonium transform into a sheath. The remaining cells of the female gametophyte during the period of embryo development are transformed into the storage tissue of the seed (Singh, 1978; Trenin, 1988). A similar nutrient tissue, called perisperm, is formed in flowering plants after fertilization due to the accumulation of nutrients in the remaining cells of the megasporangium (nucellus) of the crassinucellate ovule. Perisperm was found in seeds of primitive (Cabombaceae, Cannaceae, Costaceae, Marantaceae, Nymphaeaceae, Zingiberaceae) and some advanced (Amaranthaceae, Caryophyllaceae, Phytolaccaceae, Portulacaceae) families (Shamrov, 2008). Unlike the endosperm of gymnosperms and the perisperm of flowering plants, the endosperm of angiosperms, having a sexual nature, performs not only a trophic function (as considered Strasburger, 1900; Coulter, 1911), but also participates in the provision and distribution of signals that regulate the processes of differentiation and organogenesis of the embryo (Chen et al., 2014). These signals include

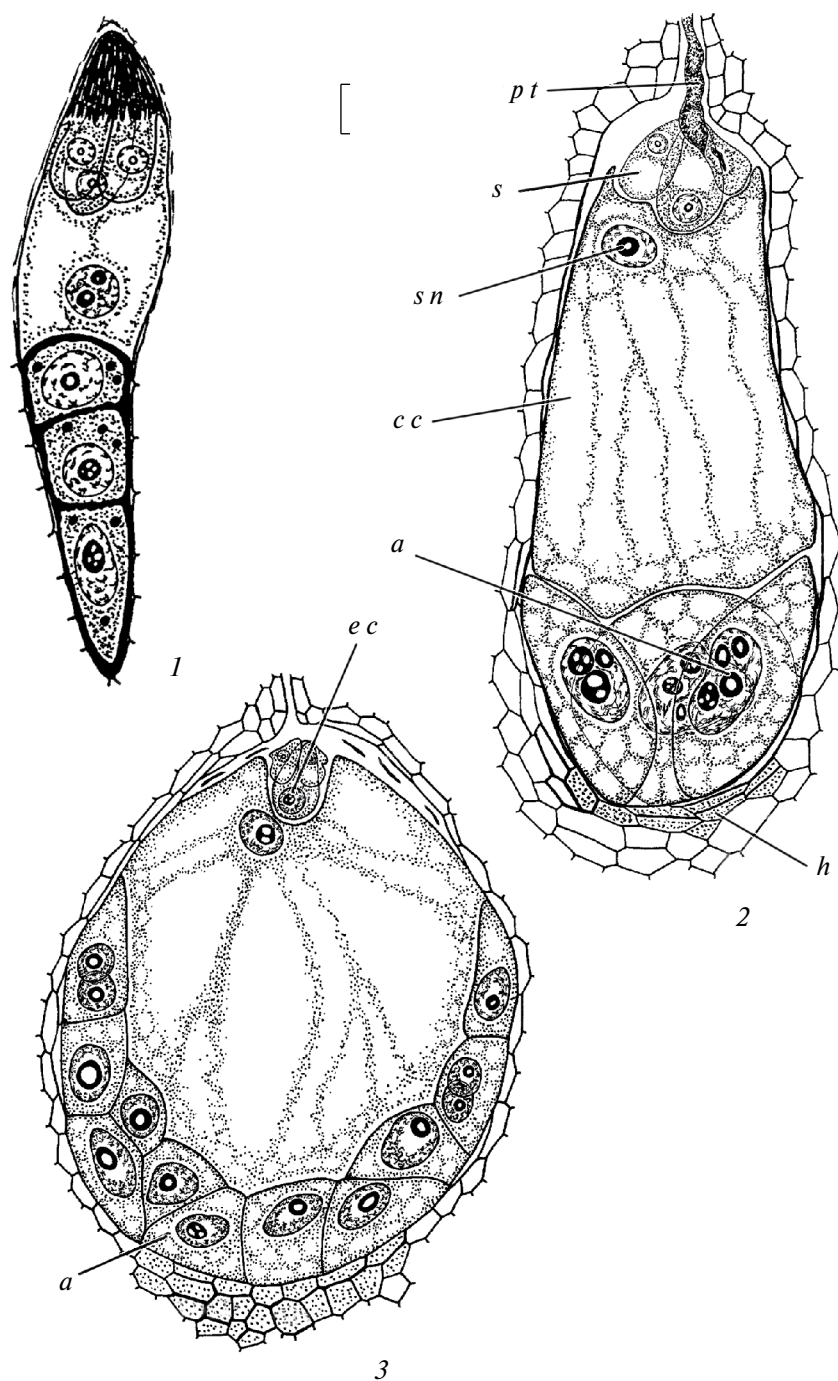


Fig. 5. Mature embryo sac structure in *Hemerocallis hybrida* (Hemerocallidaceae) (1), *Gentianopsis barbata* and *Gentianella lingulata* (Gentianaceae) (2, 3). (1 – after Shamrov, 1990b; 2, 3 – after Shamrov, 1988). *a* – antipodal cells, *cc* – central cell, *ec* – egg cell, *h* – hypostase, *pt* – pollen tube, *s* – synergid, *sn* – secondary nucleus of central cell. Scale bar, μm : 30.

dipeptides (Costa et al., 2014) and phytohormones, among which auxin plays a central role (Locascio et al., 2014; Doll et al., 2017).

In the absence of endosperm, the embryo stops developing at the globular stage. Thus, the endosperm in flowering plants is probably a *de novo* structure. In flowering plants, it does not give rise

to a new organism. Its cells become specialized very early, and even under *in vitro* culture conditions, it was not possible to convincingly prove the emergence of embryos of endosperm origin (Johri, Ambegaokar, 1984). The significance of the endosperm, which occurs during the fertilization of the central cell by sperm, becomes especially important in plants

during apomixis (primarily Poaceae). In this case, the parthenogenetic embryo does not start differentiation and histogenesis on its own and is forced to wait for the moment when, as a result of pseudogamy, the sexual endosperm is formed and starts this process (Yudakova et al., 2018). The significance of the endosperm resulting from the fertilization of the central cell is especially important when considering adventitious embryos. Embryos arise from somatic cells of the nucellus or integument near the embryo sac, but embryogenesis begins only after pollination, when the zygotic embryo stops developing, and apomixis replaces amphimixis in the developing seed as an alternative system. The existing endosperm system of a sexual nature allows nucellar and integumental embryos that have entered the cavity of the embryo sac to complete the normal course of development (Shamrov, 2019).

However, the relationships between the embryo and the endosperm are probably more complex. It was studied the *Arabidopsis thaliana* mutation *Cdc2*, which has a paternal effect. In *cdc2* mutant pollen, only one sperm cell, instead of two, is produced. Mutant pollen is viable but can fertilize only egg cell in the embryo sac. The authors found that unfertilized endosperm developed, suggesting that a previously unrecognized positive signal from the fertilization of the egg cell initiated proliferation of the central cell (Nowack et al., 2006). But, the development of such endosperm has been studied only at the early stages of seed development. It should be noted that even during apomixis, the endosperm can develop without fertilization of the central cell (autonomous development), but then there are disturbances in the development of the endosperm, which lead to a delay in the development of the embryo. The available information on the autonomous development of the endosperm in apomicts, many of which are facultative, is extremely incomplete and fragmentary, and there is not enough documented evidence that the endosperm in such apomictic seeds has an autonomous origin.

Fertilization phases and types. Even before the implementation of the sexual process in flowering plants on the stigma, and then in the tissues of the style and ovary, contact occurs between the sporophyte and the male gametophyte. As yet little is known about pollen tube guidance (Yadegari, Drews, 2004). Several studies have described the mechanisms of gametophyte interaction, and also

the fertilization process — from pollination to pollen tube acceptance (Mori et al., 2006). It is known that calcium plays an important role in various embryological processes (Hafidh et al., 2016). The features of its functioning during pollen germination and pollen tube growth were studied. It was observed that plasma membrane-localized calcium pumps and copines coordinately regulate pollen germination and fertility in *Arabidopsis* (Li et al., 2018). Sperm dynamics and behaviour during pollen germination, tube growth and sperm release is being studied (Kliwer, Dresselhaus, 2010).

The ways how elements of the male germ unit (non-motile sperm cells) move within the growing pollen tube are being studied. The most hypotheses predict that kinesins and actin cytoskeleton in the pollen tube enable a short movement of specific organelles or contribute to generative cell or sperm cell transport (Xu, Huang, 2020; Cai, 2022). Some authors believe that the vegetative nucleus is actively transported via myosin motors along actin cables while pulling along the sperm cells as passive cargo. They propose that the observed saltatory movement can be explained by the function of kinesins with calponin homology domain (Schattner et al., 2021). There were described several signaling components that regulate actin dynamics in pollen tubes (Zhang et al., 2023).

The mechanisms of gamete interaction are not fully understood. Many of the processes involve conserved mechanisms and proteins. Some of these proteins are highly polymorphic and species-specific, allowing female flower organs to discriminate self from alien pollen grains/pollen tubes to avoid reproductive failure after pollination and fertilization with incompatible gametophytes and gametes, respectively (Bleckmann et al., 2014; Dresselhaus et al., 2016; Shivanna, 2016).

All stages of pollen germination and pollen tube growth (up to the release of sperm from it in the receiving synergid) are controlled by molecular processes (Kanaoka, 2018). Double fertilization mechanisms are very complex and regulated at multiple levels, and it will be a challenge to overcome all steps simultaneously allowing wide hybridization between plant species that presently cannot be crossed. On the basis of physiological and biochemical studies on the interaction of pollen and pollen tubes with the tissues of the stigma, style, ovary, ovule and developing embryo, 3 phases of fertilization are

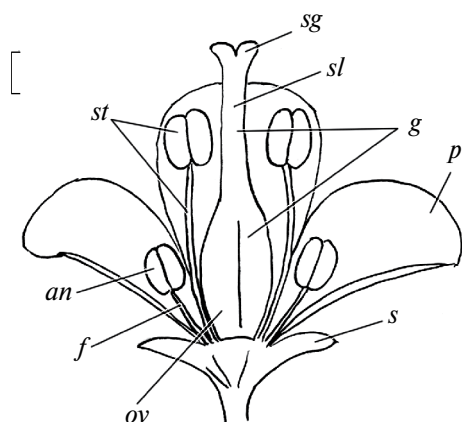


Fig. 6. Flower structure before pollination. *an* – anther, *f* – stamen filiform, *g* – gynoecium, *p* – petal, *ov* – ovary, *s* – sepal, *sg* – stigma, *sl* – style, *st* – stamen. Scale bar, μm : 30.

distinguished (Polyakov, 1970): 1. Progamic phase – lasts until the pollen tubes approach the ovules (usually all processes until the pollen tube enters the embryo sac); 2. Phase of gametogenesis – includes the interaction of pollen tubes with the tissues of the ovule, including double fertilization (this phase is better called syngamic, since gametogenesis, especially male, occurs even before pollination or during the first stages of pollen germination); 3. Postgamic phase – processes occurring after fertilization (the beginning of the development of the embryo and endosperm). Five progamic stages were distinguished involving various prezygotic crossing barriers before sperm cell delivery inside the female gametophyte takes place (Lausser et al., 2010).

For the implementation of fertilization in plants, a transmitting tract of the pistil is created, which is a set of structural elements of the gynoecium, ensuring its interaction with the male gametophyte in the progamic phase of fertilization (Fig. 6). It includes all tissues of the pistil (stigma, style and ovary) with which pollen grains and growing pollen tubes are in contact (Harrisson, 1982; Vishnyakova, 2006). The pollen tube has a dynamic gene expression program allowing it to continuously reset and be receptive to multiple pistil signals as it migrates through the pistil (Palanivelu, Tsukamoto, 2012).

The role of the stigma is to receive pollen. The stigmata differ in morphology (capitate, pinnate) and the structure of the receptive surface: dry (mostly monocots) – covered with papillae cells, wet (mainly dicots) – a secret or secretory mucilage is released on their surface. The styles are open in

dicots (hollow, there is a canal), closed in monocots (solid) and half-closed (presence of gynostegium) in Apocynaceae. They lift up the stigmata, that is associated with the characteristics of pollination. In the pistil, the distal part, formed by the upper part of the ovary and style, is called compitum (Shamrov, 2020).

The transmitting tract of the pistil is formed by cells of the secretory type, which secrete various substances (proteins, lipids, polysaccharides) on the surface that are involved in the recognition mechanisms and are a kind of attractants that direct the growth of pollen tubes. To ensure the passage of pollen tubes, specialized secretory tissues arise – obturators. They are localized in various parts of the ovary and ovule and are represented by elongated epidermal cells that grow in the direction of the micropyle and often close the entrance to it. There are various classifications of obturators. Depending on their origin and position in the ovary and ovule, two main types of obturators should be distinguished: 1) ovular – obturators formed from the cells of the ovule; 2) ovarium – formed from ovary cells. Considering the position of the obturators in the ovule or ovary, a number of variants can be distinguished in each type: in the ovular type, integumental, funicular, and nucellar obturators; in the ovarium type, placental, parietal, and septal obturators (Shamrov, 2008).

The role of peptides during the pollen tube journey is being studied – peptide signalling during self-incompatibility, pollen tube growth and guidance as well as sperm reception and gamete activation (Qu et al., 2015). Two types of self-incompatibility are distinguished according to the time of action of genes and the place of localization of their products: gametophytic and sporophytic. In pollen grains, the products of self-incompatibility genes are localized in the sporoderm. In the gametophytic type of control, they come from the microspore protoplast to the intina, later passing into the pollen tube wall created by it, and in the case of sporophytic self-incompatibility, they are localized in the exine (Knox et al., 1975). A well-documented recognition system occurs between pollen grains and the stigma in sporophytic self-incompatibility, where both receptor kinases in the stigma and their peptide ligands from pollen are now known (Lord, Russell, 2002). The products of self-incompatibility genes are glycoproteins. Immunochemical tests

have established that the place of their localization in the pistil during sporophytic control of self-incompatibility is the walls of the epidermal cells of the stigma (Kadsamy et al., 1989). In the case of gametophytic self-incompatibility in *Nicotiana glauca* Link & Otto (Solanaceae), specific glycoproteins are identified as a component of the intercellular matrix of the transmitting tissue of the style and epiderm of the placenta (Cornish et al., 1987). Self-incompatibility in flowering plants is often controlled by a single nuclear gene (the S-gene) having several alleles. This gene prevents fertilization by self-pollen or by pollen bearing either of the two S-alleles expressed in the style (McClure et al., 1989).

Fertilization processes can be simulated *in vitro* (Kranz et al., 2008). However, they are very complex. Fertilization in flowering plants is a very subtle and accurate process. Compared with animals, in which hundreds of millions of male gametes may target one, often enormous, female gamete, in plants the two nonmotile male gametes target two female gametes with micrometer-level precision (Weterings, Russell, 2004). It is known that in some animals, spermatozoid enters the egg before the completion of meiosis, stimulating it to further development and maturation (Gilbert, 2003). Similar stimulation is observed in plants after pollination. In Orchidaceae, especially primitive representatives, the germination of pollen and the growth of pollen tubes during long flowering causes their ovules to complete the development process and start fertilization (Yeung et al., 1994; Vij et al., 1999). In *Nicotiana tabacum* (Solanaceae), the mature pollen is 2-celled, and the formation of sperm takes place in the pollen tube in the style tissues. The embryo sac at this time is at the 4- or 8-nuclear stage. The embryo sac already after 12 hours acquires a typical structure and is ready for fertilization. In the micropyle, the pollen tube enters 48 hours after pollination (Tian et al., 2005).

The questions of what signals direct the pollen tube to the embryo sac continue to be the subject of debate. Many researchers assign this role to synergids. They play a vital role in the attraction of pollen tubes to embryo sacs, discharge of their contents into them and in ensuring contact and fusion of the discharged sperm cells with female gametes. One view holds that synergids are involved in synthesis and secretion of substances chemotropically active with respect to pollen tubes (Jensen, Fisher, 1968; Plyushch, 1992; Van Went,

Willemse, 1984; Higashiyama et al., 2001; Rotman et al., 2003; Punwani, Drews, 2008). However, there is another point of view. The four cell types of the female gametophyte (egg cell, two synergids, central cell, three antipodals) communicate with each other and secrete signaling molecules to guide the male gametophyte and to mediate sperm cell discharge and transport towards the two female gametes (the egg and central cell). After fusion of the gametes, guidance signals have to be removed to prevent polyspermy, embryo and endosperm development is induced generating daughter cells or nuclear regions of a different fate, and cell death is induced in the surrounding ovular cells (Dresselhaus, 2006). Others have expressed a similar point of view. Long-distance pollen tube guidance in *Arabidopsis* is controlled by the 7-celled female gametophyte. But the identification of a central cell guidance (*cgc*) mutant, which is defective in micropylar pollen tube guidance, has shown that expression of CCG in the central cell alone is sufficient to restore the normal pollen tube guidance phenotype, demonstrating that the central cell plays a critical role in pollen tube guidance (Chen et al., 2007). It was demonstrated also that an *in vivo* polyspermy block on the egg, but not the central cell (Scott et al., 2008). It should be emphasized that some authors also noted the signs preventing polyspermy after gamete fusion. In their opinion, after fertilization, the embryo sac no longer attracts the pollen tube, despite the persistence of one synergid cell. This cessation of attraction might be involved in blocking polyspermy (Higashiyama et al., 2001).

In most plants, by the time of fertilization or during it, one of the synergids degenerates. It was demonstrated that synergid cell death in *Arabidopsis* initiates after the pollen tube arrives at the female gametophyte but before pollen tube discharge (Sandaklie-Nikolova et al., 2007). When pollen tube enters one of the synergids, the contents are released through the filiform apparatus. The connection between the sperms and the nucleus of the vegetative cell is lost, and cytoplasmic bodies are formed (Russell, 1992). In *Gossypium* (Jensen, Fisher, 1968), *Zea* (Vazart, 1969), and *Spinacia* (Wilms, 1981), one of the synergids begins to break down even before the entry of the pollen tube. In *Capsella* (Schulz, Jensen, 1968) and *Helianthus* (Newcomb, 1973), both synergids remain intact, and only after the pollen tube enters either of them do changes begin in the ultrastructure of the receptive synergid. Regardless

of the time of entry of the pollen tube, in both cases, similar transformations are observed in the structure of the synergids.

Both during premature degeneration and when the pollen tube enters the intact synergid, the changes relate to a decrease in the volume of the cytoplasm, compression of vacuoles, destruction of the plasmalemma, and disorganization of cell organelles. In the synergid, the growth of the pollen tube stops, it bursts, and the sperms are released. The cytoplasm of the pollen tube mixes with the cytoplasm of a degenerating receptive synergid (Dresselhaus, Franklin-Tong, 2013). In *Plumbago zeylanica*, in the absence of synergids, the pollen tube enters the embryo sac from the side of the egg, and the components of the common median cell plate are destroyed, as well as the outer and inner membranes of the pollen tube, both between the sperm and between the egg and the central cell in the area of the emerging extracellular space (Russell, 1983).

The movement of sperm upon entering the embryo sac of flowering plants is carried out with the help of actin. Actin bundles, or actin matrix, are formed in the cytoplasm of the pollen tube. Both sperms migrate with the help of actin to the site of gamete fusion, with one of its branches associated with the sperms, which fuses with the egg, and the other branch is associated with another sperm, which unites with the central cell (Russell, 1992). However, the mechanisms of gamete interaction are not fully understood (Mori et al., 2006; Mori, Igawa, 2014). The question arises, which of the two sperm fuses with the egg, and which with the central cell? Even Nawaschin (1910) suggested that this phenomenon is based on the heterogeneity, or enantiomorphism, of sperms. Fertilization involves a pair of female nuclei (a pair of female cells), one right and one left, and a pair of male nuclei (a pair of sperms), also one right and one left. In his opinion, this system is a necessary condition for the “choice” of the egg and the polar nucleus (central cell) of the corresponding sperm. Investigation of sperms in maize was shown that both male gametes have the capacity to fuse with the egg cell (Faure et al., 2003). When studying the sperm–egg interaction, a novel protein was revealed. It was designated as GCS1 (Generative Cell Specific 1), and was isolated from generative cells of *Lilium longiflorum* Thunb. pollen. Immunological assays indicate that GCS1

is accumulated during late gametogenesis and is localized on the plasma membrane of generative cells. In addition, *Arabidopsis thaliana* GCS1 mutant gametes fail to fuse, resulting in male sterility and suggesting that GCS1 is a critical fertilization factor in angiosperms (Xu et al., 1999; Mori et al., 2006; Twell, 2006).

Subsequently, indeed, in some flowering plants, sperm dimorphism was revealed. Thus, in *Nicotiana tabacum*, the sperm, which is not associated with the nucleus of the vegetative cell, is smaller and fuses with the egg cell, while the larger one unites with the central cell (Yu et al., 1992). In *Torenia fournieri* Linden ex E. Fourn. (Scrophulariaceae), one of the sperms first fuses with the egg. A little later, the second sperm moves to the central cell and is located near the degenerating synergid, which is preceded by the migration of the secondary nucleus from the middle part of the central cell to the micropylar part. After triple fusion, the fertilized nucleus of the primary endosperm cell descends (Higashiyama et al., 1997). This has been observed in other plants as well. In *Galanthus nivalis* L. (Amaryllidaceae), even before the entry of the pollen tube into the embryo sac, the secondary nucleus of the central cell begins to migrate towards the egg apparatus and is opposite the receptive synergid, which will degenerate, and the pollen tube will enter through it. The first of the released sperms fuses with the egg cell, and the second is closed to the secondary nucleus and therefore fuses with the central cell (Erdelská, 1983). In the embryo sac of *Plumbago zeylanica*, in the absence of synergids, the pollen tube enters from the side of the egg. The sperms are arranged diagonally, with the distant sperm fusing first with the egg cell, and then the closest one fusing with the central cell (Russell, 1983). However, in *Arabidopsis thaliana* plants, it was found that the “front” sperm (associated with the vegetative cell nucleus as part of the MGU), as well as the “posterior” (not associated with the vegetative cell nucleus), fertilized both the egg and the central cell with equal probability. It was concluded that sperm isomorphism characterizes the general rule, while their dimorphism is rather an exception (Hamamura et al., 2011).

The genetic and cytological aspects of fertilization in angiosperms are studied (Bleckmann et al., 2014; De Graaf, Dewitte, 2019). In flowering plants, sperms are very small, and the process of fusion of male and female gametes occurs very quickly, so

it is not always possible to see them in the contact area. Some reports suggest that fertilization of the egg cell is preferred, which was demonstrated, for example, in mutants of *Cyclin Dependent Kinase A1* (*CDKA A1*), which generate only one sperm-like germ cell (Iwakawa et al., 2006; Nowack et al., 2006). A special study of *Arabidopsis thaliana* plants was carried out using a confocal laser microscope. It made it possible to reveal the retention of sperm cells at the border of female gametes under the action of the HTR10-GFP gene product and on the surface of the egg cell under the action of the GFP-PIP2 gene product. Based on the analysis of the presented illustrations, it can be seen that the sperms are also located diagonally, while the sperm, which is more distant from the place of pollen tube unloading, after passing through the synergid unites with the egg cell, and the second sperm unites with the central cell (Igawa et al., 2013). According to other authors, upon sperm cell arrival at the gamete fusion site the egg cell starts to secrete small cysteine-rich proteins of the EGG CELL 1 (EC1) family. EC1 leads to the relocalization of HAP2/GCS1 from the endomembrane system to the sperm cell plasma membrane and thus activates sperm cells enabling them to fuse with the female gametes (Sprunck et al., 2012). The egg cell appears to require activation itself and calcium may play a key role in this process; this is indicated by a single strong Ca^{2+} to transient in the egg cell associated with pollen tube burst and sperm delivery (Denninger et al., 2014), which thus precedes EC1 secretion. The sperm membrane protein DMP9/DAU2 is involved in interaction of male and female gametes that leads to correct double fertilization (Takahashi et al., 2018).

Even earlier, a mechanism of plasmogamy of sperms and female gametes was proposed, accompanied by the formation of bridges between them, through which the nuclei of sperms and, probably, their cytoplasm pass (Van Went, 1970; Plyushch, 1992). Subsequently, it was shown that the process of plasmogamy includes several stages: 1 – contact of the sperm and the female gamete; 2 – fusion of plasma membranes of gametes; 3 – combination of sperm cytoplasm and female gamete (Igawa et al., 2013).

Studies on the *in vitro* induction of karyogamy with the help of an electric pulse were carried out on isolated male and female gametes of *Zea mays* (Faure et al., 1993). Karyogamy includes three stages

of nuclear fusion: 1 – the outer membranes of the nuclear coats are in close contact or contact through the endoplasmic reticulum and then merge; 2 – the inner membranes of the nuclear coats merge and bridges form between the nuclei; 3 – bridges increase and can capture a certain amount of cytoplasm.

Observations of the entry of the pollen tube into the embryo sac and analysis of the structure of the central cell made it possible to suggest that the movement of its secondary nucleus in the direction of the egg apparatus, still in the progamic phase, is a signaling mechanism indicating which of the two synergids will be the receptive (Huang et al., 1993). It should be noted that the above assumption has not yet been confirmed, and the mechanism of selection of the receptive synergid is not clear. The second conclusion that follows from this analysis is that of the female gametes, the egg is the first and preferred for syngamy. After the formation of the zygote, a complete polysaccharide wall is formed, and the access of other sperms to the egg is stopped. It is after this, even if the processes of karyogamy of the nuclei of the egg cell and sperm have not been completed, that the signal for the implementation of the triple fusion and the formation of the primary endosperm cell appears to be received.

In some flowering plants (Amaryllidaceae, *Gosypium*, *Rudbeckia*, *Zea*), hemigamy was found, which is an incomplete sexual process in which sperm enters the egg, but karyogamy does not occur. However, sperm stimulates the egg to embryogenesis. Both the nucleus of the egg and the nucleus of the sperm divide autonomously, subsequently forming a chimeric embryo. Its cells are predominantly haploid, although a hybrid diploid tissue may form at the site of contact between sperm and egg nuclei (Solntseva, 1973, 1979; Battaglia, 1981). That is why hemigamy is proposed to be called gynandroembryony (Battaglia, 1981). Hemigamy is not an obligate feature of plants and depends on environmental factors (temperature, light, soil and air humidity). In *Zephyranthes candida*, it was sometimes observed, while in *Z. macrosiphon* (Amaryllidaceae) it was found in 80% of the ovules in the ovary, while in the rest of the ovules syngamy occurs according to the premitotic type (Vorsobina, Solntseva, 1979).

This phenomenon is close to the secondary modifications of the sexual mode of reproduction: androgenesis, gynogenesis and hybridogenesis (Grebelnyi, 2008). In the case of androgenesis, the

incoming sperm nucleus replaces the nucleus of the egg, causing the transformed egg cell to develop. The formation of haploid and dihaploid individuals was found in maize (Tyrnov, 2000) and freshwater bivalves (Grebelnyi, 2008). During gynogenesis, the male gamete penetrates into the egg cell, activates it for morphogenesis, but does not take part in further development or participate to a small extent. Gynogenesis has been found in animals – goldfish, tailed amphibians, and freshwater planaria (Grebelnyi, 2008). In plants, examples of gynogenesis are not known. During hybridogenesis (reverse parthenogenesis, according to Tyrnov, 2000; reverse gynogenesis, in our opinion, since during parthenogenesis sperm does not enter the egg), the offspring develops from fertilized eggs and in many cases consists of females, while their cells bear the signs of both parents. During puberty during oogenesis, paternal chromosomes are eliminated – viviparous fish, “edible” frog (Grebelnyi, 2008). A phenomenon very similar in genetic consequences has been described in *Allium* species (Alliaceae). In *A. ramosum* L. and *A. tuberosum* Rottler ex Spreng., endoreduplication of chromosomes was found during the premeiotic interphase in the megasporocyte or at the earliest stages of meiosis (corresponding to the leptotene or pachytene stages of normal meiosis). As a result of further diplospory, the ploidy of the resulting spores and embryo sacs becomes $4n$, and not $2n$, as in typical diplospory. Then, by parthenogenesis, tetraploid apomictic plants are formed. Among the progeny of such plants obtained by cross-pollination, dihaploids arose, one of which (KAD2) was a diploid apomict (most diploid plants), and the other was a predominantly diploid amphimict (Håkansson, 1951; Kojima, Nagato, 1992, 1997). Thus, in the course of reproduction, the number of chromosomes was halved to $2n$, as was the case in megasporocytes before meiosis in tetraploid plants.

In a number of flowering plants (Podostemaceae), endosperm is not formed during triple fusion due to anomalies (Kapil, 1970). The function of the endosperm is performed by so-called “nucellar plasmodium”. It is formed from the cells of the chalazal region of the nucellus. Already at the stage of the 2-nuclear embryo sac, the cells of this zone are disintegrated and a coenocytic symplast gradually appears (Arekal, Nagendran, 1975). In the representatives of the family Trapaceae, there is a loss of the triple fusion process due to a violation

of the mechanism of sperm separation: in *Trapa astrachanica* (Flerow) N.A. Winter, one of the sperms is retained in the synergid or extracellular space (Titova, 1988). In *T. natans* L., the central cell is fertilized, but the primary endosperm nucleus becomes hypertrophied and shifts to the chalazal part, contacting the nucellar cells (postament and podium), where proteins and starch accumulate (Titova et al., 1997). In most orchids, syngamy and triple fusion occur without deviation. However, in some species (*Oreorchis patens* (Lindl.) Lindl., *Listera nipponica* Makino, *Calanthe* × *veitchii* R.H. Torr.), the sperm nucleus does not fuse with the nucleus of the central cell. In *Calanthe* × *veitchii*, the polar nuclei are usually autonomous before fertilization and, together with the antipodal nucleus, form a polar-antipodal group, most often located near the zygote (Savina, 1979; Savina, Poddubnaya-Arnoldi, 1990). *Gymnadenia conopsea* (L.) R. Br. and *Listera ovata* (L.) R. Br. have a triple fusion. The resulting large endosperm nucleus is located near the cells of the postament, in which dextrans are found (Shamrov, 2008).

Thus, species with disturbances during triple fusion and without endosperm require additional studies. On the one hand, it is very important to identify redundant mechanisms in the embryo sac that would perform not only a trophic function, but also participate in the provision and distribution of signals that regulate the processes of differentiation and organogenesis of the embryo, as is inherent in the endosperm of the sexual nature of angiosperms (Costa et al., 2014; Chen et al., 2014; Locascio et al., 2014; Doll et al., 2017). In mutants of *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) it was revealed that before fertilization, auxin is present mainly in the nucellus, while it is not found in the functional megaspore. The auxin gradient determines the specificity of cells in the mature embryo sac. It increases from the antipodal cells to the cells of the egg apparatus, with the greatest accumulation of auxin in synergids (Pagnussat et al., 2009). Cytokinins also play an important role in development (Terceros et al., 2020). In plants with ephemeral antipodal cells, which are involved in the creation of the auxin pool before fertilization, this function after fertilization begins to be performed by chalazal haustoria, providing the development of the embryo with signaling molecules. In plants with long-lived antipodal cells and without chalazal endospermal haustoria, antipodes continue to supply phytohormones to the

embryo indirectly through the endosperm, even if the endosperm develops autonomously, as in some forms of apomixis, for example, in the Asteraceae and Rosaceae (Kamelina, 2009). It is possible that the suspensor plays an important role in stimulating the embryo at an early stage of development. Using *A. thaliana*, it was shown that in the suspensor there is a SUS gene (DCL1 allele), which normally stimulates the development of the embryo, starting from the globular stage. However, in a mutant plant, this gene promotes the appearance of an additional embryo from suspensory cells (Gilbert, 2003).

On the other hand, it is possible that anomalies in the process of fusion of the central cell and sperm do not allow the developing embryos to develop to the end. Aberrant seeds are formed. Therefore, extensive detailed studies are required at the population level with the involvement of statistical methods of data processing. One of these works was devoted to the study of lethal deviations in the development of the embryo in *Dactylorhiza fuchsii* (Druce) Soó (Orchidaceae). It was revealed that globular embryos are present in the majority of developing seeds at early stages. However, in the future, various anomalies in their structure are revealed (irregularity of cell divisions, lack of regularities in histogenesis – a total of 12 types of disturbances), which leads to low real seed productivity (Andronova, 2011). Similar results were also obtained for *Orchis purpurea* Huds. both self-pollination and cross-pollination. It was found that a high proportion of non-viable seeds are a consequence of the manifestation of lethal anomalies of embryogenesis (Andronova et al., 2020). In gymnosperms, two sperms from one pollen tube can fertilize eggs in different archegonia. If two sperms enter one egg, then one of them (usually the one that penetrated first) fertilizes the egg, and the other gradually degenerates or, together with the contents of the pollen tube, remains in the upper part of the archegonium. In species with unequal size of sperms, the larger one is usually functional (Singh, 1978; Trenin, 1988). However, in some gymnosperms from the Gnetales (*Ephedra*, *Gnetum*), the second sperm can participate in the formation of an additional embryo (the features of double fertilization in gymnosperms were discussed in detail by us earlier). *Welwitschia* lacks the gnetalean pattern of regular double fertilization, as found in *Ephedra* and *Gnetum*. Both sperms from a single pollen tube involve to yield two zygotes (Friedman, 2015).

The cell wall of the egg in gymnosperms is common to it and to neighboring cells of the lining of the archegonium. In mature archegonium, it has thickenings, and these thickenings are usually wider on the side of the egg than on the side of the sheath cells. A detailed electron microscopic study of the penetration of cytoplasmic elements from the sheath cells into the egg was carried (Corti, Maugini, 1964; Willemse, 1974; Williams, 2009). In the cell wall of the egg there are wide pore fields penetrated by plasmodesmata. Thin sections of the egg cell wall in the area of the pore fields during the maturation of the archegonium are destroyed and united. In these places, individual organelles, whole nuclei of sheath cells, as well as sperm cells from the pollen tube can penetrate the egg (Singh, 1978; Trenin, 1988; Zhang, Zheng, 2016). In the fern *Osmundia japonica* Thunb., at first the fertilization of the entire archegonium occurs, in which enter some spermatozoa. One spermatozoid unites with the egg, and the rest of the spermatozoa are destroyed (Cao et al., 2016).

In flowering plants, after the penetration of the sperm into the egg cell, a complete polysaccharide wall of the zygote is formed, similar to how a hard shell appears in animals after the penetration of the spermatozoid into the egg. Mammals have a rather complex mechanism for regulating the penetration of spermatozoid into the egg. Only one spermatozoid can fertilize an egg without causing developmental anomalies. Assume two blocks of polyspermy. The fast block is electrical, associated with sodium ions, while the resting membrane potential increases. Slow block is physical, due to calcium ions (Gilbert, 2003). In flowering plants, the entry of additional pollen tubes into the embryo sac has been noted by many, but cases of fusion of female gametes with more than one sperm are not always recorded, since this occurs only with deviations. Thus, in *Sternbergia lutea* (L.) Ker Gawl. ex Spreng. (Amaryllidaceae), cases were found when both sperms lingered in the synergid, stopped near the egg, or entered it, while the central cell remained unfertilized (Vorsobina, Solntseva, 1979). U. Grossniklaus (2017) carried out a polyspermy experiment in maize using a mixture of pollens from two genetically distinct male parents. The frequency of polyspermy of the central cell is much higher than that of the egg cell in maize and the results are consistent with a study in *Arabidopsis* (Scott et al., 2008). These results indicate that the polyspermy block is likely weaker in the central cell compared to the egg cell. A comparative analysis of the fertilization mechanisms

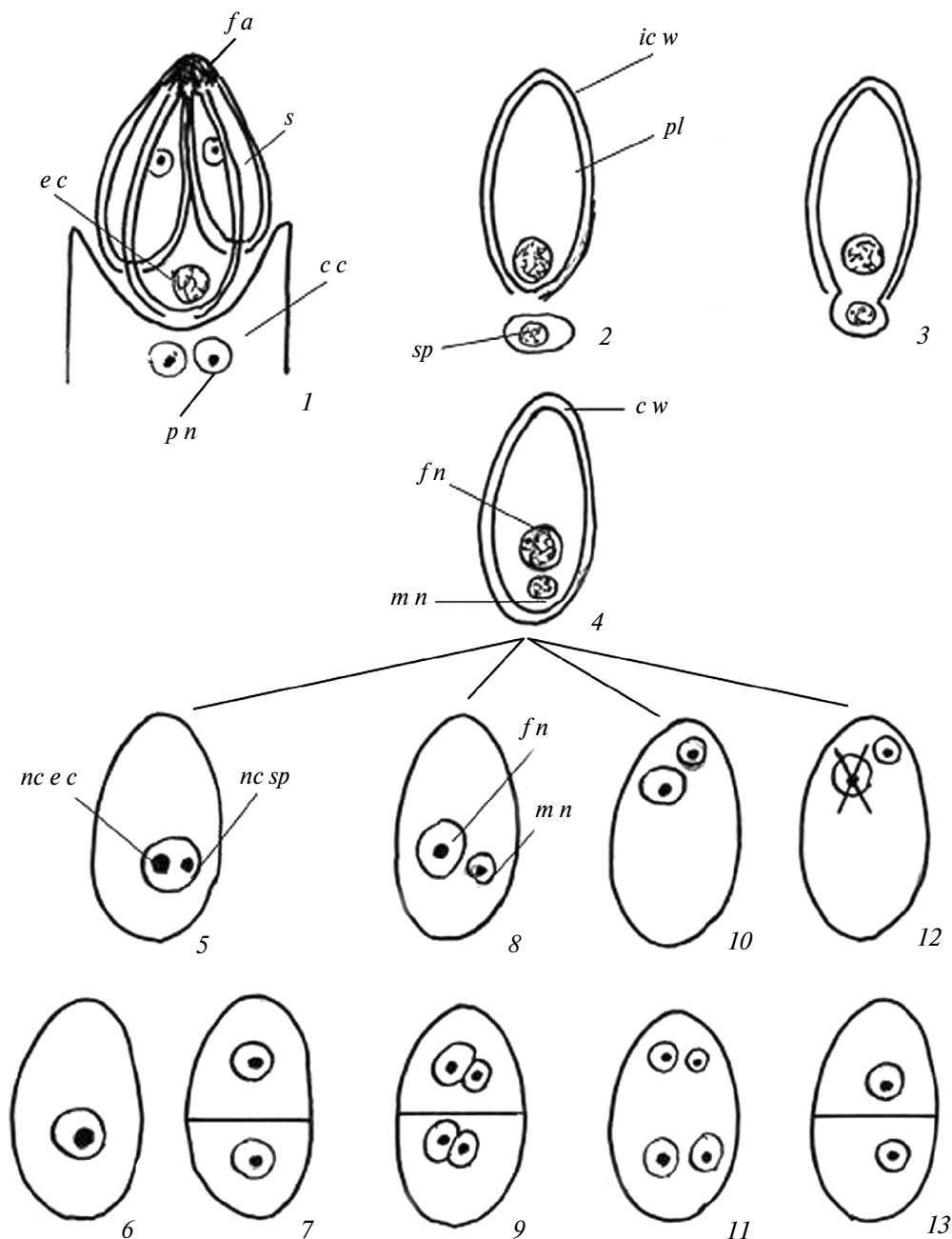


Fig. 7. Fertilization types in flowering plants. 1 – Female Germ Unit (in the apical parts of the egg and synergids, the cell wall is absent; the central cell, synergids, and egg cell in the area of contact with male gametes are covered with a plasmalemma), 2 – sperm is located near the female gamete, 3 – fusion of the plasma membranes of gametes, 4 – plasmogamy is finished, and the cell wall around the developing zygote becomes complete, 5–13 – passage of karyogamy in different fertilization types; complete syngamy: 5–7 – premitotic type: fusion of the female and male nuclei (4), release of the nucleoli (5), formation of the zygote (6) and 2-celled embryo (7); 8, 9 – postmitotic type: contact of the female and male nuclei (8), and their union at the stage of 2-celled embryo (9); incomplete syngamy: 10, 11 – gynandrogamic type: lack of fusion of sex nuclei (10), their autonomous divisions (11); 12, 13 – androgamic type: replacement of the female nucleus by the male nucleus (12) and the formation of an embryo of only paternal origin (13). *cc* – central cell, *cw* – complete cell wall, *ec* – egg cell, *fa* – filiform apparatus, *fn* – female nucleus, *icw* – incomplete cell wall, *mn* – male nucleus, *ncsp* – nucleolus of sperm, *ncec* – nucleolus of egg cell, *pl* – plasmalemma, *pn* – polar nuclei, *s* – synergid, *sp* – sperm.

in plants and animals has shown that plant synergids are probably also involved in the prevention of polyspermy not only by blocking secretion of further attraction

signals but also by gametophyte arrival induced vesicle exocytosis similar to the cortical reaction in animals (Spielman, Scott, 2008).

In *Dioscorea nipponica*, 2 sperms were observed in the central cell. According to the author, the male gametes of one pollen tube did not disperse to different female gametes, but ended up in one, while the egg remained unfertilized (Torshilova, 2018). This was noted during apomixis in some species of *Poa* (Poaceae). These species are characterized by the formation of unreduced embryo sacs and pseudogamy, in which the embryo develops parthenogenetically, and the endosperm develops as a result of fertilization of the central cell. Since the ploidy of the nucleus in the central cell increases by 2 times and becomes $4n$, then to achieve the optimal ratio of maternal and parental genomes (2:1), it is necessary to enter two sperms with haploid nuclei into it. Thus, in pseudogamy, both sperms from the pollen tube enter only the central cell, since the sperm is not needed for the parthenogenetic development of the embryo (Yudakova et al., 2018). The entry of both sperms of the pollen tube into the central cell during deviations and the absence of syngamy in the egg cell can be considered as one of the manifestations of the transition from amphimixis to apomixis, especially to parthenogenesis. It should be noted that in lines of *Zea mays* with a high haplo-inducing ability, parthenogenetic haploid embryos develop only after pollination with their own pollen (Apanasova et al., 2017).

As we have already noted, based on a comparison of fertilization processes in flowering plants and animals, two types of fertilization were distinguished: premitotic (Asteraceae, Poaceae, *Scilla*, *Fucus* – plants; sea urchin – animals) and postmitotic (*Lilium*, *Fritillaria*, *Pinus* – plants; roundworm – animals) depending on when the sexual nuclei unite (Gerassimova-Navashina, 1947, 1957, 1969). However, the expediency of such a comparison requires making adjustments and taking into account the specifics of the fertilization process in some plants and animals. It is important to take into account not only the time of fusion of the sexual nuclei, but also the state of male and female gametes in the process of fusion.

First of all, the proposed hypothesis does not fully reveal the differences in the types of fertilization, since it almost does not consider the features of plasmogamy, the first stage of syngamy. In addition, in the English-language literature, the terms “premitotic” and “postmitotic” are practically not used in relation to fertilization. Most often, differences in the rate of fusion of the sexual nuclei are described

based on the stages of interphase preceding the division of the zygote, while types of fertilization are equated to types of karyogamy. Thus, Van Went and Willemse (1984), referring to the ideas of Gerassimova-Navashina (1960), describe the types of fertilization as features of the fusion of the nuclei of male and female gametes, while at the postmitotic type, in their opinion, the chromatin of the sexual nuclei remains completely divided before division of the zygote. Some other authors also believe (Faure, Dumas, 2001; Dresselhaus et al., 2016; Ji Min et al., 2020).

However, fertilization includes not only karyogamy, but also plasmogamy (Fig. 7, 1–4). Based on this, the number of types of fertilization can be increased. In our opinion, hemigamy (gynandrogamic type) and androgenesis (androgamic type) should be added to the classification of types of fertilization. It should be noted that the names of the types (gynandrogamic and androgamic) are a transformed version of the concept “gynandroembryogeny” proposed by E. Battaglia (1981). The angiosperms are likely to have four types of fertilization. These types differ in the degree of completion of syngamy. Premitotic and postmitotic types are characterized by complete syngamy, and androgamic and gynandrogamic types are inherent in incomplete syngamy. Great significance in this case is the behavior of the sperm nuclei. They, as a rule, combine with the nuclei of female gametes (premitotic type – Fig. 7, 5–7; postmitotic type – Fig. 7, 8, 9), but the sperm nuclei can remain independent (gynandrogamic type – Fig. 7, 10, 11) or the female nucleus is replaced by a male one (androgamic type – Fig. 7, 12, 13).

Based on the mitotic hypothesis and the characteristics of spermiogenesis, it was established (Gerassimova-Navashina, 1947, 1957) that at the premitotic type of fertilization, the fusion of the sexual nuclei occurs before the onset of zygote mitosis. The sperm nucleus in the state of telophase, approaching the female nucleus, is able to “dissolve” the membrane of the latter, sink into it and end its cycle by falling into dormancy, one of the signs of which is the release of the nucleolus (Fig. 8, 1–4). The zygote, after a certain period of rest, already as a whole, proceeds to the first division (Asteraceae). The second type of fertilization (postmitotic) – the union of the sexual nuclei occurs only in the prophase of the zygote, when both nuclei lose their membranes (the description of the processes is given

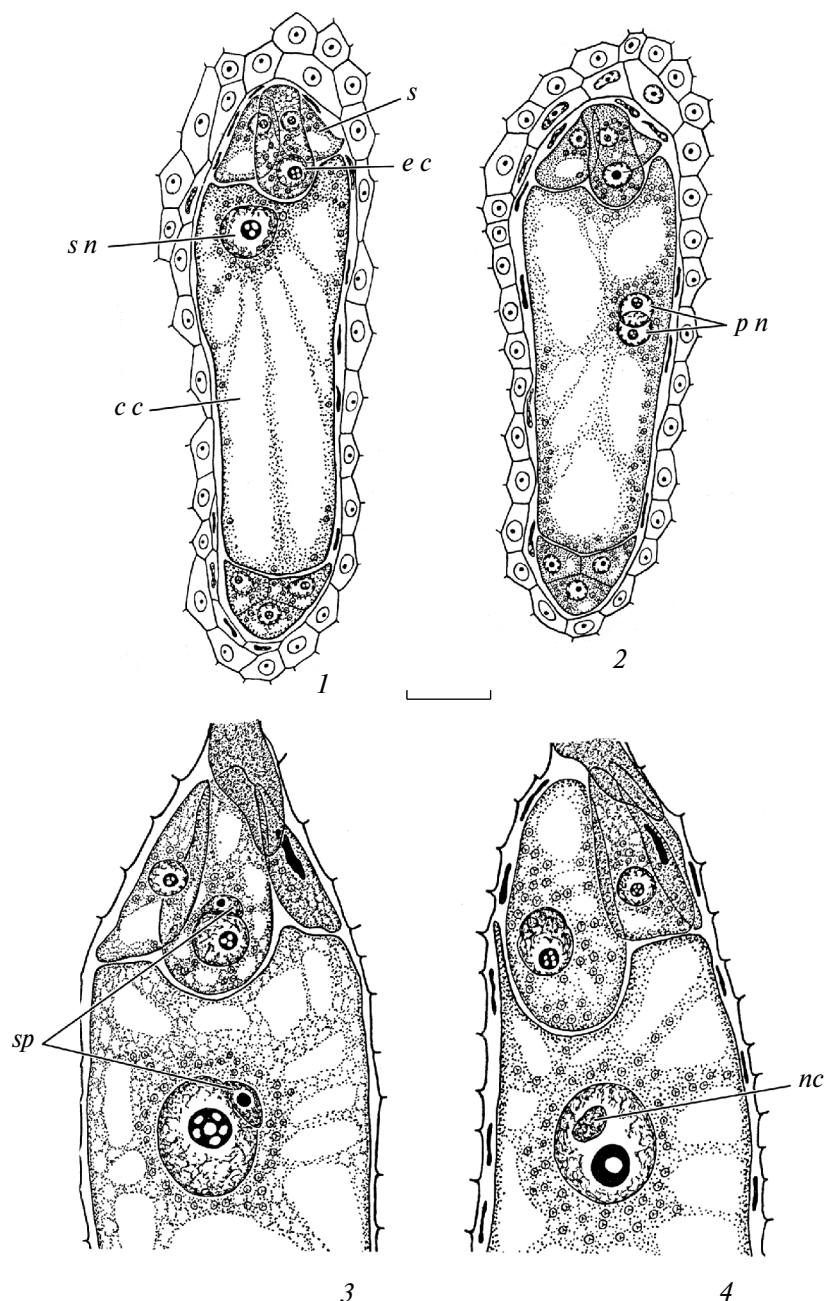


Fig. 8. Formed (1) and mature (2) embryo sacs, beginning of double fertilization (3) in *Ceratophyllum submersum* and completion of this process (4) in *C. platyacanthum* (Ceratophyllaceae) (after Shamrov, 1983). 1–3 – bilateral sections, 4 – sagittal section. *cc* – central cell, *ec* – egg cell, *nc* – nucleolus of sperm, *s* – synergid, *sn* – secondary nucleus of central cell, *sp* – sperm. Scale bar, μm : 30.

in the author's version). The state of sperm nuclei included in female gametes was clarified: in the premitotic type, they are in the G_0 or G_1 phases of the interphase cell cycle, in the postmitotic type, in the G_1 , S, or G_2 phases (Gerassimova-Navashina, 1969, 1971).

In animals at postmitotic fertilization, the sperm does not come in the mature egg, but enters the oocyte during

the first or second divisions at meiosis. In flowering plants, by the time of fertilization, female gametes have already undergone both megasporogenesis and gametogenesis in their development, while synergids begin to release attracting substances in the micropyle, which allows the pollen tube to enter the embryo sac. Consequently, the features in the passage of the postmitotic type of fertilization in

plants are hidden not in the specifics of meiosis, as in animals, and not even in the passage of gametogenesis, but, apparently, in the structure of female gametes by the time the pollen tube enters the embryo sac.

Compared with other cells, the greatest differences were found in the structure of the cells of egg apparatus: “poorly differentiated”, “weakly differentiated” and “undifferentiated”. At the same time, such signs as the size, shape, polarity and topography of its elements, the presence or absence of a filiform apparatus in the synergids are considered (Plyushch, 1992).

For fertilization to be successful, the cell cycles of the male and female gametes must be synchronized. Almost all animals undergo gamete fusion in the G_1 -phase of the cell cycle (with a 1C complement of genomic DNA). Seed plants appear to be an exception in that they fuse in either G_1 or G_2 in different species (Weterings, Russell, 2004). Pollen may be in G_1 -, G_2 -, or S-phase at dissemination. There probably also is a signal indicating that sperm and female target cells are at the same receptive cell cycle phase. *Zea mays* and other members of the grass family tend to fuse in G_1 , but others may be disseminated in S-phase and complete DNA synthesis in the pollen tube to fuse in G_2 , in synchrony with the female target cells (Friedman, 1999).

Based on detailed studies of the content of nuclear DNA in male and female gametes of *Gnetum gnemon* using fluorescence microscopy, three types of karyogamy in seed plants were identified (Carmichael, Friedman, 1995): G_1 -karyogamy (gamete nuclei contain 1C DNA during fertilization, and the zygote enters phase of DNA synthesis before mitosis); S-karyogamy (gamete nuclei contain 1C DNA at the beginning of fertilization, DNA replication occurs before the end of the fusion of gamete nuclei); G_2 -karyogamy (gamete nuclei go through the S-period of the cell cycle and increase the DNA content from 1C to 2C before fertilization). With established types of karyogamy, DNA replication occurs either still in gametes (G_2 -karyogamy), before the end of the fusion of gamete nuclei (S-karyogamy) or after karyogamy, but before the division of the zygote (G_1 -karyogamy), i.e. in accordance with the premitotic type fertilization. In *Nicotiana tabacum*, it was shown that if the fusion of gametes occurs in the G_1 phase, then after karyogamy, the S phase and division of the zygote occur. If the gametes fuse in

the G_2 phase, then the zygote enters mitosis without additional DNA synthesis (Tian et al., 2005).

Therefore, the premitotic type of fertilization occurs in the same way in animals and plants, as the protoplasts and gamete nuclei combine before the first mitosis of the zygote nucleus (Fig. 7, 5–7). As for the postmitotic type, it is carried out on a completely different basis. In animals, the spermatozoid enters the developing oocyte during the first or second division of meiosis. It activates the developing egg for further development, then fertilization occurs, but the chromatin of both nuclei condenses into chromosomes that are located separately on a common mitotic spindle, and in mammals with postmitotic fertilization, the diploid set of chromosomes is formed not in the zygote, but at the stage of a two-celled embryo (Gilbert, 2003). It is believed that in flowering plants, gametes and their nuclei unite at mitosis of the zygote nucleus during the formation of the metaphase plate (Gerassimova-Navashina, 1947, 1971). However, the conclusion about nuclear fusion at postmitotic fertilization in plants seems to need to be corrected. Usually the metaphase of zygote division is shown schematically, but there are no detailed pictures of the union of male and female chromosomes. It is possible that at postmitotic type of fertilization in plants, sperm and egg chromosomes do not unite during mitosis. They further divide independently, and the diploid set of chromosomes is created not in the zygote, but in a 2-celled embryo (Fig. 7, 8, 9). It is with this interpretation of the union of chromosomes of the sexual nuclei that the concept of “postmitotic type of fertilization” acquires its original meaning – the union of the sexual nuclei and the chromosomes included in them occurs after mitosis in the zygote, namely, in the process of cytokinesis and the formation of a 2-celled embryo.

CONCLUSION

Currently, a number of topical directions for the study of gametogenesis and double fertilization in angiosperms can be proposed.

1. When studying fertilization, it is important to characterize not only the features of karyogamy of the sexual nuclei, but also pay attention to the processes occurring during plasmogamy. Therefore, in the classification of types of fertilization into two types (premitotic and postmitotic), it is proposed

to include the phenomena of hemigamy (gynandrogamic type) and androgenesis (androgamic type), which were previously considered within the framework of apomixis forms.

2. The conclusion about nuclear fusion during postmitotic fertilization in flowering plants needs to be corrected. It is possible that in plants, as in animals, the sperm and egg chromosomes unite after the division of the zygote nucleus. Therefore, detailed studies are needed on the state of the nuclei during fusion, during mitosis, and during the formation of a 2-celled embryo.

3. Unlike animals, in flowering plants, the peculiarities in the passage of the postmitotic type of fertilization are hidden not in the specifics of meiosis and even gametogenesis, but, apparently, in the structure of the cells of the egg apparatus, which manifests itself in the incompleteness of the processes of specialization of the egg and synergids by the time of entry of the pollen tubes into the embryo sac. It is necessary to identify the features of stimulation of the cells of the egg apparatus and those cytological mechanisms that ensure the complete unification of the genetic material of the male and female reproductive nuclei during postmitotic fertilization.

4. Particular attention should be paid to those objects in which syngamy can occur, both in the postmitotic and premitotic types.

5. In a number of flowering plants, due to anomalies, endosperm is not formed during triple fusion. Therefore, it is very important to identify duplicative mechanisms in the embryo sac that would perform not only a trophic function, but also participate in the provision and distribution of signals that regulate the processes of differentiation and organogenesis of the embryo, as is inherent in the endosperm of the sexual nature of angiosperms. On the other hand, it is possible that anomalies in the process of fusion of the central cell and sperm do not allow the developing embryos to develop to the end. Aberrant seeds are formed. Therefore, extensive detailed studies are required at the population level with the involvement of statistical methods of data processing.

ACKNOWLEDGMENTS

The research was carried out within the framework of the institutional research projects “Structural-functional and molecular-genetic bases of development

and adaptation in higher plants”, “Polyvariation of morphogenetic developmental programmes of plant reproductive structures, regulation of morphoprocesses *in vivo* and *in vitro*” (2024–2028) (Komarov Botanical Institute of RAS, state registration Nos. 1021071912890-3-1.6.11, 1021071912896-7-1.6.11 – collecting material, its treatment and result discussion), and “Adaptive responses of biological systems to specific and non-specific effects of environmental factors” (Herzen State Pedagogical University of Russia – description of the study results).

REFERENCES

- Andronova E.V. 2011. Lethal anomalies of the structure and development of the embryo in *Dactylorhiza fuchsii* (Orchidaceae). – Bot. Zhurn. 96 (7): 858–863 (In Russ.).
- Andronova E.V., Kovaleva A.A., Evdokimova E.E., Nazarov V.V., Semeonov A.V. 2020. Fruitage and seed viability of *Orchis purpurea* (Orchidaceae) at the northeast limit of distribution. – Int. J. Plant Reprod. Biol. 12 (1): 56–66. <https://doi.org/10.14787/ijprb.2020.12.1>
- Apanasova N.V., Gutorova O.V., Yudakova O.I., Smolkina Y.V. 2017. Peculiarities of structure and development of female generative structures in corn lines with heritable and nonheritable types of parthenogenesis. – News of the Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences. 19 (2): 216–219 (In Russ.).
- Arekal G.D., Nagendran C.R. 1975. Is there a Podostemon type of embryo sac in the genus *Farmeria*? – Caryologia. 28 (2): 229–235.
- Baroux C., Spillane C., Grossniklaus U. 2002. Evolutionary origins of the endosperm in flowering plants. – Genome Biol. 3: 1026.1–1026.5.
- Battaglia E. 1981. Embryological questions: 3. Semigamy, hemigamy and gynandroembryony. – Ann. Bot. (London). 39 (2): 173–175.
- Batygina T.B. 1974. Wheat embryology. Leningrad. 206 p. (In Russ.).
- Berger F., Twell D. 2011. Germline specification and function in plants. – Annu. Rev. Plant Biol. 62: 113–121.
- Bleckmann A., Alter S., Dresselhaus T. 2014. The beginning of a seed: regulatory mechanisms of double fertilization. – Frontiers in Plant Science. 5: 1–12. Article 452. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00452>
- Butuzova O.G. 2018. Peculiarities of seed formation in *Pulsatilla vulgaris* and *Helleborus niger* (Ranunculaceae) with embryo postdevelopment. – Bot. Zhurn. 103 (3): 313–330 (In Russ.). <https://doi.org/10.1134/S0006813618030031>
- Cai G. 2022. The legacy of kinesins in the pollen tube 30 years later. – Cytoskeleton. 79 (103): 8–19. <https://doi.org/10.1002/cm.21713>
- Cao J.-G., Dai X.-F., Dai X.-L., Wang Q.-X. 2016. Observation on fertilization and a novel cytological mechanism for preventing polyspermy in the fern

- Osmunda japonica*. — Int. J. Plant Sci. 177 (3): 287–293. <https://doi.org/10.1086/684523>
- Carmichael J., Friedman W. 1995. Double fertilization in *Gnetum gnemon*: the relationship between the cell cycle and sexual reproduction. — Plant Cell. 7: 1975–1988.
- Charzynska M., Ciampolini F., Cresti M. 1988. Generative cell division and sperm cell formation in barley. — Sexual Plant Reprod. 1: 240–247.
- Chen J., Lausser A., Dresselhaus T. 2014. Hormonal responses during early embryogenesis in maize. — Biochem. Soc. Trans. 42: 325–331.
- Chen Y.-H., Li H.-J., Shi D.-Q., L. Y., Liu J., Sreenivasan R., Baskar R., Grossniklaus U., Yang W.-C. 2007. The central cell plays a critical role in pollen tube guidance in *Arabidopsis*. — Plant Cell. 19: 3563–357.
- Cornish E.C., Pettit J.M., Bonig I., Clarke A.E. 1987. Developmentally-controlled tissue-specific expression of a gene associated with self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. — Nature. 326: 99–102.
- Corti F.E., Maugini E. 1964. Passaggio di corpi figurati fra cellula del tappeto e cellula centrale nell'archegonio del pini. — Caryologia. 17 (1): 1–39.
- Costa L.M., Marshall E., Tesfaye M. et al. 2014. Flowering plants central cell-derived peptides regulate early embryo patterning in flowering plants. — Science. 344: 168–172.
- Coulter J.M. 1911. The endosperm of angiosperms. — Bot. Gaz. 52: 380–385.
- De Graaf B.H.J., Dewitte W. 2019. Fertilisation and cell cycle in angiosperms. — In: Annual plant reviews online. P. 1–31. <https://doi.org/10.1002/9781119312994.apr064>
- Denninger P., Bleckmann A., Lausser A., Vogler F., Ott T., Ehrhardt D. et al. 2014. Male-female communication triggers calcium signatures during fertilization in *Arabidopsis*. — Nature Communications. 5. Article number: 4645. <https://doi.org/10.1038/ncomms5645>
- Doll N.M., Depege-Fargeix N., Rogowsky P.M., Widiez T. 2017. Signaling in early maize kernel development. — Mol. Plant. 10: 375–388.
- Dresselhaus T. 2006. Cell-cell communication during double fertilization. — Curr. Opin. Plant Biol. 9 (1): 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2005.11.002>
- Dresselhaus T., Franklin-Tong N. 2013. Male-female crosstalk during pollen germination, tube growth and guidance, and double fertilization. — Mol. Plant. 6: 1018–1036.
- Dresselhaus T., Sprunck S., Wess G.M. 2016. Fertilization mechanisms in flowering plants. — Curr. Biol. 26: 125–139. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.12.032>
- Dumas C., Knox R.B., Gaude T. 1985. The spatial association of the sperm cells and vegetative nucleus in the pollen grain of *Brassica*. — Protoplasma. 124 (3): 168–174.
- Dumas C., Knox R.B., McConchie C.A., Russell S.D. 1984. Emerging physiological concepts in fertilization. — What's New Plant Physiol. 15: 168–174.
- Erdelská O. 1983. Microcinematographical investigation of the female gametophyte, fertilization and early embryo and endosperm development. — In: Fertilization and embryogenesis in ovulated plants. Bratislava, Czechoslovakia. P. 49–54.
- Ermakov I.P., Matveeva N.P., Breigina M.A. 2016. Physiology of haploid generation of seed plants. Moscow. 276 p. (In Russ.).
- Faure J.-E., Dumas C. 2001. Fertilization in flowering plants. New approaches for an old story. — Plant Physiol. 125 (1): 102–104. <https://doi.org/10.1104/pp.125.1.102>
- Faure J.-E., Mogensen H.L., Dumas C., Lörz H., Kranz E. 1993. Caryogamy after electrofusion of single egg and sperm cell protoplasts from maize: cytological evidence and time course. — Plant Cell. 5: 747–755.
- Faure J.-E., Rusche M.L., Thomas A., Keim P., Dumas C., Mogensen H.L., Rougier M., Chaboud A. 2003. Double fertilization in maize: the two male gametes from a pollen grain have the ability to fuse with egg cells. — Plant J. 33 (6): 1051–1062. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113x.2003.01692.x>
- Friedman W.E. 1990. Sexual reproduction in *Ephedra nevadensis* (Ephedraceae): further evidence of double fertilization in a nonflowering seed plant. — Am. J. Bot. 77 (12): 1582–1598.
- Friedman W.E. 1991. Double fertilization in *Ephedra trifurca*, a nonflowering seed plant: The relationship between fertilization events and the cell cycle. — Protoplasma. 165: 106–120.
- Friedman W.E. 1994. The evolution of embryogeny in seed plants and the developmental origin and early history of endosperm. — Am. J. Bot. 81 (11): 1468–1486.
- Friedman W.E. 1998. The evolution of double fertilization and endosperm: an “historical” perspective. — Sexual Plant Reprod. 11: 6–16.
- Friedman W.E. 1999. Expression of the cell cycle in sperm of *Arabidopsis*: implications for understanding patterns of gametogenesis and fertilization in plants and other eukaryotes. — Development. 126: 1065–1075.
- Friedman W.E. 2015. Development and evolution of the female gametophyte and fertilization process in *Welwitschia mirabilis* (Welwitschiaceae). — Am. J. Bot. 102 (2): 312–324. <https://doi.org/10.3732/ajb.1400472>
- Friedman W.E., Williams J.E. 2004. Developmental evolution of the sexual process in ancient flowering plant lineages. — Plant Cell. 16: 119–132.
- Gerassimova-Navashina H.N. 1947. Mitotic hypothesis of double fertilization. — Rep. USSR Acad. Sci. 57 (4): 395–398 (In Russ.).
- Gerassimova-Navashina H.N. 1957. Fertilization as an ontogenetic process. — Bot. Zhurn. 42 (11): 1654–1673 (In Russ.).

- Gerassimova-Navashina H.N. 1960. A contribution to the cytology of fertilization in flowering plants. — *Nucleus*. 3 (1): 111–120.
- Gerassimova-Navashina H.N. 1969. Some cytological aspects of double fertilization. — *Rev. Cytol. Biol. Vég.* 32 (3–4): 301–308.
- Gerassimova-Navashina H.N. 1971. Double fertilization of angiosperms and some of its theoretical aspects. — In: *Problems of embryology*. Kiev. P. 113–152 (In Russ.).
- Gerassimova-Navashina H.N. 1990. Fertilization in angiospermous plants. — *Bot. Zhurn.* 75 (8): 1061–1071 (In Russ.).
- Gilbert S.F. 2003. *Developmental biology*. St. Petersburg, Russia. 850 p.
- Goroschankin I.N. 1880. On corpuscles and sexual process in gymnosperms. *Scientific Notes Moscow Univ. Ser. Nat. History*. 1 (8): 1–177 (In Russ.).
- Grebelnyi S.D. 2008. Cloning in nature. A part playing by gene recombination stoppage in fauna and flora formation. Saint Petersburg. 287 p. (In Russ.).
- Grossniklaus U. 2017. Polyspermy produces tri-parental seeds in maize. — *Curr. Biol.* 27 (24): R1300–R1302. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.10.059>
- Groß-Hardt R., Kagi C., Baumann N., Moore J.M., Baskar R. et al. 2007. LACHESIS restricts gametic cell fate in the female gametophyte of *Arabidopsis*. — *PLoS Biol.* 5 (3): e47. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050047>
- Guignard L. 1886. Observation sur les ovules et la fécondation des Cactées. — *Bull. Soc. Bot. France*. 33: 276–280.
- Guignard L. 1899. Sur les anthérozoides et la double copulation sexuelle chez les végétaux angiosperm. — *Rev. Gén. Bot.* 11: 129–135.
- Hafidh S., Fila J., David Honys D. 2016. Male gametophyte development and function in angiosperms: a general concept. — *Plant Reprod.* 29 (1–2): 31–51. <https://doi.org/10.1007/s00497-015-0272-4>
- Håkansson A. 1951. Parthenogenesis in *Allium*. — *Bot. Notiser*. 2: 143–179.
- Hamamura Y., Saito C., Awai C., Kurihara D., Miyawaki A., Nakagawa T., Kanaoka M.M., Sasaki N., Nakano A., Berger F., Higashiyama T. 2011. Live-cell imaging reveals the dynamics of two sperm cells during double fertilization in *Arabidopsis thaliana*. — *Curr. Biol.* 21: 497–502.
- Harrisson J. 1982. Pollen-pistil interaction and cross-incompatibility in grasses. — *Science*. 215 (4538): 1358–1364.
- Heslop-Harrisson J., Heslop-Harrisson Y. 1989. Myosin associated with the surfaces c organelles, vegetative nuclei and generative cells in angiosperm pollen grains and tubes. — *J. Cell Sci.* 94 (2): 319–325.
- Higashiyama T., Kuroiwa H., Kawano S., Kuroiwa T. 1997. Kinetics of double fertilization in *Torenia fournieri* based on direct observation of the naked embryo sac. — *Planta*. 203 (1): 101–110.
- Higashiyama T., Yabe S., Sasaki N., Nishimura Y., Miyagishima S., Kuroiwa H., Kuroiwa T. 2001. Pollen tube attraction by the synergid cell. — *Science*. 293: 1480–1483.
- Huang B.-Q., Russel S.D. 1992. Female Germ Unit: organization, isolation, and function. — *Int. Rev. Cytol.* 140: 233–293. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)61099-2](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)61099-2)
- Huang B.-Q., Strout G.W., Russell S.D. 1993. Fertilization in *Nicotiana tabacum*: ultrastructural organization of propanejet-frozen embryo sacs *in vivo*. — *Planta*. 191: 256–264.
- Igawa T., Yanagawa Yu., Miyagishima Shin-ja, Mori T. 2013. Analysis of gamete membrane dynamics during double fertilization of *Arabidopsis*. — *J. Plant. Res.* 126 (3): 387–394.
- Iwakawa H., Shinmyo A., Sekine M. 2006. *Arabidopsis* CDKA; 1, a cdc2 homologue, controls proliferation of generative cells in male gametogenesis. — *Plant J.* 45: 819–831. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02643.x>
- Jensen W.A., Fisher D.B. 1968. Cotton embryogenesis: The entrance and discharge of the pollen tube in the embryo sac. — *Planta*. 78 (2): 158–183.
- Ji Min S., Ling Y., Masaru O.-T., Tomokazu K. 2020. Cellular dynamics of double fertilization and early embryogenesis in flowering plants. — *Plant Soil Sci. Faculty Publications*. 155. 32 p. https://uknowledge.uky.edu/pss_facpub/155
- Johri B.M. 1963. Female gametophyte. — In: *Recent advances in the embryology of angiosperms*. Delhi. P. 69–103.
- Johri B.M., Ambegaokar K.B. 1984. Embryology: then and now. — In *Springer-Verlag: Berlin etc.* P. 28–40.
- Kadsamy M.K., Paolillo, D.J., Faraday C.D. et al. 1989. The S-locus specific glycoproteins in *Brassica* accumulate in the cell wall of developing stigma papillae. — *Dev. Biol.* 134: 462–472.
- Kamelina O.P. 2009. *Sistematicheskaya embriologiya tsvetkovykh rasteniy. Dvudolnye. [Systematic embryology of flowering plants. Dicotyledons.]*. Barnaul. 501 p. (In Russ.).
- Kanaoka M.M. 2018. Cell-cell communications and molecular mechanisms in plant sexual reproduction. — *J. Plant Res.* 131 (1): 37–47. <https://doi.org/10.1007/s10265-017-0997-2>
- Kapil R.N. 1970. Podostemaceae. — *Bull. Indian Nat. Sci. Acad.* 41: 104–109.
- Kliwer I., Dresselhaus T. 2010. Establishment of the male germline and sperm cell movement during pollen germination and tube growth in maize. — *Plant Signaling Behavior*. 5 (7): 885–9. <https://doi.org/10.4161/psb.5.7.12033>
- Knox R.B., Heslop-Yarrison J., Heslop-Harrison Y. 1975. Pollen wall proteins: localization and characterisation of gametophytic and sporophytic fractions. — *Biol. J. Linn. Soc.* 7 (1): 77–187.

- Knox R.B., Zee S.Y., Blomstedt C., Singh M.B. 1993. A positive signal from the fertilization of the egg cell sets off endosperm proliferation in angiosperm embryogenesis. — *New Phytol.* 125 (4): 679–694. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1993.tb03917.x>.
- Kojima A., Nagato Y. 1992. Diplosporous embryo sac formation and the degree in *Allium tuberosum*. — *Sexual Plant Reprod.* 5: 75–78.
- Kojima A., Nagato Y. 1997. Discovery of highly apomictic and highly amphimictic dihaploids in *Allium tuberosum*. — *Sexual Plant Reprod.* 10: 8–12.
- Korobova S.N. 1982. Formation of female gametophyte, fertilization, embryo and endosperm development in maize. — In: *Cultured flora of the USSR*. Moscow. P. 151–176 (In Russ.).
- Kranz E., Hoshino Y., Okamoto T. 2008. *In vitro* fertilization with isolated higher plant gametes. — *Methods Mol. Biol.* 427: 51–69. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-273-1_4
- Lakshmanan K.K., Ambegaokar K.B. 1984. Polyembryony. — In: *Embryology of angiosperms*. Springer-Verlag: Berlin etc. P. 445–474.
- Lausser A., Kliwer I., Srilunchang K., Dresselhaus T. 2010. Sporophytic control of pollen tube growth and guidance in maize. — *J. Exp. Bot.* 61: 673–682. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp330>
- Li Y., Guo J., Yang Z., Yan D.-L. 2018. Plasma membrane-localized calcium pumps and copines coordinately regulate pollen germination and fertility in *Arabidopsis*. — *Int. J. Mol. Sci.* 19: 1774. <https://doi.org/10.3390/ijms19061774>
- Linkies A., Knight C., Graeber K., Leubner G. 2010. The evolution of seeds. — *New Phytol.* 186: 817–831. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03249.x>
- Locascio A., Roig-Villanova I., Bernardi J., Varotto S. 2014. Current perspectives on the hormonal control of seed development in *Arabidopsis* and maize: a focus on auxin. — *Frontiers in Plant Science.* 5 (412): 1–22.
- Lord E., Russell S. 2002. The mechanisms of pollination and fertilization in plants. — *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18: 81–105. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.18.012502.083438>
- Marton M.L., Dresselhaus Th. 2008. A comparison of early molecular fertilization mechanisms in animals and flowering plants. — *Sexual Plant Reprod.* 21: 37–52. <https://doi.org/10.1007/s00497-007-0062-8>
- McClure B.A., Haring V., Ebert P.R., Anderson M.A., Simpson R.J., Sakiyama F., Clarke A.E. 1989. Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana glauca* are ribonucleases. — *Nature.* 342 (6252): 955–957. <https://doi.org/10.1038/342955a0>
- McCue A.D., Cresti M., Feijo J.A., Slotkin R.K. 2011. Cytoplasmic connection of sperm cells to the pollen vegetative cell nucleus: potential roles of the male germ unit revisited. — *J. Exp. Bot.* 62 (5): 1621–31. <https://doi.org/10.1093/jxb/err032>
- Mori T., Igawa T. 2014. Gamete attachment process revealed in flowering plant fertilization. — *Plant Signaling and Behavior.* 9 (12): e977715. <https://doi.org/10.4161/15592324.2014.977715>
- Mori T., Kuroiwa H., Higashiyama T., Kuroiwa T. 2006. Generative Cell Specific 1 is essential for angiosperm fertilization. — *Nature Cell Biol.* 8 (1): 64–71.
- Murgai M., Wilms H.L. 1988. Three dimensional image and mitochondrial distribution in sperm cells of *Euphorbia dilaensis*. — In: *Plant sperm cells as tools for biotechnology*. PUDOC: Wageningen. P. 75–79.
- Nawaschin S.G. 1898a. New observations of fertilization in *Fritillaria tenella* и *Lilium martagon*. — In: *Diary of X congress of Russian Naturalists and Doctors*. Kiev. 6: 16–21 (In Russ.).
- Nawaschin S.G. 1898b. Resultate einer Revision der Befruchtungsvorgänge bei *Lilium martagon* und *Fritillaria tenella*. — *Bull. Acad. Imp. Sci. St. Petersburg.* 9 (4): 377–382.
- Nawaschin S.G. 1900. On the fertilization in Compositae and Orchidaceae. — *Rep. Imper. Acad. Sci.* 13 (3): 335–340 (In Russ.).
- Nawaschin S.G. 1910. Nöheres über die Bildung der Spermakerne bei *Lilium martagon*. — *Ann. Jard. Bot. Buitenzorg.* 3 (2): 871–904.
- Newcomb W. 1973. The development of the embryo sac of sunflower *Helianthus annuus* after fertilization. — *Can. J. Bot.* 51 (5): 879–890.
- Nowack M.K., Grini P.E., Jakoby M.J., Lafos M., Koncz C., Schnittger A. 2006. A positive signal from the fertilization of the egg cell sets off endosperm proliferation in angiosperm embryogenesis. — *Nat. Genet.* 38: 63–67. <https://doi.org/10.1038/ng1694>
- Pagnussat G.C., Alandete-Saez M., Bowman J.L., Sundaresan V. 2009. Auxin-dependent patterning and gamete specification in the *Arabidopsis* female gametophyte. — *Science.* 324: 1684–1689.
- Palanivelu R., Tsukamoto T. 2012. Pathfinding in angiosperm reproduction: pollen tube guidance by pistils ensures successful double fertilization. — In: *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology.* 1 (1): 96–113. <https://doi.org/10.1002/wdev.6>
- Palevitz B.A. 1993. Relationship between the generative cell and vegetative nucleus in pollen tubes of *Nicotiana tabacum*. — *Sexual Plant Repr.* 6: 1–10.
- Palevitz B.A., Cresti M. 1989. Cytoskeletal changes during generative cell division and sperm cell formation in *Tradescantia virginiana*. — *Protoplasma.* 150: 54–71.
- Polyakov I.M. 1970. Three phases of fertilization process in flowering plants. Republican interdepartmental thematic collection “Breeding and seed production”. Kiev. 15: 3–12 (In Russ.).
- Plyushch T.A. 1992. The ultrastructure of embryo sac in angiosperms. Kiev. 145 p. (In Russ.).

- Punwani J.A., Drews G.N. 2008. Development and function of the synergids in angiosperms. — *Sexual Plant Reprod.* 21: 7–15.
- Qu L.J., Li L., Lan Z., Dresselhaus T. 2015. Peptide signalling during the pollen tube journey and double fertilization. — *J. Exp. Bot.* 66 (17): 5139–50. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv275>
- Raghavan R. 2003. Some reflections on double fertilization, from its discovery to the present. — *New Phytol.* 159 (3): 565–583. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00846.x>
- Rotman N., Rozier F., Boavidal L., Dumas C., Berger F., Faure J. 2003. Female control of male gamete delivery during fertilization in *Arabidopsis thaliana*. — *Curr. Biol.* 13 (5): 432–436. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(03\)00093-9](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00093-9)
- Rudall P.J. 2021. Evolution and patterning of the ovule in seed plants. — *Biol. Rev.* 96: 943–960. <https://doi.org/10.1111/brv.12684>
- Rusche M.L., Mogensen H.L. 1988. The mail germ unit in *Zea mays*: quative ultrastructure and three-dimensional analysis. — In: Sexual reproduction in higher plants. Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg. P. 221–226.
- Russell S.D. 1983. Fertilization in *Plumbago zeylanica*: gametic fusion and fate of the male cytoplasm. — *Am. J. Bot.* 70 (3): 416–434.
- Russell S.D. 1984. Ultrastructure of the sperm of *Plumbago zeylanica*: 2. Quantitative cytology and three-dimensional reconstruction. — *Planta.* 162 (4): 385–391.
- Russell S.D. 1992. Double fertilization. — *Int. Rev. Cytol.* 140: 357–388.
- Russell S.D., Cass D.D. 1981. Ultrastructure of the sperms of *Plumbago zeylanica*. I. Cytology and association with the vegetative nucleus. — *Protoplasma.* 107 (1): 85–107.
- Sandaklie-Nikolova L., Palanivelu R., King E.J., Copenhaver G.P., Drews G.N. 2007. Synergid cell death in arabidopsis is triggered following direct interaction with the pollen tube. — *Plant Physiol.* 144: 1753–1762.
- Savina G.I. 1979. Peculiarities of the embryology in Orchidaceae family. — In: Actual questions of embryology of angiosperms. Leningrad. P. 19–28 (In Russ.).
- Savina G.I., Poddubnaya-Arnoldi V.A. 1990. Orchidaceae family. — In: Comparative embryology of flowering plants. Butomaceae-Lemnaceae. Leningrad. P. 172–179 (In Russ.).
- Schattner S., Schattner J., Munder F., Höpfe E., Walter W.J. 2021. A tug-of-war model explains the saltatory sperm cell movement in *Arabidopsis thaliana* pollen tubes by kinesins with calponin homology domain. — *Front. Plant Sci.* 11: 601282. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.601282>
- Schulz R., Jensen W.A. 1968. *Capsella* embryogenesis: The synergids before and after fertilization. — *Am. J. Bot.* 55 (5): 541–552.
- Scott R.J., Armstrong S.J., Doughty J., Spielman M. 2008. Double fertilization in *Arabidopsis thaliana* involves a polyspermy block on the egg but not the central cell. — *Mol. Plant.* 1 (4): 611–619. <https://doi.org/10.1093/mp/ssn016>
- Shamrov I.I. 1983. Antecological investigation of three species of *Ceratophyllum* (Ceratophyllaceae). — *Bot. Zhurn.* 68 (10): 1357–1366 (In Russ.).
- Shamrov I.I. 1988. Ovule development and peculiarities of embryo sac structure in representatives of Gentianaceae family. — *Bot. Zhurn.* 73 (2): 213–222 (In Russ.).
- Shamrov I.I. 1990a. Liliaceae family. — In: Comparative embryology of flowering plants. Butomaceae-Lemnaceae. Leningrad. P. 63–74 (In Russ.).
- Shamrov I.I. 1990a. Hemerocallidaceae family. — In: Comparative embryology of flowering plants. Butomaceae-Lemnaceae. Leningrad. P. 83–87 (In Russ.).
- Shamrov I.I. 1997. Ovule and seed development in *Ceratophyllum demersum* (Ceratophyllaceae). — *Bot. Zhurn.* 82 (10): 1–13 (In Russ.).
- Shamrov I.I. 2008. Ovule of flowering plants: structure, functions, origin. Moscow. 356 p. (In Russ.).
- Shamrov I.I. 2015a. Embryology and plant reproduction. St. Petersburg. 216 p. (In Russ.).
- Shamrov I.I. 2015b. Sexual cells and sexual process in plants and animals. — In: Abstracts of reports of III (XI) International botanical conference of young scientists in Saint Petersburg. BIN: St. Petersburg. P. 90–92 (In Russ.).
- Shamrov I.I. 2018. Diversity and typification of ovules in flowering plants. — *Wulfenia.* 25: 81–109.
- Shamrov I.I. 2019. Apomixis in plants and animal: embryological aspects. — In: Collection of scientific articles. Living systems-2019. Saratov. P. 51–52.
- Shamrov I.I. 2020. Structure and development of coenocarpous gynoecium in angiosperms. — *Wulfenia.* 27: 145–182.
- Shamrov I.I. 2022. Structural differentiation of the ovule and seed and its importance for reproduction in angiosperms. — *Wulfenia.* 29: 61–93.
- Shin J.M., Yuan L., Ohme-Takagi M., Kawashima T. 2021. Cellular dynamics of double fertilization and early embryogenesis in flowering plants. — *J. Exp. Zool. Part B.* 336 (8): 642–651. <https://doi.org/10.1002/jez.b.22981>
- Shivanna K.R. 2016. Fertilization in flowering plants. 2. Selection of the male partner is the prerogative of the maternal parent. — *Resonance.* 21: 1007–1018.
- Singh H. 1978. Embryology of gymnosperms. Springer-Verlag: Berlin-Stuttgart. 302 p.
- Solntseva M.P. 1973. Semygamy and fertilization in *Rudbeckia laciniata* L. — *Bot. Zhurn.* 58 (9): 1261–1277 (In Russ.).
- Solntseva M.P. 1979. Hemigamy and possibilities of its use as one of apomixis form. — In: Actual questions of embryology of angiosperms. Leningrad. P. 39–46 (In Russ.).

- Spielman M., Scott R.J. 2008. Polyspermy barriers in plants: from preventing to promoting fertilization. — *Sexual Plant Reprod.* 21 (1): 53–65.
<https://doi.org/10.1007/s00497-007-0063-7>
- Sprunck S., Rademacher S., Vogler F., Gheyselinck J., Grossniklaus U., Dresselhaus T. 2012. Egg cell-secreted EC1 triggers sperm cell activation during double fertilization. — *Science*. 338: 1093–1097.
- Strasburger E. 1884. Neue Untersuchungen über den Befruchtungsvorgang bei den Phanerogamen als Grundlage für eine Theorie der Zeugung. G. Fisher: Jena. 177 S.
- Strasburger E. 1900. Einige Bemerkungen zur Frage nach der “doppelten Befruchtung” bei den Angiospermen. — *Bot. Zei.* 58: 294–315.
- Takahashi T., Mori T., Ueda K., Yamada L., Nagahara S., Higashiyama T., Sawada H., Igawa T. 2018. The male gamete membrane protein DMP9/DAU2 is required for double fertilization in flowering plants. — *Development*. 145 (23): dev170076. <https://doi.org/10.1242/dev.170076>
- Taylor F., Kenrick J., Li Y., Kaul V., Gunning B.E.S., Knox R.B. 1989. The male germ unit in *Rhododendron*: quantitative cytology, three-dimensional reconstruction, isolation and detection using fluorescent probes. — *Sexual Plant Reprod.* 2: 254–264.
- Terceros G.C., Resentini F., Cucinotta M., Manrique S., Colombo L., Mendes M.A. 2020. The importance of cytokinins during reproductive development in *Arabidopsis* and beyond. — *Int. J. Mol. Sci.* 21: 81–61. <https://doi.org/10.3390/ijms21218161>
- Tian H.Q., Yuan T., Russell S.D. 2005. Relationship between double fertilization and the cell cycle in male and female gametes of tobacco. — *Sexual Plant Reprod.* 17: 243–252.
- Titova G.E. 1988. The embryology of some water plants (*Nelumbo nucifera* Gaertn., *Cabomba caroliniana* A. Gray, *Trapa astrachanica* (Fler.) Winter). PhD Thesis. BIN: Leningrad. 188 p. (In Russ.).
- Titova G.E., Zakharova A.A., Shamrov I.I. 1997. Ovule and seed development in *Trapa natans* L. in connection with the specific embryo sac structure, absence of endosperm and pseudomonocotly. — *Bull. Polish Acad. Sci. Biol.* 45 (2–4): 81–92.
- Torshilova A.A. 2018. Process of double fertilization in genus *Dioscorea* (*Dioscorea nipponica* and *D. caucasica*). — *Bot. Zhurn.* 103 (3): 283–296 (In Russ.). <https://doi.org/10.1134/S0006813618030018>
- Trenin V.V. 1988. Introduction into cytoembryology of conifers. Petrozhavodsk. 152 p. (In Russ.).
- Twell D. 2006. A blossoming romance: gamete interactions in flowering plants. — *Nature Cell Biol.* 8 (1): 1–4. <https://doi.org/10.1038/ncb0106-14>
- Tyrnov V.S. 2000. Parthenogenesis. — In: *Embryology of flowering plants. Terminology and concepts*. St. Petersburg. 3: 158–165 (In Russ.).
- Van Went J.L. 1970. The ultrastructure of the fertilized embryo sac of *Petunia*. — *Acta Bot. Neerl.* 19 (4): 468–480.
- Van Went J.L., Willemse M.T.M. 1984. Fertilization. — In: *Embryology of angiosperms*. Springer-Verlag: Berlin etc. P. 273–317.
- Vazart J. 1969. Degeration of a synergid and pollen tube entrance into the embryo sac of *Linum usitatissimum* L. — *Ann. Univ. ARERS.* 9: 89–97.
- Vij S.P., Kaur P., Bhanwra R.K. 1999. Embryological studies in *Epipactis gigantea* (Orchidaceae). — *Lindleyana*. 14 (3): 160–167.
- Vishnyakova M.A. 2006. Transmitting tract in pistil. In: *Embryology of flowering plants. Terminology and concepts*. Enfield, NH, USA. 2: 37–41.
- Vorsobina L.I., Solntseva M.P. 1979. Florescence peculiarities and fertilization process in some Amaryllidaceae. — In: *Actual questions of embryology of angiosperms*. Leningrad. P. 28–38. (In Russ.).
- Weterings K., Russell S.D. 2004. Experimental analysis of the fertilization process. — *Plant Cell*. 16: S107–S118. <https://doi.org/10.1105/tpc.016873>
- Willemse M.T.M. 1974. Megagametogenesis and formation of neocytoplasm in *Pinus sylvestris* L. — In: *Fertilization in higher plants*. Amsterdam; Oxford: North-Holland. P. 97–102.
- Williams C.G. 2009. Conifer reproductive biology. New York: Springer-Verlag. 167 p. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9602-0>
- Wilms H.J. 1981. Pollen tube penetration and fertilization in spinach. — *Acta Bot. Neerl.* 30 (1–2): 101–122.
- Wilms H.J. 1986. Dimorphic sperm cells in the pollen grain of *Spinacia*. — In: *Biology of reproduction and cell motility in plants and animals*. Siena. P. 193–198.
- Yadegari R., Drews N. 2004. Female gametophyte development. — *Plant Cell*. 16: S133–S141.
- Yang H.Q., Bohdanowicz J., Pierson E.S., Li Y., Tiezzi A., Cresti M. 1995. Microtubular organization during asymmetrical division of the generative cell in *Gagea lutea*. — *J. Plant Cell*. 108: 269–276.
- Yeung E.C., Zee S.Y., Ye X.L. 1994. Embryology of *Cymbidium sinense*: ovule development. — *Phytomorphology*. 44 (1): 55–63.
- Yu H.S., Hu S.Y., Russell S.D. 1992. Sperm cells in pollen tubes of *Nicotiana tabacum* L.: three dimensional, cytoplasmic diminution and quantitative cytology. — *Protoplasma*. 168: 172–183.
- Yudakova O.I., Shakina T.N., Kaybeleva E.I. 2018. Cytoembryological peculiarities of endosperm development in some apomictic *Poa* species (Poaceae). — *Bot. Zhurn.* 103 (7): 908–918 (In Russ.).
- Xu H., Woboda I., Bhalla P., Singh M.B. 1999. Male gametic cell-specific gene expression in flowering plants. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96: 2554–2558.
- Xu Y., Huang S. 2020. Control of the actin cytoskeleton within apical and subapical regions of pollen tubes. — *Front. Cell Dev. Biol.* 8: 614821. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.614821>

- Zhang R., Xu Ya., Yi R., Shen J., Huang S. 2023. Actin cytoskeleton in the control of vesicle transport, cytoplasmic organization, and pollen tube tip growth. — *Plant Physiol.* 193: 9–25.
<https://doi.org/10.1093/plphys/kiad203>
- Zhang M., Zheng C.-X. 2016. Archegonium and fertilization in Coniferopsida. — *Trees.* 30 (1): 75–86.
<https://doi.org/10.1007/s0048-015-1349-2>
- Zhukova G.Ya., Sokolovskaya T.B. 1977. Ultrastructure of antipodes in embryo sac of *Aconitum napellus* L. (Ranunculaceae). — *Bot. Zhurn.* 62 (11): 1600–1611 (In Russ.).

СТРОЕНИЕ И РАЗВИТИЕ ГАМЕТ В СВЯЗИ С ОПЛОДОТВОРЕНИЕМ У ЦВЕТКОВЫХ РАСТЕНИЙ

И. И. Шамров^{1,2,*}, Г. М. Анисимова^{2,**}

¹Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена
 наб. р. Мойки, 48, Санкт-Петербург, 191186, Россия

²Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН
 ул. Проф. Попова, 2, Санкт-Петербург, 197022, Россия

*e-mail: shamrov52@mail.ru

**e-mail: galina0353@mail.ru

В статье анализируются данные по процессам, которые происходят до и после оплодотворения у цветковых растений. Гаметы формируются на стадии гаметофита из гаплоидных микроспор и мегаспор. Они представлены спермиями-клетками, яйцеклеткой и центральной клеткой. Слияние мужской и женской гамет происходит после проникновения пыльцевой трубки в любую из синергид. Один спермий сливается с яйцеклеткой, а второй из той же пыльцевой трубки объединяется с центральной клеткой.

У покрытосеменных растений вероятно существуют четыре типа оплодотворения. Эти типы различаются степенью завершенности процесса сингамии. Премитотический и постмитотический типы характеризуются завершением сингамии, в то время как андрогамному и гинандрогамному типам присуща незавершенная сингамия. Важное значение в этом случае приобретает поведение ядер спермиев-клеток. Как правило, они объединяются с женскими гаметами (премитотический и постмитотический типы оплодотворения), однако ядра спермиев могут оставаться автономными (гинандрогамный тип оплодотворения) или ядро женской гаметы после разрушения может быть замещено ядром спермия (андрогамный тип оплодотворения). При премитотическом типе оплодотворения протопласты гамет (плазмोगамия) объединяются до начала митоза в ядре зиготы. Что касается постмитотического типа оплодотворения, то он осуществляется на совершенно иной основе. Возможно, что у цветковых растений хромосомы ядер спермия и яйцеклетки не сливаются во время митоза. В дальнейшем они делятся независимо, а диплоидный набор хромосом возникает на стадии 2-клеточного зародыша.

Ключевые слова: мужские и женские гаметы, оплодотворение, сингамия, тройное слияние, типы оплодотворения, покрытосеменные растения

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена в рамках государственного задания Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН по темам № 1021071912890-3-1.6.11 “Структурно-функциональные и молекулярно-генетические основы развития и адаптации высших растений”, № 1021071912896-7-1.6.11. “Поливариантность

морфогенетических программ развития репродуктивных структур растений, регуляция морфопрцессов *in vivo* и *in vitro*”, 2024–2028 гг. (сбор, обработка материала и обсуждение результатов) и “Адаптивные реакции биологических систем на специфические и неспецифические воздействия факторов внешней среды” (РГПУ им. А.И. Герцена — описание результатов исследования).

LOW TEMPERATURE-INDUCED CHLOROPLAST RELOCATION IN MESOPHYLL CELLS OF *PINUS SYLVESTRIS* (PINACEAE): SBF SEM 3D RECONSTRUCTION

© 2024 г. N. K. Koteyeva^{a,#}, A. N. Ivanova^{a,b}, T. A. Borisenko^{a,b}, M. S. Tarasova^{a,b}, O. E. Mirgorodskaya^a, E. V. Voznesenskaya^a

^aKomarov Botanical Institute RAS

Prof. Popova Str., 2, St. Petersburg, 197022, Russia

^bSt. Petersburg State University

Universitetskaya Emb., 7–9, St. Petersburg, 199034, Russia

[#]e-mail: nkoteyeva@binran.ru

Received 27.11.2023

Revised 04.12.2023

Accepted 05.12.2023

Evergreen species of temperate zone acclimate to seasonal climates by reorganizations of mesophyll cell structure including chloroplast movement as a photoprotective reaction. However the exact factor inducing structural changes is still unexplored. To reveal the specific pattern of chloroplast arrangement during the annual cycle and the effect of temperature on their movement, the mesophyll cell structure in *Pinus sylvestris* grown out- and indoors was studied. The serial block-face scanning electron microscopy (SBF SEM) was used for the 3D imaging of mesophyll cells to show the spatial position and shape modification of chloroplasts. It has been shown that during the growing season, chloroplasts have a well-developed thylakoid system, they are located along the cell wall and occupy predominantly the part of the cell wall faced the intercellular airspace. Chloroplast movement starts in October–November, and during the winter they aggregate in the cell lobes clumping together. At that time, the thylakoid system is reorganised and consists mainly of long doubled thylakoids and small grana. The 3D reconstruction shows that the chloroplasts are irregularly oriented, swollen, and develop multiple protrusions filled by stroma that can be recognized as stromules. In indoor plants, seasonal reorganization of the mesophyll ultrastructure does not occur suggesting low temperatures but not photoperiod and light quality induce seasonal chloroplast movement in *P. sylvestris* mesophyll. Finally, we indicate 3D reconstruction is a powerful tool in study of low temperature-induced change of chloroplast positioning.

Keywords: *Pinus sylvestris*, mesophyll, chloroplast movement, seasonal changes, low temperatures, 3D reconstruction

DOI: 10.31857/S0006813624010028, **EDN:** FEJOEZ

Overwintering plants of temperate zone acclimate to low temperatures during transition period by development of freezing tolerance. Cold acclimation includes accumulation of cryoprotectors (Gusta, Wisniewski, 2013) and antifreeze compounds (Duman, Wisniewski, 2014), membrane stabilization (Steponkus, 1984; Uemura et al., 2006), modifications of photosynthetic machinery (Demmig-Adams et al., 2012; Ensminger et al., 2012), all associated with change in gene expression (Thomashow, 1999; Xin, Browse, 2000). Evergreen woody plants are subject to seasonal changes and develop physiological

mechanisms that lead to a strict periodicity in the development of freezing tolerance (Bigras et al., 2001). Freezing tolerance in woody plants is mainly induced by low temperatures, or may be a response to a short photoperiod (Guy, 1990) or a combination thereof (Li et al., 2004; Arora, Taulavuori, 2016; Chang et al., 2021). It is closely but not necessarily associated with dormancy development combined with growth cessation (Bigras et al., 2001; Wisniewski et al., 2018) for which photoperiod is an induction signal (Lloyd et al., 1996; Howe et al., 1997; Jian et al., 1997; Jian et al., 2000; Maurya, Bhalerao, 2017). This suggests that

variable elements of cold acclimation may be induced differently as a response to different ecological factors or their combination (Chang et al., 2021).

Seasonal structural changes in woody evergreens were studied in relation to winter freezing tolerance in conifer needles (Chabot, Chabot, 1975; Jokela et al., 1998; Miroslavov, Koteyeva, 2002; Tanaka, 2007; Ovsyannikov, Koteyeva, 2020), stem cortical cells (Wisniewski, Ashworth, 1986; Sagisaka, Kuroda, 1991), ray parenchyma cells (Sauter et al., 1996), secondary phloem parenchyma (Pomeroy, Siminovitich, 1971). Most structural changes in differentiated cells are related to decrease of subcellular ice crystallization and subsequent dehydration; these include vacuole and endomembrane system restructuralization (Wisniewski, Ashworth, 1986). Photoprotective strategies in evergreen conifers involve seasonal chloroplast movement and thylakoid system reorganization decreasing damage by photoinhibition (Chabot, Chabot, 1975; Martin, Oquist, 1979; Miroslavov, Koteyeva, 2002; Ovsyannikov, Koteyeva, 2020). Seasonal chloroplast relocation was shown for *Picea* (Senser et al., 1975; Soikkeli, 1978), *Pinus* (Martin, Oquist, 1979; Soikkeli, 1980; Koteyeva, 2002), *Abies balsamea* (Chabot, Chabot, 1975), and *Taxus* (Miroslavov, Koteyeva, 2002; Tanaka, 2007). Specific winter arrangement of organelles differs significantly depending on species.

Most studies of plant cells are based on two-dimensional (2D) imaging, which provides incomplete or sometimes misleading information about the shape and position of organelles. This is especially important for cells that have an irregular shape. *Pinus* species have so-called lobed (also called armed or plicate) mesophyll cells; the function of lobes is thought to increase the surface area of the mesophyll and therefore facilitate the conduction of CO₂ to the chloroplasts (Wiebe, Al-Saadi, 1976). Only three-dimensional (3D) imaging can provide complete information on chloroplast distribution throughout the volume of a cell with a complex shape. This information is crucial for understanding of CO₂ and H₂O exchange that is limited by 3D network of resistance within leaf (Earles et al., 2019). In particular, spatial position of chloroplasts in relation to airspaces affects the mesophyll conductance and consequently CO₂ assimilation efficiency (Evans, 2021). Additionally, relocation of chloroplasts is a known photoprotective strategy documented as a reaction to high light (Kagawa, Wada, 1999) or

cold acclimation (Ovsyannikov, Koteyeva, 2020). The shape of chloroplasts is also subject to change including stromule formation and divisions that cannot be studied using 2D images (Yamane et al., 2020). This led us to investigate and reconsider dynamics of the pine chloroplast positioning, shape and ultrastructure using 3D methodologies.

In current study, a comparison was made on young Scotch pine plants grown out- and indoors under natural light and photoperiod to exclude the effect of low temperature. This allowed us to identify a main factor that contributes to structural responses of mesophyll cells during cold acclimation. The serial block-face scanning electron microscopy (SBF SEM) was applied to reveal the specific organelle positioning and their shape change at the three-dimensional level.

MATERIALS AND METHODS

8-year-old *Pinus sylvestris* L. plants were grown in the arboretum and greenhouse of Komarov Botanical Institute, St. Petersburg, Russia (59°94'51" N, 30°37'17" W, 1–5 m above sea level). For each accession, 50 individual plants were grown in soil outdoor and in 4 L pots with the same soil indoor. Greenhouse plants were watered every 2–3 days. Plants were grown during one year, with ~25/18°C day/night temperatures and a maximum mid-day PPFD of 1000 µmol photosynthetic quanta m⁻² s⁻¹ at sunny days. Material was collected monthly from February 1996 to February 1998, additionally samples were fixed during 2015–2017, 2021–2022 growth cycles from outdoors plants.

For light microscopy (LM) and transmission electron microscopy (TEM) middle parts of current- and 1-year-old needles (6 samples from 5 different plants per date) were fixed at 4°C in 2.5% (v/v) glutaraldehyde and 2% (v/v) paraformaldehyde in 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.2) and post fixed in 2% (w/v) OsO₄ at 4°C overnight. After dehydration in ethanol and acetone series samples were gradually infiltrated by a mixture of Araldite-Epon epoxy resins (Fluka, Buchs, Switzerland). Cross-sections were made using a Leica EM UC7 (Germany) ultramicrotome. For LM, semi-thin leaf sections (1 µm thick) were stained with 1% (w/v) Toluidine blue O in 1% (w/v) Na₂B₄O₇, and studied under the light microscope AxioScop.A1 (Zeiss, Germany). For TEM, ultrathin sections (~70 nm)

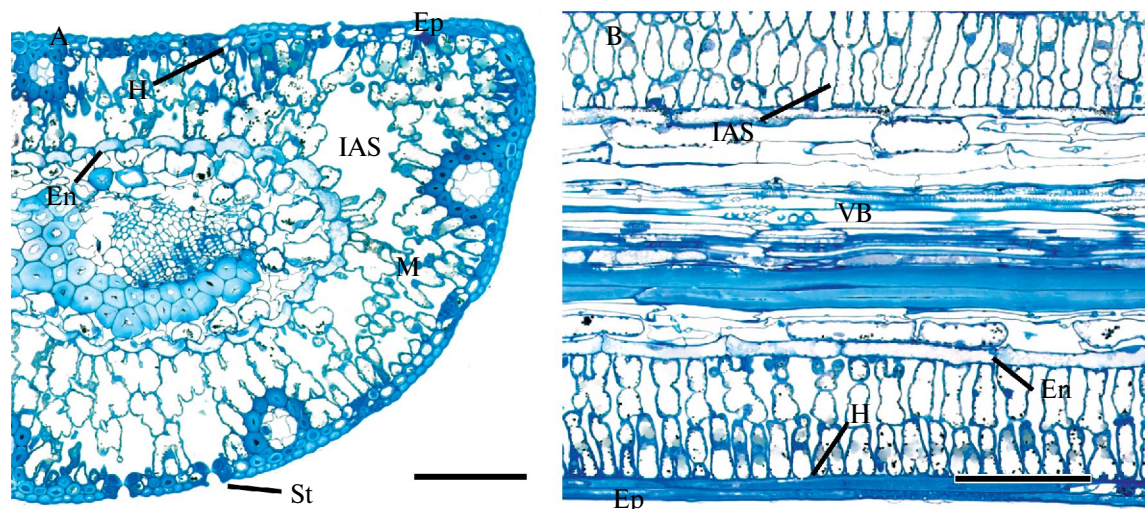


Fig. 1. General anatomy of *Pinus sylvestris* needles on cross (A) and longitudinal (B) sections, August. En – endodermis; Ep – epidermis; H – hypodermis; IAS – intercellular airspace; M – mesophyll; St – stomata; VB – vascular bundle. Scales: A, B, 150 μ m.

were stained with 2% (w/v) uranyl acetate followed by 2% (w/v) lead citrate. Zeiss Libra 120 transmission electron microscope (Oberkochen, Germany) was used for observation and photography.

For serial block-face scanning electron microscopy (SBF SEM) middle parts of needles were fixed at 4°C in 2.5% (v/v) glutaraldehyde in 150 mM Cacodylate buffer (pH 7.2) and post fixed in 2% (w/v) OsO_4 containing 1.5% potassium ferrocyanide (w/v) in 150 mM cacodylate buffer for 1 h on ice, followed by 1% thiocarbohydrazide solution in water for 20 min at room temperature (RT), then in 2% OsO_4 for 30 min at RT, after it in 1% uranyl acetate overnight at 4°C, and Walton's lead aspartate solution for 30 min at 60°C. After each step, the samples were rinsed in buffer or water 3 times for 5 min at RT. The samples were then dehydrated with graded series of ethanol and acetone, and were embedded in Epon epoxy resin (hard modification). Embedded samples were trimmed and mounted on aluminum specimen pin stubs using carbon tape and silver conductive epoxy resin H20E Epo-Tek, then, the samples were sputtered with 20 nm thick layer of gold or platinum. Samples were sectioned (100 nm thick) and imaged under a scanning electron microscope Volumescope2 (ThermoFisher, the Netherlands) with an accelerating voltage of 2.49 kV. Serial sections and image arrays for subsequent 3D reconstruction were acquired using Maps 3.9 and Amira 2020 3.1 software (ThermoFisher, The Netherlands). To specify the details of the position and shape of chloroplasts, each chloroplast was highlighted

with a different color during reconstruction. The methodology required pick out the outline of each chloroplast on each serial section using about 500 sections, each 100 nm thick. The curved lines in the images represent the outline of one section, giving them a stepped appearance.

RESULTS

General mesophyll anatomy

The mesophyll of *P. sylvestris* needles consists of two to three layers of chlorenchymatous cells when viewed in two-dimensional (2D) cross sections (Fig. 1, A). Mesophyll cells are usually lobed at the proximal and distal ends with deeper invaginations at the distal end; lateral sides of the cells are less invaginated. On longitudinal sections mesophyll cells often have a palisade-like outline with rare lobes (Fig. 1, B), suggesting that the lobes are oriented preferentially in one direction, perpendicular to the central axis of the needle (oriented radially to epidermis). Intercellular airspaces are well developed, but mesophyll cells are packed more loosely on longitudinal section creating files of cells (Fig. 1, A, B). The 3D reconstruction and longitudinal sections show that the cells are more irregularly shaped in the longitudinal plane than could be expected from the cross sections. Some single mesophyll cells extend from the hypodermis to the endodermis, indicating that the mesophyll is not strictly bilayered (Fig. 2). Such cells are bent in a tangential plane so that in cross sections only

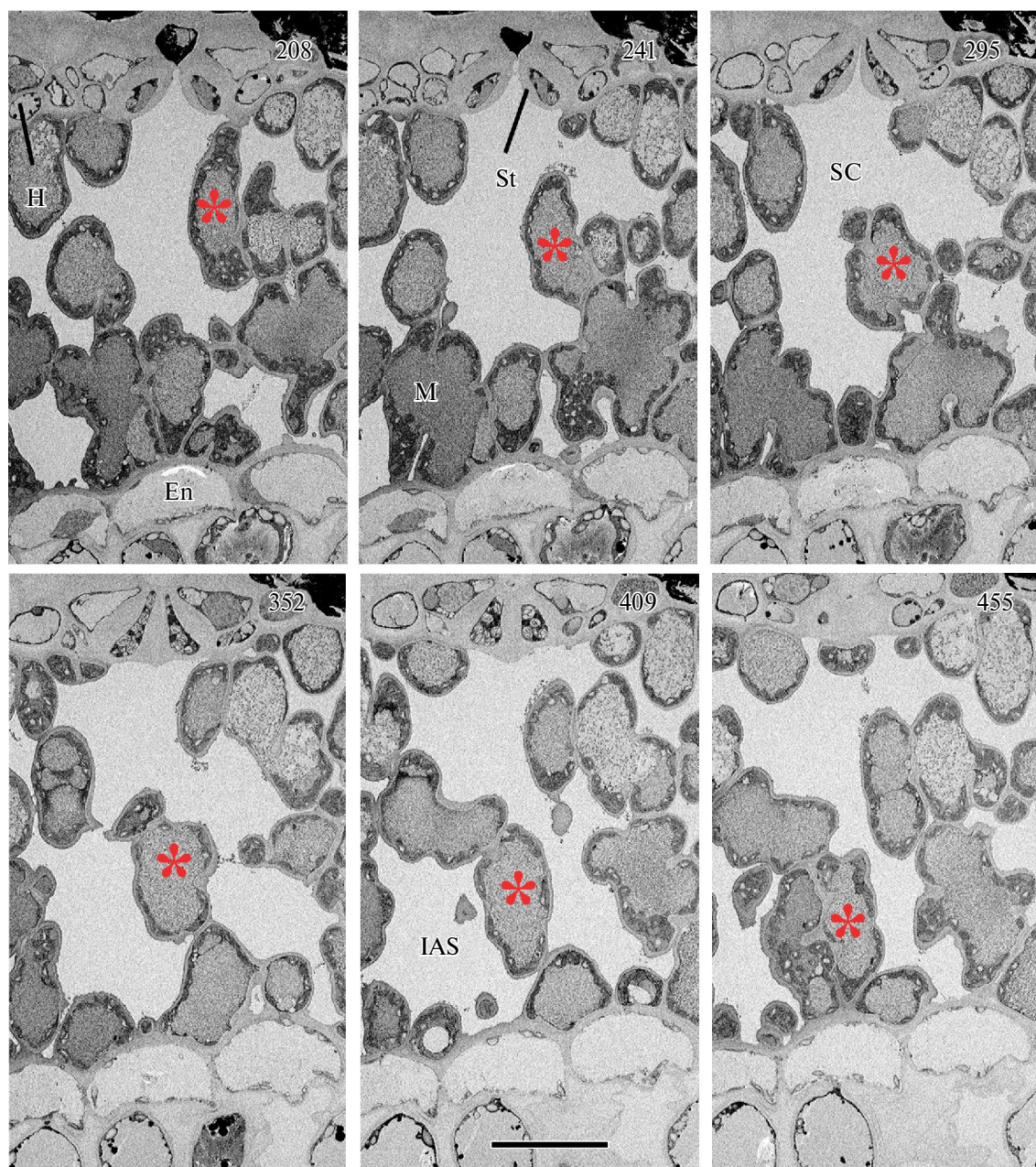


Fig. 2. Serial cross sections through mesophyll of *Pinus sylvestris* showing mesophyll cell extended from hypodermis to endodermis (labelled by red asterisk). The total number of sections is 351. The serial number of individual section is in the right corner of the image. En – endodermis; H – hypodermis; IAS – intercellular airspace; M – mesophyll cell; St – stomata. Scale: 50 μ m.

a part of the cell is visible. This is especially true for mesophyll cells around the substomatal cavity.

Mesophyll cell structure during growing season

In St. Petersburg, growing season lasts from April to November. At that time, 2D and 3D images show that mesophyll cells contain a large central vacuole with cytoplasm located parietally and nucleus located in central part of the cell inside of cytosolic strand (Fig. 3, A). Vacuole contains lipid droplets

and globular deposits (tannins). Chloroplasts are positioned along the cell walls covering the inner wall areas faced to airspaces more densely than those adjacent to other neighboring cells or folds of the cell wall. 3D images visualize chloroplasts as arranged tightly and having classical flatten-lens shape without protrusions (Fig. 4, B–D). Chloroplasts have well developed thylakoid system consisting of big grana and stromal thylakoids (Fig. 3, C). Mitochondria

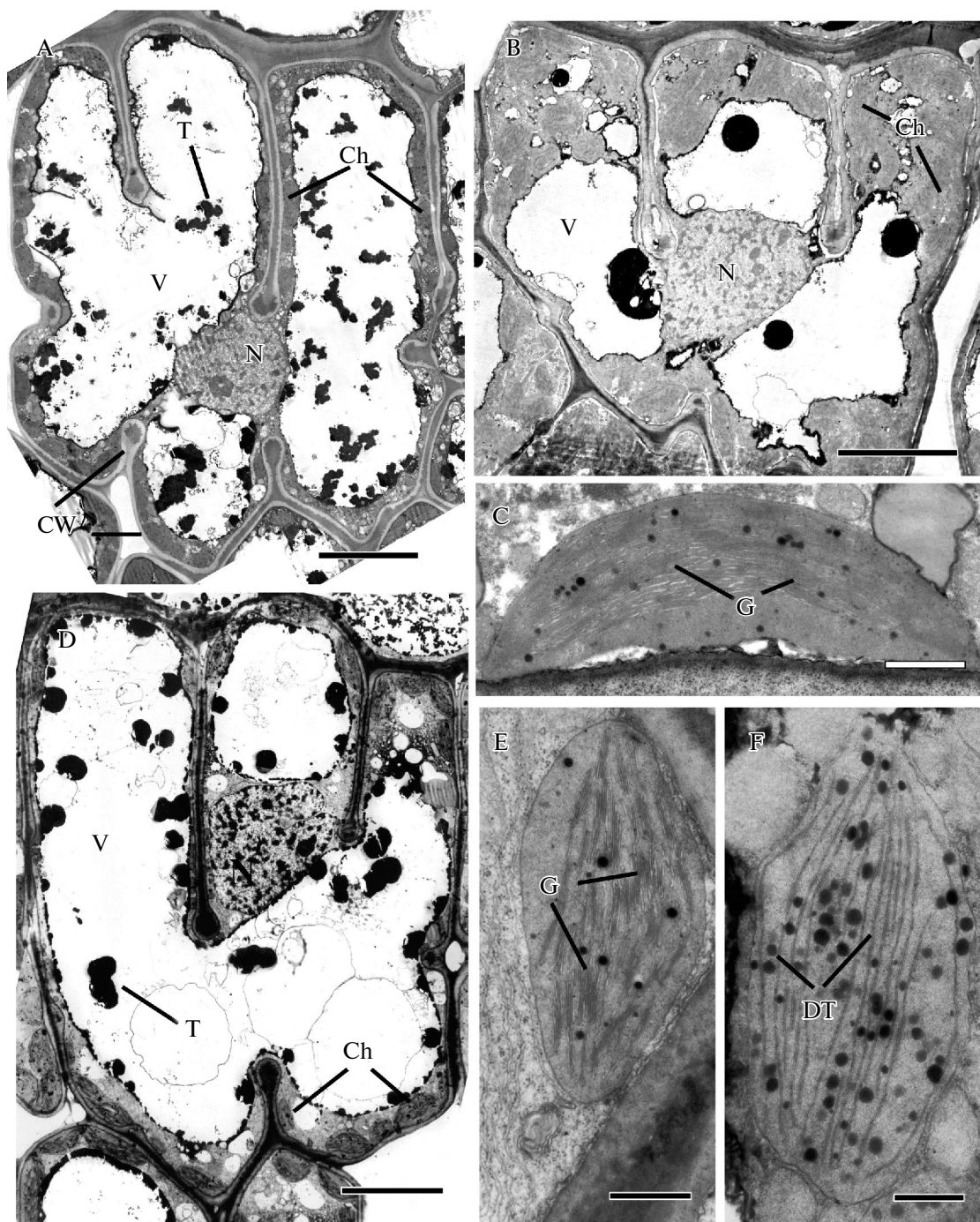


Fig. 3. Transmission electron microscopy of mesophyll cells in outdoor- (A–C, F) and indoor-grown (D, E) *Pinus sylvestris*. A, B, D. Cross sections in the midplane of a mesophyll cell in July (A) and February (B, D). C, E, F. Cross sections of chloroplasts in July (C) and February (E, F). Ch – chloroplasts; CW – cell wall; DT – doubled thylakoids; G – grana; N – nucleus; T – tannins; V – vacuole. Scales: A, B, D, 10 µm; C, E, 1 µm; F, 0.5 µm.

usually but not necessarily are associated with chloroplasts. Mesophyll cell ultrastructure is similar in plants grown out- and indoors.

Mesophyll cell structure during winter

Outdoors, the transition period of structural changes begins in October–November with a change

in the orientation of chloroplasts and their movement towards the distal and proximal ends of cells along the cell walls.

The typical “winter” cellular structure is observed in November–December and continues until March–April, depending on weather conditions. At this time,

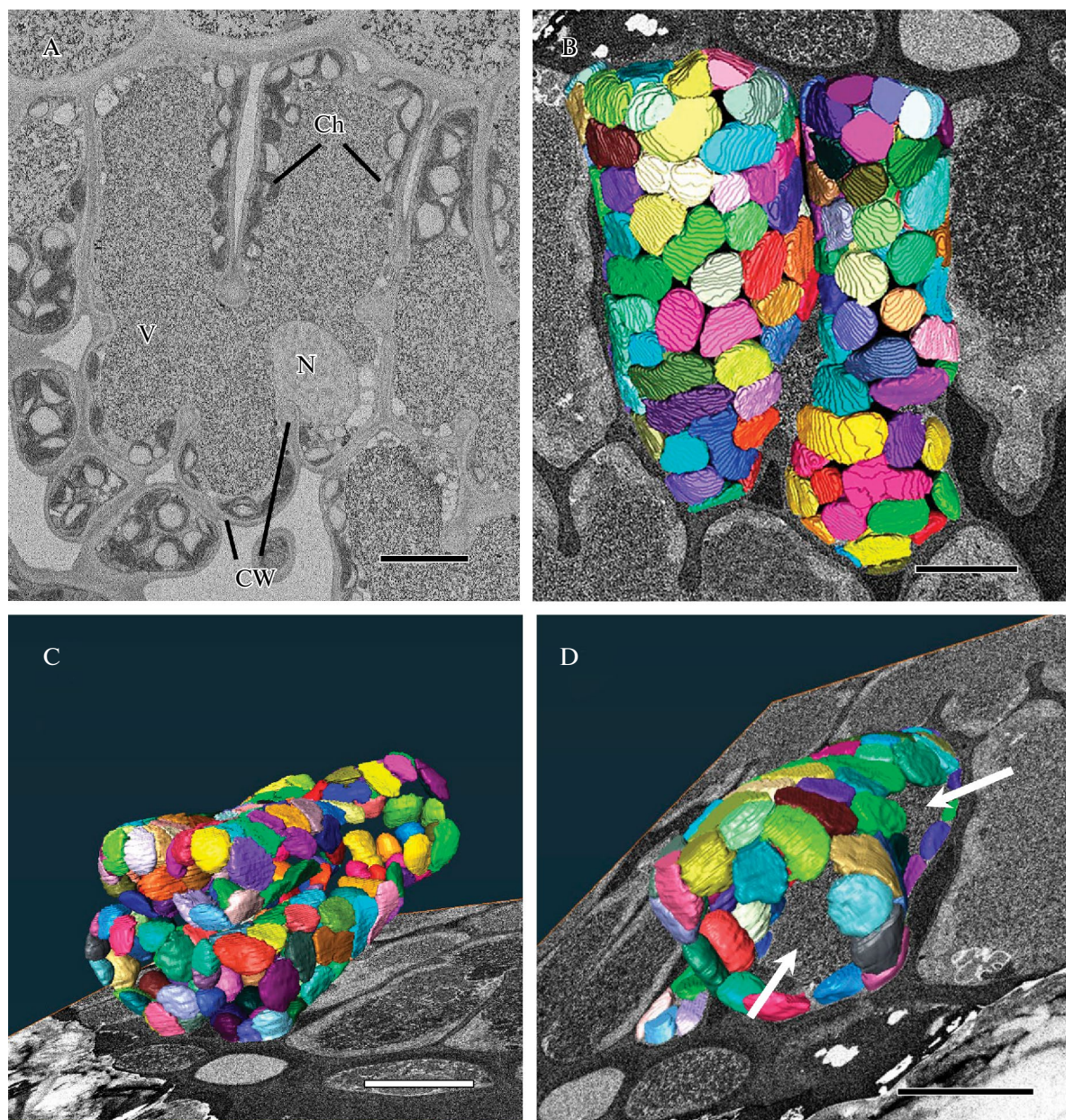


Fig. 4. 3D reconstruction of mesophyll cells of *Pinus sylvestris* during vegetation (May–October) period. A. Cross section in the midplane of the cell. B–D. 3D reconstruction of chloroplasts located along the cell wall showing “summer” positioning (cell wall is not presented on the reconstruction), view from the lateral side of the cell (B) and view from the hypodermis (C) showing absence of chloroplasts along the adjacent cell walls (arrows) (D). Ch – chloroplasts; CW – cell wall; N – nucleus; V – vacuole. Scales: A–D, 10 μ m.

the central vacuole decreases in size with increase of cytoplasm volume (Fig. 3, B, 5, A). The cisterns of rough endoplasmic reticulum disappear, but tubular elements of smooth endoplasmic reticulum appear. The number and size of lipid droplets located in the cytosol along the plasma membrane and in the vacuole increase (not shown). The general topography of organelles in the cell changes; they are randomly grouped in folds formed by cell wall invaginations (lobes) (Fig. 3, B, 5, A). Chloroplasts

are usually clumped close to each other contacting by envelopes. The volume of chloroplasts increase due to the increase of stroma. The thylakoid system maintains its integrity while it is reorganized with drastic reduction in the size of grana up to 2–3 thylakoids per grana (Fig. 3, F). Analysis of serial sections showed that doubled thylakoids have a large diameter (often extending through the entire chloroplast) and can be recognized as a round plates lying parallel to each other. Starch disappears.

On 2D sections, the chloroplasts are swollen with slightly undulated envelope. Some chloroplasts have thylakoid-free protrusions filled with stroma containing plastoglobuli. Roundish bodies, comparable in size to mitochondria and surrounded by a double-membrane envelope, are cross sections of these protrusions. 3D reconstructions confirm that most chloroplasts have extremely irregular shape with short (up to 3 μm) protrusions measuring 0.3–0.6 μm in diameter (Fig. 5, *B–D*). Outgrowths have similar diameter and usually tightly contacts with neighboring chloroplasts. Additionally, 3D view shows that mitochondria are not associated with individual chloroplasts and grouped together near the chloroplast conglomerates or in chloroplasts-free areas of cells (often near the nucleus).

In April, the restoration of the summer structure of mesophyll cells begins and the cells acquire a structure characteristic to the growing season to the end of May.

Indoors, no reorganization of mesophyll cell ultrastructure is detected. The general topography of the organelles in the cell remains unchanged: chloroplasts do not move into the folds formed by the outgrowths of the cell wall (Fig. 3, *D*). The endoplasmic reticulum is of a granular type. In contrast to natural conditions, the granal structure of chloroplasts remains practically unchanged, and starch grains do not disappear completely (Fig. 3, *E*).

DISCUSSION

Induction of seasonal structural changes

A comparative analysis of mesophyll cell structure in pine trees growing out- and indoors showed that low temperatures stimulate structural reorganization during autumn cold acclimation. It is low temperature that triggers a decrease in the volume of central vacuole, the development of tubular smooth endoplasmic reticulum, the reorganization of chloroplast thylakoid system, and the relocation of chloroplasts into the cell lobes. All changes in the structure are reversible and the summer structure is restored by the next growing season together with the increase of outdoor temperature. Using different experimental models, the contribution of temperatures to structural reorganization was shown for *Taxus cuspidata* mesophyll cells (Miroslavov, Koteyeva, 2002; Tanaka, 2007).

Low temperatures and short photoperiod with light quality shift are the main environmental signals that induce cold acclimation and cold hardiness including a range of physiological, structural and molecular responses (Öquist, Huner, 2003; Welling, Palva, 2006; Chang et al., 2021). However, cold acclimation events vary in timing, suggesting different contributions of climatic factors. It is believed that the short day characteristic to early autumn leads to cessation of growth and induces an initial dormancy, which is controlled by internal factors (Lloyd et al., 1996; Lee et al., 2017). The annual regularity in the day length change makes photoperiod the most reliable for initiating dormancy among the abiotic factors. In contrast, downregulation of photosynthesis, characteristic of evergreen trees, occurs later in autumn and is caused primarily by low temperatures. It was shown that onset of low temperatures triggers the decrease of the fluidity of the thylakoid membrane, inactivation of PSII reaction centers, reorganization of light harvesting complexes, inhibition of the regeneration of ribulose biphosphate and decreasing the efficiency of Rubisco carboxylation (Ottander et al., 1995; Vogg et al., 1998; Savitch et al., 2002; Crosatti et al., 2013; Brunkard et al., 2015; Fréchette et al., 2016). Here, we show that low temperatures induce structural reorganization of chloroplasts that are closely associated with decrease of photosynthetic activity and photoprotection.

Of course, the photosynthetic apparatus responds to seasonal changes in light intensity and decrease in day length (Fréchette et al., 2016). In particular, the pigment system is reorganized under short day (Vogg et al., 1998). However, retained chlorophyll captures light throughout the winter due to the structural rearrangements that increase the assimilative capacity of each photosynthetic unit (Vogg et al., 1998; Ensminger et al., 2006). The photosynthetic capacity is maintained even under low temperatures (Vogg et al., 1998). Maintaining the functioning of the energy donor tissues and continue photosynthesis to maximize the carbon gain over the longer period (as long as the temperature is favorable) seems to be beneficial for evergreen species in temperate zone.

Spatial structural organization of mesophyll cells and cold acclimation

Significant inaccuracy in 2D studies causes misunderstanding of organelle arrangement, especially when irregularly shaped chloroplasts overlap during

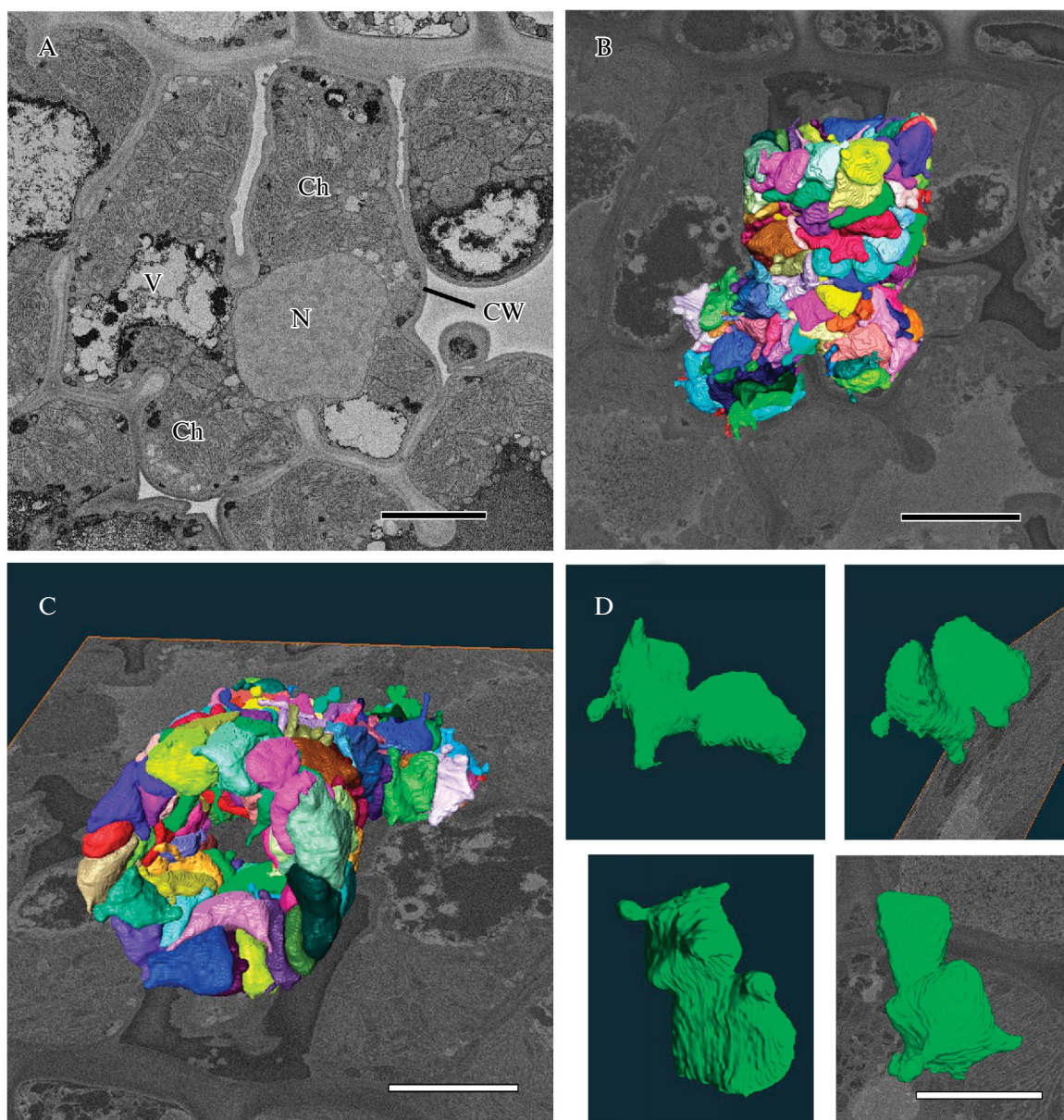


Fig. 5. 3D reconstruction of chloroplasts in mesophyll cells of *Pinus sylvestris* during winter (November–April). A. Cross section in the midplane of the cell. B, C. 3D reconstruction of chloroplasts grouped in one of the mesophyll cell lobe (cell wall is not presented on the reconstruction), view from the lateral side of the cell (B) and view from the hypodermis (C). D. 3D reconstruction of a single chloroplast viewed from different sides showing irregular shape and several protrusions. Ch – chloroplasts; CW – cell wall; N – nucleus; V – vacuole. Scales: A–C, 10 μ m; D, 5 μ m.

aggregations (Yamakawa et al., 2023) or there is special selective pattern of cellular organization (Ovsyannikov, Koteyeva, 2020). For example, in mesophyll cells of *Picea* species chloroplasts are located along two opposite radial cell walls facing the airspaces and are almost absent on the lateral sides. This mesophyll architecture results in the visual appearance of only a few chloroplasts in 2D cross section. Study of seasonal changes in mesophyll on 2D plane showed that chloroplasts are grouped together during winter (Senser

et al., 1975; Soikkeli, 1978). However, 3D reconstruction using light microscopic (LM) serial sections revealed more complex pattern of mesophyll winter structure in *Picea* species (Ovsyannikov, Koteyeva, 2020). The chloroplasts during cold acclimation moved towards the newly formed cytoplasmic strand that penetrated through the central vacuole in *P. pungens* or was attached to the radial cell wall in *P. obovata*, connecting two opposite sides of the cell. 3D view allowed also to reveal multiple vesicles involved in strand construction.

However, the cellular machinery of targeted chloroplast movement is still unknown.

To overcome the limitations of 2D TEM imaging, we applied SBF SEM techniques for 3D reconstruction of the pine mesophyll cell. In contrast to serial LM sections, SBF SEM allows to reveal intracellular organization at the ultrastructural level. Compared to basic TEM, sample preparation protocol for the SBF SEM includes additional heavy metal impregnation to increase the contrast of cell components. Conifers are considered difficult for sample preparation, even for TEM, due to high levels of tannins and thick cell walls (Soikkeli, 1980; Ebel et al., 1990). Protocol for the SBF SEM used in current study showed excellent conservation of the intracellular structure of pine mesophyll.

In general chloroplasts have a conservative lens-shaped shape, which is the most effective for light absorption, and this is exactly the shape that is characteristic of pine mesophyll in summer. 3D reconstructions of chloroplasts using SBF SEM revealed for the first time the complex shape with outgrowths of chloroplast envelope during winter time. Irregular plastid shape was described previously for the leucoplasts and was related to the synthesis and transport of secondary metabolites (Muravnik, 2021). It was suggested that the increase of surface area facilitates transmembrane exchange through the plastid envelope. For chloroplasts, as for most other types of plastids, dynamic stroma-filled tubular protrusions have been described (Hanson, Conklin, 2020). Chloroplast protrusions called stromules vary in length (up to 20 μm) and width (0.3–0.8 μm), and change their frequency in response to internal (Brunkard et al., 2015) and external signals including temperature (Holzinger et al., 2007). The exact function of stromules is unclear but it is suggested that they may be involved in transmitting signals from the chloroplast to other subcellular compartments (Brunkard et al., 2015). Since stromules were defined as stroma-filled tubes less than 0.8 μm in diameter to distinguish them from irregularly shaped plastids (Köhler, Hanson, 2000), chloroplast protrusions in *P. sylvestris* during the winter can be identified as stromules.

There are several reports of stromule involvement in chloroplast clustering around the nucleus, where chloroplast movement is directed by stromule/microtubule interactions (Hanson, Conklin, 2020). In the present study, chloroplast movement is

accompanied by change in shape, but multiple protrusions develop only after chloroplast aggregation is complete, and they have close contacts with neighboring chloroplasts, anchoring them to each other. It has also been shown in tobacco that stromules do not affect plastid motility (Kwok, Hanson, 2003). Although our results suggest the involvement of stromules in chloroplast interactions but not in chloroplast movement, further research is needed on the function of stromules in cold acclimation.

The architecture of thylakoid membranes is a highly dynamic system that quickly responds to changes in the environment, especially the light intensity (Kirchhoff, 2019). The combination of low temperature and high irradiation causes photoinhibition leading to the damage of photosynthetic machinery in winter (Öquist, Huner, 2003). Reorganization of thylakoid system with drastic decrease of the number of appressed membranes in grana found in pine chloroplasts during winter is related to the photoprotective strategy. Unstacking of granal thylakoids reduces photosystem II (PSII) that is located in grana, is more sensitive to photodamage (Andersson, Anderson, 1980) and facilitates protein turnover and photoprotective thermal dissipation (Öquist, Huner, 2003; Demmig-Adams et al., 2015). However, remaining PSII are photochemically active during the winter (Ottander et al., 1995) and can also dissipate absorbed energy, which may be important during unexpected winter thawing (Öquist, Huner, 2003). Thus, reorganization of chloroplast ultrastructure contributes to the protection and to the maintenance of the functional integrity of photosynthetic machinery during winter.

Chloroplast movement is a well known light-dependent reaction that provides more effective light absorption or protection from photodamage (Wada et al., 2003). Temperature-dependent chloroplast movement differs by the intracellular pattern of organelle arrangement during movement and after aggregation, as well as by reduction of leaf photosynthetic capacity (Ovsyannikov, Koteyeva, 2020). Seasonal change of chloroplast position has been reported for evergreen conifers suggesting similar photoprotective strategy of winter survival (Chabot, Chabot, 1975; Senser et al., 1975; Soikkeli, 1978; Martin, Oquist, 1979; Soikkeli, 1980; Koteyeva, 2002; Miroslavov, Koteyeva, 2002; Tanaka, 2007). Using *chloroplast unusual positioning 1 (chup1)* mutant of *Arabidopsis thaliana* it was shown that

chloroplast positioning is crucial for photosynthetic and metabolic acclimation to low temperature during cold acclimation (Kitashova et al., 2021). It was suggested that chloroplast grouping minimizes photooxidation by limiting light energy absorption (Tanaka, 2007). However, the precise physiological role of chloroplast aggregation in winter remains unclear and requires further experimental studies.

In summary, we provide the first 3D reconstruction of conifer mesophyll cell to show chloroplast shape and relocation during change of seasons using SBF SEM. We have shown that aggregation of chloroplasts is accompanied by the formation of protrusions of envelopes (stromules) involved in chloroplast interactions and anchoring them to each other. We definitely confirm that low temperature, rather than short photoperiod, is the trigger for chloroplast relocation and shape modification in mesophyll cells of *P. sylvestris*.

ACKNOWLEDGMENTS

Research was supported by the Russian Science Foundation (grant No. 22-24-01124). We are grateful to the Core Facility Center “Cell and Molecular Technologies in Plant Science” of Komarov Botanical Institute and Centre for Molecular and Cell Technologies of the Research Park of St. Petersburg State University for use of their facilities.

REFERENCES

- Andersson B., Anderson J.M. 1980. Lateral heterogeneity in the distribution of chlorophyll-protein complexes of the thylakoid membranes of spinach chloroplasts. — *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. — Bioenergetics. 593 (2): 427–440.
[https://doi.org/10.1016/0005-2728\(80\)90078-X](https://doi.org/10.1016/0005-2728(80)90078-X)
- Arora R., Taulavuori K. 2016. Increased risk of freeze damage in woody perennials VIS-À-VIS climate change: Importance of deacclimation and dormancy response. — *Frontiers in Environmental Science*. 4 (44).
<https://doi.org/10.3389/fenvs.2016.00044>
- Bigras F., Ryyppö A., Lindström A., Stattin E. 2001. Cold acclimation and deacclimation of shoots and roots of conifer seedlings. — In: *Conifer Cold Hardiness*. Tree Physiology. P. 57–88.
https://doi.org/10.1007/978-94-015-9650-3_3
- Brunkard J.O., Runkel A.M., Zambryski P.C. 2015. Chloroplasts extend stromules independently and in response to internal redox signals. — *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112 (32): 10044–10049.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1511570112>
- Chabot J., Chabot B. 1975. Developmental and seasonal patterns of mesophyll ultrastructure in *Abies balsamea*. — *Can. J. Bot.* 53 (3): 259–304.
<https://doi.org/10.1139/b75-037>
- Chang C.Y.-Y., Bräutigam K., Hüner N.P.A., Ensminger I. 2021. Champions of winter survival: cold acclimation and molecular regulation of cold hardiness in evergreen conifers. — *New Phytol.* 229 (2): 675–691.
<https://doi.org/10.1111/nph.16904>
- Crosatti C., Rizza F., Badeck F.W., Mazzucotelli E., Cativelli L. 2013. Harden the chloroplast to protect the plant. — *Physiol. Plant.* 147 (1): 55–63.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01689.x>
- Demmig-Adams B., Cohu C.M., Muller O., Adams W.W. 2012. Modulation of photosynthetic energy conversion efficiency in nature: from seconds to seasons. — *Photosynth. Res.* 113 (1): 75–88.
<https://doi.org/10.1007/s11120-012-9761-6>
- Demmig-Adams B., Muller O., Stewart J.J., Cohu C.M., Adams W.W. 2015. Chloroplast thylakoid structure in evergreen leaves employing strong thermal energy dissipation. — *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 152: 357–366.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.03.014>
- Duman J.G., Wisniewski M.J. 2014. The use of antifreeze proteins for frost protection in sensitive crop plants. — *Environ. Exp. Bot.* 106: 60–69.
<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.01.001>
- Earles J.M., Buckley T.N., Brodersen C.R., Busch F.A., Cano F.J., Choat B., Evans J.R., Farquhar G.D., Harwood R., Huynh M., John G.P., Miller M.L., Rockwell F.E., Sack L., Scoffoni C., Struik P.C., Wu A., Yin X., Barbour M.M. 2019. Embracing 3D complexity in leaf carbon–water exchange. — *Trends Plant Sci.* 24 (1): 15–24.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.09.005>
- Ebel B., Hamelmann U., Nieß C. 1990. A rapid preparation method for ultrastructural investigations of conifer needles. — *J. Microsc.* 160 (1): 67–74.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1990.tb03048.x>
- Ensminger I., Busch F., Hüner N.P.A. 2006. Photostasis and cold acclimation: sensing low temperature through photosynthesis. — *Physiol. Plant.* 126 (1): 28–44.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00627.x>
- Ensminger I., Berninger F., Streb P. 2012. Response of photosynthesis to low temperature. — In: *Terrestrial Photosynthesis in a Changing Environment: A Molecular, Physiological, and Ecological Approach*. Cambridge. P. 272–289.
<https://doi.org/10.1017/CBO9781139051477.022>
- Evans J.R. 2021. Mesophyll conductance: walls, membranes and spatial complexity. — *New Phytol.* 229 (4): 1864–1876. <https://doi.org/10.1111/nph.16968>
- Fréchette E., Chang C.Y., Ensminger I. 2016. Photoperiod and temperature constraints on the relationship between the photochemical reflectance index and the light use

- efficiency of photosynthesis in *Pinus strobus*. — Tree Physiol. 36 (3): 311–324.
<https://doi.org/10.1093/treephys/tpv143>
- Gusta L.V., Wisniewski M. 2013. Understanding plant cold hardiness: an opinion. — Physiologia Plantarum. 147 (1): 4–14. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01611.x>
- Guy C.L. 1990. Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism. — Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 41: 187–223.
<https://doi.org/10.1146/annurev.pp.41.060190.001155>
- Hanson M.R., Conklin P.L. 2020. Stromules, functional extensions of plastids within the plant cell. — Curr. Opin. Plant Biol. 58: 25–32.
<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2020.10.005>
- Holzinger A., Buchner O., Lütz C., Hanson M.R. 2007. Temperature-sensitive formation of chloroplast protrusions and stromules in mesophyll cells of *Arabidopsis thaliana*. — Protoplasma. 230 (1): 23–30.
<https://doi.org/10.1007/s00709-006-0222-y>
- Howe G.T., Davis J., Jeknic Z., Chen T.H.H., Frewen B., Bradshaw H.D.J., Saruul P. 1997. Physiological and genetic approaches to studying endodormancy-related traits in *Populus*. — Hortscience. 34 (7): 1174–1184.
<https://doi.org/10.21273/HORTSCI.34.7.1174b>
- Jian L.C., Li J.H., Li P.H. 2000. Seasonal alteration in amount of Ca^{2+} in apical bud cells of mulberry (*Morus bombycis* Koidz): an electron microscopy cytochemical study. — Tree Physiol. 20: 623–628.
<https://doi.org/10.1093/treephys/20.9.623>
- Jian L.C., Li P.H., Sun L.H., Chen T.H.H. 1997. Alterations in ultrastructure and subcellular localization of Ca^{2+} in poplar apical bud cells during the induction of dormancy. — J. Exp. Bot. 48 (311): 1195–1207.
<https://doi.org/10.1093/jxb/48.6.1195>
- Jokela A., Sarjala T., Huttunen S. 1998. The structure and hardening status of Scots pine needles at different potassium availability levels. — Trees — Structure and Function. 12: 490–498.
<https://doi.org/10.1007/s004680050179>
- Kagawa T., Wada M. 1999. Chloroplast-avoidance response induced by high-fluence blue light in prothallial cells of the fern *Adiantum capillus-veneris* as analyzed by microbeam irradiation. — Plant Physiol. 119 (3): 917–924. <https://doi.org/10.1104/pp.119.3.917>
- Kirchhoff H. 2019. Chloroplast ultrastructure in plants. — New Phytol. 223 (2): 565–574.
<https://doi.org/10.1111/nph.15730>
- Kitashova A., Schneider K., Fürtauer L., Schröder L., Scheibenbogen T., Fürtauer S., Nägele T. 2021. Impaired chloroplast positioning affects photosynthetic capacity and regulation of the central carbohydrate metabolism during cold acclimation. — Photosynth. Res. 147 (1): 49–60.
<https://doi.org/10.1007/s11120-020-00795-y>
- Köhler R.H., Hanson M.R. 2000. Plastid tubules of higher plants are tissue-specific and developmentally regulated. — J. Cell Sci. 113 (Pt1): 81–89.
<https://doi.org/10.1242/jcs.113.1.81>
- Koteyeva N.K. 2002. Patterns of seasonal rhythmicity in ultrastructure of shoot apical meristem and mesophyll cells in *Pinus sylvestris* (Pinaceae). — Bot. Zhurn. 87 (11): 50–60.
- Kwok E.Y., Hanson M.R. 2003. Microfilaments and microtubules control the morphology and movement of non-green plastids and stromules in *Nicotiana tabacum*. — Plant J. 35 (1): 16–26.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01777.x>
- Lee Y., Karunakaran C., Lahlali R., Liu X., Tanino K.K., Olsen J.E. 2017. Photoperiodic regulation of growth-dormancy cycling through induction of multiple bud-shoot barriers preventing water transport into the winter buds of Norway spruce. — Frontiers in Plant Science. 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02109>
- Li C., Junttila O., Palva E.T. 2004. Environmental regulation and physiological basis of freezing tolerance in woody plants. — Acta Physiol. Plant. 26 (2): 213–222.
<https://doi.org/10.1007/s11738-004-0010-2>
- Lloyd A.D., Mellerowicz E.J., Riding R.T., Little C.H.A. 1996. Changes in nuclear genome size and relative ribosomal RNA gene content in cambial region cells of *Abies balsamea* shoots during the development of dormancy. — Can. J. Bot. 74 (2): 290–298.
<https://doi.org/10.1139/b96-035>
- Martin B., Oquist G. 1979. Seasonal and experimentally induced changes in the ultrastructure of chloroplasts of *Pinus sylvestris*. — Physiol. Plant. 46 (1): 42–49.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1979.tb03183.x>
- Maurya J.P., Bhalerao R.P. 2017. Photoperiod- and temperature-mediated control of growth cessation and dormancy in trees: a molecular perspective. — Ann. Bot. 120 (3): 351–360.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcx061>
- Miroslavov E., Koteyeva N. 2002. Characteristic of seasonal dynamics of mesophyll cell ultrastructure in *Taxus cuspidata* (Taxaceae) grown out- and indoors. — Bot. Zhurn. 87: 40–49.
- Muravnik L.E. 2021. The structural peculiarities of the leaf glandular trichomes: a review. — In: Plant Cell and Tissue Differentiation and Secondary Metabolites: Fundamentals and Applications. Cham. P. 63–97.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-30185-9_3
- Öquist G., Huner N.P.A. 2003. Photosynthesis of overwintering evergreen plants. — Annu. Rev. Plant Biol. 54 (1): 329–355.
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.072402.115741>
- Ottander C., Campbell D., Öquist G. 1995. Seasonal changes in photosystem II organisation and pigment composition in *Pinus sylvestris*. — Planta. 197 (1): 176–183.
<https://doi.org/10.1007/BF0023995>
- Ovsyannikov A.Y., Koteyeva N.K. 2020. Seasonal movement of chloroplasts in mesophyll cells of two *Picea* species. — Protoplasma. 257 (1): 183–195.
<https://doi.org/10.1007/s00709-019-01427-6>
- Pomeroy M.K., Siminovitch D. 1971. Seasonal cytological changes in secondary phloem parenchyma cells in

- Robinia pseudoacacia* in relation to cold hardiness. — Can. J. Bot. 49 (5): 787–795.
https://doi.org/10.1139/b71-118
- Sagisaka S., Kuroda H. 1991. Changes in the ultrastructure of plastids after breaking of dormancy in perennials. — Agric. Biol. Chem. 55 (6): 1671–1673.
https://doi.org/10.1080/00021369.1991.10870811
- Sauter J.J., Wisniewski M.E., Witt W. 1996. Interrelationships between ultrastructure, sugar levels, and frost hardiness of ray parenchyma cells during frost acclimation and deacclimation in poplar (*Populus x canadensis* Moench [Robusta]) wood. — J. Plant Physiol. 149: 451–461.
https://doi.org/10.1016/S0176-1617(00)80239-4
- Savitch L.V., Leonardos E.D., Krol M., Jansson S., Grodzinski B., Huner N.P.A., Öquist G. 2002. Two different strategies for light utilization in photosynthesis in relation to growth and cold acclimation. — Plant Cell Environ. 25 (6): 761–771.
https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2002.00861.x
- Senser M., Schötz F., Beck E. 1975. Seasonal changes in structure and function of spruce chloroplasts. — Planta. 126 (1): 1–10. https://doi.org/10.1007/BF00389354
- Soikkeli S. 1978. Seasonal changes in mesophyll ultrastructure of needles of Norway spruce (*Picea abies*). — Can. J. Bot. 56 (16): 1932–1940.
https://doi.org/10.1139/b78-231
- Soikkeli S. 1980. Ultrastructure of the mesophyll in Scots pine and Norway spruce seasonal variation and molarity of the fixative buffer. — Protoplasma. 103 (3): 241–252. https://doi.org/10.1007/BF01276270
- Steponkus P.L. 1984. Role of plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. — Annu. Rev. Plant Physiol. 35: 543–584.
https://doi.org/10.1146/annurev.pp.35.060184.002551
- Tanaka A. 2007. Photosynthetic activity in winter needles of the evergreen tree *Taxus cuspidata* at low temperatures. — Tree Physiol. 27 (5): 641–648.
https://doi.org/10.1093/treephys/27.5.641
- Thomashow M.F. 1999. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. — Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 50: 571–599.
https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.571
- Uemura M., Tominaga Y., Nakagawara C., Shigematsu S., Minami A., Kawamura Y. 2006. Responses of the plasma membrane to low temperatures. — Physiol. Plant. 126 (1): 81–89. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2005.00594.x
- Vogg G., Heim R., Gotschy B., Beck E., Hansen J. 1998. Frost hardening and photosynthetic performance of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). II. Seasonal changes in the fluidity of thylakoid membranes. — Planta. 204: 201–206. https://doi.org/10.1007/s004250050246
- Wada M., Kagawa T., Sato Y. 2003. Chloroplast movement. — Annu. Rev. Plant Biol. 54: 455–468.
https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.135023
- Welling A., Palva E.T. 2006. Molecular control of cold acclimation in trees. — Physiol. Plant. 127 (2): 167–181.
https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00672.x
- Wiebe H.H., Al-Saadi H.A. 1976. The role of invaginations in armed mesophyll cells of pine needles. — New Phytol. 77 (3): 773–775.
https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1976.tb04673.x
- Wisniewski M., Ashworth E.N. 1986. A comparison of seasonal ultrastructural changes in stem tissues of peach (*Prunus persica*) that exhibit contrasting mechanisms of cold hardiness. — Botanical Gazette. 147 (4): 407–417. https://doi.org/10.1086/337608
- Wisniewski M., Nassuth A., Arora R. 2018. Cold hardiness in trees: A mini-review. — Frontiers in Plant Science. 9 (1394).
https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01394
- Xin Z., Browse J. 2000. Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures. — Plant Cell Environ. 23 (9): 893–902.
https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2000.00611.x
- Yamakawa S., Kato Y., Taniguchi M., Oi T. 2023. Intracellular positioning of mesophyll chloroplasts following to aggregative movement in *Setaria viridis* analysed three-dimensionally with a confocal laser scanning microscope. — Flora. 306: 152364.
https://doi.org/10.1016/j.flora.2023.152364
- Yamane K., Oi T., Taniguchi M. 2020. Three-dimensional analysis of chloroplast protrusion formed under osmotic stress by polyethylene glycol in rice leaves. — Plant Prod. Sci. 23 (2): 160–171.
https://doi.org/10.1080/1343943X.2019.1709513

ДВИЖЕНИЕ ХЛОРОПЛАСТОВ В КЛЕТКАХ МЕЗОФИЛЛА *PINUS SYLVESTRIS* (PINACEAE) ИНИЦИИРУЕТСЯ НИЗКОЙ ТЕМПЕРАТУРОЙ: SBF SEM 3D-РЕКОНСТРУКЦИЯ

Н. К. Котеева^{1,*}, А. Н. Иванова^{1,2}, Т. А. Борисенко^{1,2}, М. С. Тарасова^{1,2},
О. Е. Миргородская¹, Е. В. Вознесенская¹

¹Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН
ул. Проф. Попова, 2, Санкт-Петербург, 197022, Россия

²Санкт-Петербургский государственный университет
Университетская наб., 7–9, Санкт-Петербург, 199034, Россия
*e-mail: nkoteyeva@binran.ru

Вечнозеленые виды умеренной зоны приспосабливаются к сезонному климату за счет реорганизации структуры клеток мезофилла, включая передвижение хлоропластов как фотозащитную реакцию. Однако фактор, вызывающий структурные изменения, до сих пор остается неизученным. С целью выявления особенностей расположения хлоропластов в течение годового цикла и влияния температуры на их движение было изучено строение клеток мезофилла *Pinus sylvestris*, выращиваемых в открытом и закрытом грунте. Серийная блочная сканирующая электронная микроскопия (SBF SEM) использовалась для трехмерной реконструкции клеток мезофилла, чтобы показать пространственное положение и изменение формы хлоропластов. Выявлено, что в течение вегетационного периода хлоропласты имеют хорошо развитую тилакоидную систему, располагаются вдоль клеточной стенки и занимают преимущественно ту часть клеточной стенки, которая обращена к межклетникам. Движение хлоропластов начинается в октябре–ноябре, а зимой они группируются в складках клеток мезофилла. В это время тилакоидная система перестраивается и состоит преимущественно из длинных сдвоенных тилакоидов и мелких гран. 3D-реконструкция показывает, что хлоропласты ориентированы в случайном порядке, увеличивают объем стромы и образуют множественные выпячивания, заполненные стромой, которые можно распознать как стромулы. У растений, выращенных в условиях оранжереи, сезонная реорганизация ультраструктуры мезофилла не происходит, что позволяет предположить, что именно низкие температуры, но не фотопериод и качество света, индуцируют сезонное движение хлоропластов в мезофилле *P. sylvestris*. Мы подтверждаем, что 3D-реконструкция является мощным инструментом в изучении изменений положения и формы хлоропластов, вызванных низкой температурой.

Ключевые слова: *Pinus sylvestris*, мезофилл, движение хлоропластов, сезонные изменения, низкие температуры, 3D-реконструкция

СООБЩЕНИЯ

РАСПРОСТРАНЕНИЕ И ОСОБЕННОСТИ БИОЛОГИИ
MAGADANIA OLAËNSIS (APIACEAE)

© 2024 г. О. А. Мочалова^{1,*}, М. Г. Хорева^{1,**}, Е. А. Андриянова¹

Институт биологических проблем Севера ДВО РАН

ул. Портовая, 18, Магадан, 685000, Россия

*e-mail: mochalova@inbox.ru

**e-mail: mkhoreva@ibpn.ru

Поступила в редакцию 28.03.2023 г.

После доработки 24.11.2023 г.

Принята к публикации 05.12.2023 г.

Приведены сведения о распространении в Магаданской области, фитоценотической приуроченности и некоторых особенностях биологии *Magadania olaënsis* (Gorovoi et N.S. Pavlova) Pimenov et Lavrova — редкого вида, включенного в Красную книгу РФ, представителя олиготипного рода *Magadania*, эндемичного для севера Дальнего Востока России. Выявлена площадь ареала вида, составляющая около 390 км², подготовлена карта его распространения, дана оценка численности (примерно 4–8.5 тыс. экземпляров). Охарактеризованы биология и сезонный ритм развития *M. olaënsis* — многолетнего монокарпика, для которого характерна нестабильная семенная продуктивность. Семена прорастают только после длительной стратификации. Описаны местообитания и основные растительные сообщества, в которых вид произрастает. Даны рекомендации по мерам охраны *M. olaënsis*.

Ключевые слова: охраняемый вид, эндемичный род, *Magadania olaënsis*, численность популяций, ареал, Магаданская область, Дальний Восток России, Красная книга РФ

DOI: 10.31857/S0006813624010032, EDN: FBRBVJ

Magadania olaënsis (Gorovoi et N.S. Pavlova) Pimenov et Lavrova — редкий эндемичный вид, занесенный в Красную книгу Российской Федерации¹, а также в региональные Красные Книги Магаданской области и Хабаровского края (Krasnaya..., 2019a, b). Ранее был включен в первое издание Красной книги Российской Федерации (Krasnaya..., 2008b) и Красную книгу РСФСР (Krasnaya..., 1988).

M. olaënsis был описан как *Cnidium olaëns* Gorovoi et N.S. Pavlova сравнительно недавно, по сборам 1970 г. (Gorovoy, Pavlova, 1972). Этот вид — представитель олиготипного рода *Magadania*, эндемичного для России, который состоит из 2 видов, ранее относившихся к довольно удаленным родам *Cnidium* и *Conioselinum* (*C. victoris*

Schischk. = *Magadania victoris* (Schischk.) M. Pimenov et Lavrova). Статус рода *Magadania* и близость 2 входящих в него видов были подтверждены как морфологически, так и результатами молекулярных исследований (секвенирования nrDNAITS) (Valiejo-Roman et al., 2006). Название рода *Magadania* дано исходя из географической специфики видов, это единственный род зонтичных, эндемичный для России (Pimenov, Ostroumova, 2012).

Род *Magadania* с двумя видами принадлежит к охотоморской географической группе эндемиков, генезис которой связан с охотским сектором российского Дальнего Востока (РДВ). Охотский центр эндемизма — один из наиболее мощных и хорошо оформившихся. Специфической его особенностью служит присутствие единственного эндемичного для Дальнего Востока рода *Magadania*, ядро формируют эндемики из тауйско-гижигинской и тауйско-удской подгрупп. Роды *Magadania*, а также *Microbiota* и

¹ Приказ Министерства природных ресурсов и экологии РФ № 320 от 23.05.2023 “Об утверждении Перечня объектов растительного мира, занесенных в Красную книгу Российской Федерации”.



Рис. 1. Фотография типового образца *Magadania olaënsis* из Гербария ФНЦ Биоразнообразия (VLA00000678).

Fig. 1. Photo of the type specimen of *Magadania olaënsis* from the Herbarium of Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity (VLA00000678).

Acelidanthus отнесены к числу наиболее древних эндемичных родов флоры РДВ (Kozhevnikov, 2007).

Систематика и особенности морфологии вида и рода подробно охарактеризованы (Gorovoу, Pavlova, 1972; Pimenov, Lavrova, 1985; Pimenov, Ostroumova, 2012). Изучена микроморфология плодов *Magadania olaënsis* и *M. victoris*: к новым диагностическим признакам для плодов этого рода отнесены крупные выпуклые клетки

экзокарпа (Ostroumova, 2018). Нами выявлены новые местонахождения *M. olaënsis* (Mochalova et al., 2022). Однако опубликованные данные о распространении и экологии *M. olaënsis* достаточно скудны, а современная информация приводится только в региональных Красных книгах (Krasnaya..., 2008a, c; 2019a, b). В связи с подготовкой нового издания Красной книги РФ мы приводим актуальную информацию о распространении, биологии, фитоценотической приуроченности, численности популяций

Magadania olaënsis на территории Магаданской области.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Район исследований расположен в южной части Магаданской области между 59°10' и 60°45' с.ш. в Ольском, Тенькинском и Хасынском административных районах. Большая часть территории находится на Охотско-Колымском водоразделе в бассейне верхнего течения р. Олы, меньшая — на северо-западном побережье и островах Тауйской губы.

По флористическому районированию области (Flora..., 2010) территория входит в состав Охотско-Колымского и Охотского флористических районов.

В геологическом отношении район исследования расположен в пределах Приохотского сектора Охотско-Чукотского вулканического пояса. В районе мысов Кир и Харбиз (близ Атарганской косы) склоны сложены вулканогенными и вулканогенно-осадочными отложениями. По береговым обнажениям представлены субвулканические образования из базальтов с прослоями андезитов, туфов, пород раннемеловой мелдэкской толщи. Большая часть территории Ольского плато представлена базальтами мыгдыкитской свиты и андезибазальтами, заполняющими крупную вулканотектоническую структуру площадью около 600 км² (Ivanov, Malakhova, 2014; Geologicheskies..., 2021).

Климат Ольского плато в литературе не охарактеризован, поэтому приведем данные для континентальной части Хасынского района по данным ГМС “Талая”. Это территория с морозной зимой, тёплым летом и значительным количеством осадков. Средняя годовая температура воздуха составляет –11.4°C, средняя месячная температура января — –34.3°C, июля — +13.5°C. Годовое количество осадков — 449 мм, среднее количество осадков в январе — 32 мм, в июле — 79 мм. Безморозный период продолжается в среднем 48 дней, а максимум — 74 дня. Первый заморозок в воздухе приходится в среднем на 10 августа, последний — на 22 июня. Снежный покров неравномерный, средняя годовая высота снежного покрова составляет 69 см, снег сходит обычно к началу июня (Klugin, 1970). На Ольском плато гораздо

раньше, чем на близлежащих территориях, выпадает снег, а сила ветра значительно выше.

Климат побережья Тауйской губы морской и умеренно континентальный, для территории свойственны избыточное увлажнение, холодное лето, снежная зима. Продолжительность зимнего периода около 5 месяцев (ноябрь — март), а летнего периода — не более 3 месяцев. Средняя температура воздуха самого теплого месяца — июля — +10...+12°C, для лета характерны частые туманы, сумма осадков за летний период 280–330 мм. Зимы снежные, средняя температура января — –22...–26°C, снежный покров неравномерный из-за ветрового перераспределения. Годовое количество осадков — 400–500 мм, средняя высота снежного покрова — 60–70 см (Klugin, 1970; Zamoshch, 2006).

По агроклиматическому районированию (Khlynovskaya, 1981) и Ольское плато, и Атарган отнесены к лесотундровым ландшафтам с суммой температур 1000–800°C за период со среднесуточной температурой воздуха выше +5°C. При этом сумма температур на склонах южной экспозиции составляет 1000–1200°C, а на склонах северной — 600–800°C.

Полевые работы с целью изучения ареала, условий произрастания, фенологических дат проводились маршрутным методом, также описывалась растительность на участках с высокой численностью вида. Работы на Ольском плато проводились в 2010, 2011, 2017, 2019, 2020 гг. в течение 1–2 недель за сезон, в окрестностях Атарганской косы — в 2012, 2013, 2016, 2017 и 2020 гг. в течение 1–2 кратковременных поездок за сезон. Экспедиции на острова предпринимались в 2009, 2010 и 2013 гг. Кроме того, в 2019–2022 гг. обследовались сходные по геологическим породам участки Охотско-Колымского водораздела с целью поиска новых местонахождений вида.

На маршрутах картировались местонахождения *Magadania olaënsis* с использованием GPS-навигатора, а также места концентрации этого вида. Численность популяций оценивалась путем подсчета особей в местах концентрации с последующим пересчетом на площадь подходящих местообитаний. Поскольку растения произрастают обычно поодиночке, площадки не закладывались, оценивалась площадь, приходящаяся в среднем на одно растение. Основные исследования проводились на Ольском

плато, где располагается 95% площади ареала (Хасынский и Тенькинский районы), а также на побережье Тауйской губы в 7–20 км восточнее пос. Ола — окрестности Атарганской косы и мысов Кир и Харбиз (Ольский район).

Для определения семенной продуктивности на ключевом участке на склоне юго-западной экспозиции в основании Атарганской косы собирались созревшие семена в сентябре 2012 г. (15 растений) и 2016 г. (15 растений), а также в августе 2020 г. (10 растений). После подсчета семенной продуктивности диаспоры возвращались в природу. В 2017 г. на этом участке не было отмечено цветущих и плодоносящих растений, несмотря на целенаправленные поиски. Семенная продуктивность оценивалась по методике, предложенной Е.А. Ходачек (Khodachek, 1996): определялись условно-реальная (УРСП) — общее количество семян, включая незрелые, щуплые и поврежденные, в среднем на одно растение (у *M. olaënsis* это, как правило, одно соплодие с вызревшими семенами) — и реальная семенная продуктивность (РСП) — количество вызревших семян, а также коэффициент созревания как процент вызревших семян. Семена для определения всхожести были собраны на Ольском плато 31.08.2011, затем, после 3 и 8.5 месяца хранения при +18...+20°C проращивались на фильтровальной бумаге в чашках Петри в четырех повторностях по 25 штук в разных вариантах: 1) после 3 месяцев хранения семена проращивались при +18...+20°C в течение 5 месяцев; 2) при +5°C в течение 5 месяцев, затем при +18...+20°C в течение 3.5 месяца, при +5°C в течение 4 месяцев и затем при +18...+20°C в течение 1 месяца. Второй вариант был применен после того, как семена не проросли при +18...+20°C, а после стратификации в течение 5 месяцев при +5°C всхожесть была низкой. Статистическая обработка данных проводилась в программе Microsoft Excel 2010.

Названия видов сосудистых растений приведены по IPNI (International Plant Name Index).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Номенклатура, типовые образцы. *Magadania olaënsis* (Gorovoi et N.S. Pavlova) Pimenov et Lavrova, 1985, Бот. журн. 70(4): 532; Пименов, 1987, Сосуд. раст. сов. Дальн. Вост. 2: 246; Фл. и раст.

Магад. обл., 2010: 194; Пименов, Остроумова, 2012, Зонтичные (Umbeliferae) России: 240. — *Cnidium olaëns* Gorovoi et N.S. Pavlova, 1972, Бюл. Гл. ботан. сада АН СССР, 85: 47. — *Ochotia olaënsis* (Gorovoi et N.S. Pavlova) A.P. Khokhr. 1985, Фл. Магадан. обл.: 264, 348, nom. superfl.

Тип во Владивостоке: Магаданская обл., Хасынский р-н, пос. Яблонево (150 км от Магадана), на хребте приблизительно в 3 км северо-восточнее поселка, в 5–6 км южнее г. Кварцевая, на щебнистых участках, 10 VIII 1970, П.Г. Горовой, Т.П. Горовая (VLA00000678, рис. 1). Отметим, что в первоописании *C. olaense* (Gorovoi, Pavlova, 1972) не полностью процитирована этикетка: «Тип: Магаданская обл., Хасынский р-н, пос. “150-й км” на трассе Магадан — Ягодное, у вершины хребта в 5–6 км южнее горы Кварцевая, на щебнистых участках, 10 VIII 1970. цв. и пл. П.Г. Горовой и Т.П. Горовая». Там же приведены два паратипа: “Магаданская обл., 150-й км от Магадана по трассе к пос. Ягодное, у вершины хребта, 6 VIII 1969, Н.С. Павлова. Магаданская обл., Ольское плато, в 180 км севернее Магадана, 5 IX 1970, Б.А. Юрцев и А.П. Хохряков. В Москве, ГБС”. Позднее (Pimenov, Lavrova, 1985) при описании нового рода *Magadania* были перечислены 12 исследованных образцов (specimina examinata), которые были изучены во VLA, MW, MAG. В монографии “Зонтичные России” (Pimenov, Ostroumova, 2012) ошибочно, хотя и с вопросом, указано, что голотип хранится в МНА.

Упомянутые в протологе паратипы в МНА не найдены (С.А. Полуэктова и Н.Ю. Степанова, устное сообщение). В МНА хранится другой сбор Б.А. Юрцева и А.П. Хохрякова: “Магаданская обл., Хасынский р-н, каньон истоков Олы, у края ложины, базальты, 4 IX 1970” (MNA0324806). В Гербарии МГУ с пометками “топотип” и “specimen authenticum” находится образец MW0118856: “Магаданская обл., 150 км Колымской трассы пос. Яблонево, правый берег р. Олы, щебнистый склон с разреженным стлаником 10 VIII 1978, А.П. Хохряков, О.А. Тузов”. Этикетка этого образца описывает географическое положение примерно того же места, где был собран голотип, так что может быть топотипом, однако образец не является specimen authenticum, т.к. никаких пометок или определенных этикеток авторов таксона на нем нет.

Другие сборы 1970-х гг. хранятся, кроме MAG, в МНА и VLA (МНА0324807, МНА0324808, МНА0324809, МНА0324810, VLA: № 219579, № 219582, № 219580, № 219581). В БИН РАН (LE) образцов нет.

Образцы с хребта Джугджур в Аяно-Майском р-не Хабаровского края во VLA: “южное плечо г. Топко, 18 VIII 1977, А. Бобров, В. Васильев” (№ 219578), “привершинная часть юго-западного плеча г. Топко (1906 м), 21 VIII 1977, А. Бобров” (№ 219576, № 219577).

Основные гербарные сборы *M. olaënsis* хранятся в гербарии Института биологических проблем Севера ДВО РАН (MAG) — 38 листов (прил.) и представлены в виртуальных гербариях <https://herbarium.ibpn.ru/> и <https://plant.derom.su.ru/>. Из них 4 могут рассматриваться как топотипы: MAG0013307, MAG0013305, MAG0013306, MAG0014324. На портале Global Biodiversity International Facility (GBIF) — 58 местонахождений: это гербарные образцы MAG (36), MW (1), 4 — данные из литературных источников по локальным флорам (2 в Хабаровском крае и 2 в Магаданской области — на о. Завьялова и Ольском плато), а также 17 фотографий (наблюдений исследовательского уровня), загруженных нами на сайт iNaturalist (GBIF, 2023).

Морфологическое описание *Magadania olaënsis* (вида и рода) составлены очень подробно (Gorovoy, Pavlova, 1972; Pimenov, Lavrova, 1985; Pimenov, Ostroumova, 2012). Дополним опубликованные данные тем, что боковых ветвей, отходящих от генеративного побега, обычно 1–2 (редко 3–5). Судя по гербарным сборам в MAG, МНА, MW и VLA (68 растений), примерно с одинаковой частотой встречаются особи с простым стеблем (15) и с одним дополнительным соцветием (16), несколько чаще — с двумя боковыми соцветиями (22), значительно реже — с тремя (9), четырьмя (4) и пятью (2) боковыми соцветиями. Диаметр зонтиков на боковых ветвях всегда меньше, чем центрального. Длина боковых ветвей может быть как больше (что указано П.Г. Горовым и Н.С. Павловой (Gorovoy, Pavlova, 1972), так и меньше главного стебля. Длина зрелых плодов, по нашим данным, составила от 3 до 6.5 мм, ширина — от 2.5 до 4.5 мм (средние данные представлены в табл. 1).

Соматическое число хромосом *Magadania olaënsis* определялось из двух основных

местонахождений — из окрестностей Атарганской косы (Volkova, Gorovoy, 2011; Volkova, 2015) и с Ольского плато (Andriyanova, Mochalova, 2016). Во всех случаях определено диплоидное число хромосом $2n = 22$.

Распространение и оценка численности популяций. *Magadania olaënsis* — эндемик российского Дальнего Востока (Магаданской области и Хабаровского края), описанный с Ольского плато из окрестностей пос. Яблоневый (заброшенного в начале 2000-х гг.), основная часть ареала которого расположена в Магаданской области. Известно также изолированное местонахождение в Аяно-Майском р-не Хабаровского края на хр. Джугджур, г. Топко, 57°06' N, 137°24' E, которое находится в 730–950 км к юго-западу от магаданских популяций. Ареал вида имеет дизъюнктивный реликтовый характер.

В Магаданской области встречается в двух группах местонахождений: на Охотско-Колымском водоразделе и на побережье и островах Тауйской губы (рис. 2). Большая часть ареала *M. olaënsis* расположена на Охотско-Колымском водоразделе, на Ольском плато, которое представляет собой массивное горное поднятие с абсолютными отметками от 1000 до 1662 м над ур. м. и площадью более 600 км². Для плато характерен сглаженный среднегорный рельеф, большая его часть сложена плоскозалегающими третичными базальтами (Ivanov, Malakhova, 2014). Ольское плато на фоне окружающих поднятий Колымского нагорья представляет своеобразный флористический оазис, место концентрации реликтовых растений (Khokhryakov, Yurtsev, 1974; Yurtsev, Khokhryakov, 1975). Флора довольно хорошо изучена, выделяется своеобразием и богатством, весьма гетерогенна по своему составу и географическим связям.

Гербарные сборы *M. olaënsis* имеются с большей части территории Ольского плато (рис. 2), однако наибольшее число известных местонахождений сосредоточено в бассейне верхнего течения р. Олы. Это может быть обусловлено как лучшей изученностью этой территории, так и более разнообразным ландшафтом с крутыми склонами и скалами (р. Ола в истоках и ее мелкие притоки протекают в глубокой долине с относительной разницей высот в 500–700 м). Краевые местонахождения вида: г. Лебединая, отроги г. Нух, истоки рек Хурендя и Малтан (рис. 2,

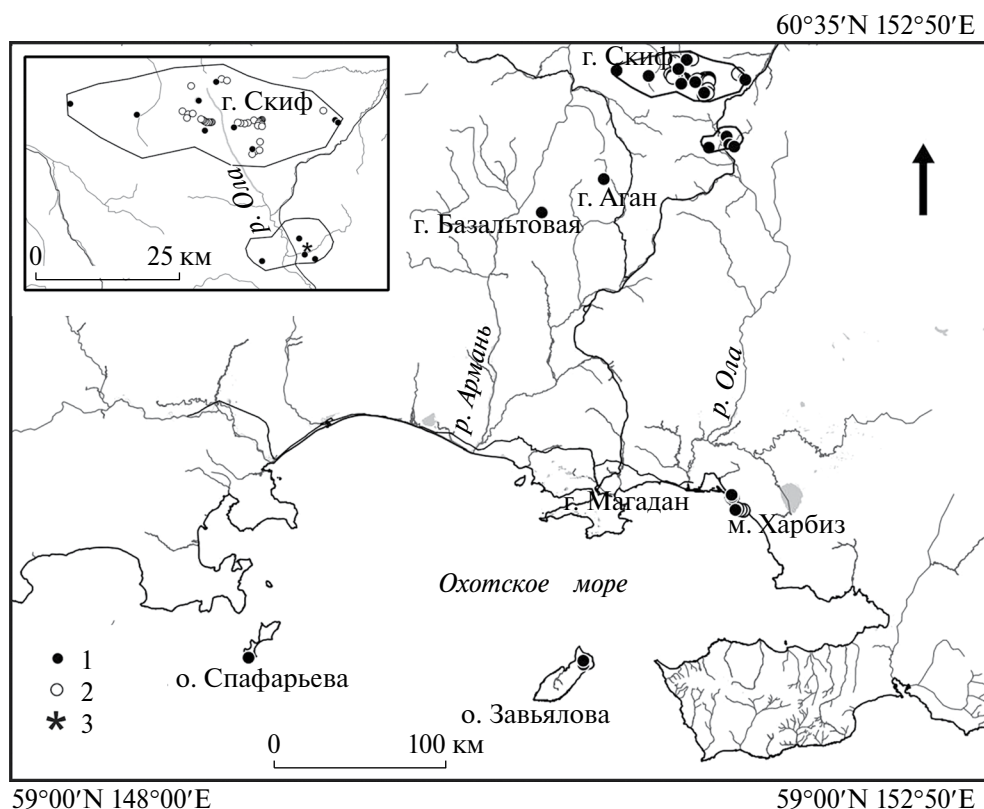


Рис. 2. Ареал *Magadania olaënsis* в Магаданской области. На врезке — фрагмент ареала на Ольском плато на Охотско-Колымском водоразделе.

Обозначения: 1 — пункты гербарных сборов; 2 — пункты наблюдений; 3 — locus classicus.

Fig. 2. Range of *Magadania olaënsis* in the Magadan Region. Inset: a fragment of the range at the Ola Plateau on the Okhotsk-Kolyma watershed.

Designations: 1 — points of herbarium collections; 2 — points of observation; 3 — locus classicus.

врезка), они относятся как к охотоморскому, так и к колымскому водосборным бассейнам (прил.).

Типовое местонахождение — окр. г. Кварцевая, но на современных картах это название отсутствует, а место сбора цитируется по-разному, поэтому нет точной геопривязки. Согласно наиболее подробному описанию с этикетки голотипа (VLA00000678) считаем, что locus classicus находится в горном массиве севернее руч. Неорчан ($60^{\circ}28'33''$ N, $151^{\circ}28'49''$ E) или же южнее этого ручья ($60^{\circ}27'45''$ N, $151^{\circ}29'18''$ E), где нами отмечены единичные растения *M. olaënsis*. Сборы из этого места повторены (MAG0014324).

Мы неоднократно обследовали верховья р. Ола на левобережье от р. Татынгычан и Яблоневого перевала до водораздела с р. Б. Хая, а на правобережье — выше р. Булум до водораздела с р. Нил — территорию площадью около 80–100 км². По результатам маршрутного картирования находок магадании ольской выявлено

4 небольших участка, на которых общая площадь подходящих для произрастания *M. olaënsis* местообитаний с относительно высокой (2.5–3 тыс. на км²) плотностью составляет не более 1.5 км². На остальной территории вид встречается спорадично, в малом количестве. Участки наибольшей концентрации находок перечислены ниже в порядке убывания численности.

1. Южные склоны г. Скиф между восточными истоками руч. Глинистого и руч. Замкнутого на высотах 950–450 м над ур. м. с центральной точкой $60^{\circ}37'40''$ N, $151^{\circ}22'41''$ E. Склон южной экспозиции с разнотравными, осоково-хвощево-разнотравными, сухими разнотравно-осоковыми лужайками, щебнистой кустарничковой тундрой и каменистыми осыпями. Здесь магадания произрастает не только в тундре и на лугах, но и в сообществах с преобладанием караганы гривастой. На участке 1.3×0.8 км (~1 км²) в подходящих местообитаниях, на которые приходится не более половины площади,

произрастает в среднем 1 (2) экземпляра на 250–300 м², т.е. численность вида составляет около 1600–2000 растений.

2. Южные склоны г. Скиф западнее правого истока руч. Глинистого на высоте 900–1300 м над ур. м., 60°37'46" N, 151°20'05" E. Крутой склон южной экспозиции с щебнистой кустарничковой, дриадово-кустарничковой тундрой, сухими лужайками, каменистыми осыпями и скальными останцами. На территории 0.3 × 1.3 км (~0.4 км²) на подходящие участки приходится 40% площади, произрастает 1 (2) экземпляра на 400–500 м², т.е. около 300–400 растений.

3. Южные предгорья г. Скиф в 5–6 км на юг от его вершины. Склоны южной и западной экспозиций небольших вершин между короткими притоками руч. Глинистого, 750–950 м над ур. м., 60°35'33" N, 151°21'33" E. Сочетание редкостойного кедрового стланика с тундрами кустарничковыми, разнотравно-кустарничковыми и рододендрово-кустарничковыми. На участке ~0.7 км² в подходящих местообитаниях, на которые приходится около 30–40% площади, произрастает 1 (2) экземпляра на 250 м². Численность составляет около 800–1100 растений.

4. Южные склоны г. 1410 м на правом берегу р. Ола, расположенной напротив г. Скиф, 1100–1300 м над ур. м., 60°37'50" N, 151°14'29" E. Пологий склон с сомкнутой дриадово-разнотравно-мохово-лишайниковой тундрой или каспиопово-разнотравно-мохово-лишайниковой тундрой с единичными стелющимися лиственницами и редким кедровым стлаником. Местами в растительном покрове преобладают ивы (*Salix glauca* L., *S. reticulata* L.) или *Rhododendron redowskianum* Maxim. На участке 0.4 × 1.8 км (~0.7 км²) местообитания магадании ольской занимают около 60%, 1 (2) экземпляра произрастает на площади около 400 м². Около 1000 растений.

Еще в двух местонахождениях площадью 0.2–0.3 км² *M. olaënsis* более редок, но это не единичные растения – одно или несколько на 500 м²: 1) северные отроги г. Скиф, в правых истоках р. Хурендя, пологие склоны западной экспозиции с высотами 1000–1200 м над ур. м. 60°40'35" N, 151°16'24" E; 2) западнее истоков р. Ола, водораздел руч. Жаркий (приток р. Булум) и руч. Пеон (приток р. Нил),

водораздельный участок на 1200 м над ур. м., 60°38'37" N, 151°10'55" E. Здесь произрастает ориентировочно 500 растений.

Численность магадании ольской на Охотско-Колымском водоразделе можно оценить в пределах не менее 3500 и не более 7500 растений.

На остальной территории Ольского плато и обследованных территориях Охотско-Колымского водораздела *M. olaënsis* встречается редко: единичные или немногочисленные (2–4) экземпляры произрастают на участках площадью около 50 м², расположенных на расстоянии от 0.5 до 10 км друг от друга. В среднем на маршруте протяженностью 5 км, проходящем по подходящим местообитаниям (южные склоны и водоразделы с кустарничковой тундрой, лужайками), можно встретить только одно или несколько (группой по 3–5) растений. Отметим, что в местах концентрации на Ольском плато магадания ольская произрастает преимущественно в сообществах сомкнутостью 70–90%, а на каменистых незадернованных осыпях и россыпях, расположенных рядом с обширными участками тундровых сообществ, вид встречается очень редко.

Кроме Ольского плато, примерно в 120 км к югу известна популяция в северо-западной части Тауйской губы Охотского моря, в окрестностях Атарганской косы, мысов Кир и Харбиз, на участке побережья от 59°32'57" N 151°30'08" E до 59°30'25" N 151°33'51" E (рис. 2). Территория, на которой в данном местонахождении произрастает *M. olaënsis*, совсем небольшая. На участке приморского хребта высотой до 450 м над ур. м. и протяженностью 7 км она растет в верхней части склонов и единично по гребню на высотах 50–350 (400) м над ур. м. в полосе шириной около 0.2–0.5 км (4–5 км²). На подходящие местообитания приходится около 30% площади, это в основном крутые склоны западных и южных экспозиций с лужайками, низкорослыми редкостойными каменноберезняками и разнотравно-кустарничковыми тундрами. Здесь произрастает 1 (2) растение на 200 м², численность составляет 600–900 растений (менее 1000).

В остальных местонахождениях в Магаданской области *M. olaënsis* встречается редко и с низкой численностью. На Охотско-Колымском водоразделе вне Ольского плато произрастает на небольшом Арманском плато,

сложенном, как и Ольское плато, мыгдыкитскими базальтами и расположенном в окр. г. 1253 м над ур. м. (местное название г. Базальтовая) на водоразделе руч. Крохаль (бассейн р. Армани) и руч. Тихий (бассейн р. Хакандя). Произрастает в двух точках, между которыми 0.7 км, на высоте 1150–1200 м над ур. м.: около останцов в кассиопово-кустарничковой тундре, 60°17'07" N, 150°29'33" E (MAG0015602), и на южном склоне гребня горы на сухой разнотравной лужайке с участием *Caragana jubata* (Pall.) Poir. и *Pedicularis ochotensis* A.P. Khokhr., 60°17'09" N, 150°30'13" E (MAG0011715), по несколько растений в каждой точке (Mochalova, 2023). Кроме того, *M. olaënsis* найден между Ольским и Арманским плато в верховьях левого притока руч. Аган (приток р. Некландя, бассейн р. Хасын), севернее г. Трог, склоны г. 1644 м над ур. м., 60°22'24" N, 150°50'02" E, 1000 м над ур. м. Произрастает на мелкощепнистом склоне южной экспозиции, в полосе с несомкнутой кустарничково-моховой тундрой в западине. Найдено несколько растений на площади ~10 м².

В Тауйской губе встречается на двух крупных островах (рис. 2). На о. Завьялова вид очень редок, произрастает на каменистых склонах в северной части острова, известен по двум сборам: 23 VIII 1976, С.В. Ершова, А.П. Хохряков; 15 VIII 2009, М.Г. Хорева. На о. Спафарьева небольшая популяция, насчитывающая 10–15 растений, обнаружена нами на приморском склоне среди разнотравья в 2013 г. Это самое южное местонахождение в Магаданской области. Общая площадь “островных” местонахождений не превышает 0.1–0.5 км², а численность можно оценить примерно в 50 растений.

Выявленная площадь ареала *M. olaënsis* в Магаданской обл. составляет порядка 380 км² на Охотско-Колымском водоразделе, 4–5 км² на побережье (окрестности Атарганской косы и м. Харбиз) и 0.1–0.5 км² на островах Тауйской губы. На этой территории местообитания, подходящие для произрастания *M. olaënsis*, занимают примерно 20–30%. Основная часть местонахождений связана с базальтами — горными породами основного состава нормального ряда щелочности. Возможным местообитанием магадании, как и других редких видов, может быть Янское базальтовое плато в верховьях р. Правой Яны, сложенное такими

же породами, как Ольское и Арманское плато (Ivanov, Malakhova, 2014). Эта территория ботаниками не посещалась.

Фитоценотическая приуроченность. Характеристика местообитаний. *Magadania olaënsis* — мезофит, гелиофит. Растет обычно на открытых местах выше верхней границы кедровостланиковых зарослей, реже среди разреженных стлаников на водоразделе или низкорослых редкостойных каменноберезняков на побережье. На охотско-колымском водоразделе встречается на высотах более (750) 900 и до 1300 м над ур. м., а на побережье — начиная от 50 м и до 850 м над ур. м. Единичное растение было отмечено на косе Атарган, на высоте около 10 м над ур. м. Обычно произрастает на склонах южных и западных экспозиций, реже на выположенных гребнях, седловинах и северных склонах, где чаще встречается около останцов. Отметим, что на хр. Джугджур вид собран на высоте около 1900 м над ур. м.

Зимние наблюдения на Атаргане (22.03.2018) показали, что места произрастания магадании ольской покрыты снегом, хотя близлежащие участки на береговых склонах лишены снежного покрова из-за ветра. Эти местообитания освобождаются от снежного покрова примерно в середине апреля.

На Ольском плато *M. olaënsis* произрастает в разнотравно-кустарничковых, кустарничковых тундрах, на щепнистых разнотравных лужайках, реже на слабо задернованных щепнистых россыпях и в осоково-кустарничковых тундрах. Ни в одном из сообществ его проективное покрытие не превышает 1%. Кратко охарактеризуем основные сообщества, где произрастает магадания ольская (обилие указано по шкале Браун-Бланке).

1. Сухая дриадово-кустарничковая тундра, ОПП 80%. *Dryas punctata* Juz. 2, *D. ajanensis* Juz. 1 (дриады — 60%), *Rhododendron aureum* Georgi +, *Scorzonera radiata* Fisch. ex Ledeb. +, *Hierochloë alpina* (Sw.) Roem. et Schult. +, *Artemisia arctica* Less. r, *Hedysarum hedysaroides* (L.) Schinz et Thell. r, *Tilingia ajanensis* Regel et Tiling r.

2. Кустарничково-лишайниковая тундра, ОПП 90%. *Dryas punctata* 1, *D. ajanensis* 1, *Vaccinium uliginosum* L. 1, *Rhododendron aureum* +, *Cassiope ericoides* (Pall.) D. Don +, *Hierochloë alpina* +,

Таблица 1. Семенная продуктивность одного растения *Magadania olaënsis* (Атарган)**Table 1.** Seed productivity of one plant of *Magadania olaënsis* (Atargan)

Год сбора Collection year	РСП RSP	Min РСП Min RSP	Max РСП Max RSP	УРСР CRSP	Min УРСР Min CRSP	Max УРСР Max CRSP	КС, % CR, %	Длина семян Seed length	Ширина семян Seed width
2012	146 ± 42	0	462	338 ± 46	37	601	43	4.7 ± 0.2	3.3 ± 0.1
2016	326 ± 43	101	694	459 ± 50	121	819	71	4.7 ± 0.1	—
2017	0	—	—	0	—	—	0	—	—
2020	168 ± 41	0	413	462 ± 52	59	539	36	4.2 ± 0.2	3.6 ± 0.1

Примечание. РСП — реальная семенная продуктивность, т.е. количество выполненных зрелых неповрежденных семян, УРСР — условно-реальная семенная продуктивность, т.е. количество всех семян, включая невызревшие и поврежденные насекомыми, КС — коэффициент созревания, отношение РСП к УРСР. Ширина семян в 2016 году не измерялась.

Note. RSP — real seed productivity, the number of fully ripened intact seeds, CRSP — conditional real seed productivity, total number of seeds, including the unripened and damaged by insects, CR — coefficient of ripening, RSP to CRSP ratio. Seed width was not measured in 2016.

Hedysarum hedysaroides +, *Carex vanheurckii* Muell. Arg. r, *Salix sphenophylla* A.K. Skvortsov r, *Chamaepericlymenum suecicum* (L.) Aschers. et Graebn. r, лишайники 2.

3. Несомкнутая лишайниково-разнотравно-кустарничковая щербнистая тундра, ОПП 30%. *Dryas punctata* +, *Scorzonera radiata* +, *Pulsatilla ajanensis* Regel et Tiling r, *Tilingia ajanensis* r, *Silene stenophylla* Ledeb. r, *Bupleurum triradialum* Adam. ex Hoffm. r, *Saxifraga punctata* L. r, *Potentilla nivea* L. r, *Gorodkovia jacutica* Botsch. et Karav. r, лишайники 1.

4. Несомкнутая щербнистая кассиоповая тундра, ОПП 20%. *Cassiope ericoides* 1, *Saxifraga punctata* L. +, *Pulsatilla ajanensis* r, *Dryas punctata* r, *Eritrichium ochotense* (Pall.) D. Don. r, *Patrinia sibirica* (L.) Juss. r.

5. Щербнистая разнотравная лужайка, ОПП 80%. *Carex ledebouriana* C. A. Mey. ex Trev. 1, *Dryas ajanensis* +, *Festuca rubra* L. +, *Viola avatschensis* W. Beck. et Hult. +, *Hylotelephium cyaneum* (J. Rudolph) H. Ohba r, *Pulsatilla ajanensis* +, *Rhododendron camtschaticum* Pall. +, *Erysimum pallasii* (Pursh) Fern. r, *Patrinia sibirica* (L.) Juss. r, *Potentilla nivea* L. r. и др., лишайники +.

6. Кустарничково-разнотравно-лишайниковая тундра, ОПП 90%. *Dryas punctata* 2, *Rhododendron redowskianum* 1, *Cassiope tetragona* 1, *Hedysarum hedysaroides* +, *Arctous alpina* (L.) Neidenzu +, *Bupleurum triradiatum* Adams ex Hoffm. r, *Carex vanheurckii* r, *Pulsatilla ajanensis* r.

7. Ивово-дриадово-лишайниково-моховая тундра, ОПП 90%. *Salix reticulata* L. 1, *Rhododendron lapponicum* (L.) Wahlenb., *Vaccinium uliginosum* +, *Bistorta elliptica* (Willd. ex Spreng.) Kom. +, *Dryas punctata* +, *Carex* sp. +, *Vaccinium vitis-idaea* L. +, *Hedysarum hedysaroides* +, *Equisetum arvense* L. r, мхи 2, лишайники r.

8. Тундра дриадово-разнотравная с участием *Caragana jubata*, ОПП 90%. *Caragana jubata* 1, *Dryas punctata* 1, *Hedysarum hedysaroides* +, *Carex* sp. +, *Equisetum arvense* r, *Claytonia acutifolia* Pall. ex Schult. r, *Pedicularis alopecuroides* Stev. ex Spreng r, *Oxytropis ochotensis* Bunge r, *Bistorta elliptica* r, *Salix glauca* r, *Potentilla nivea* L. r, *Valeriana capitata* Pall. ex Link r, лишайники +, мхи r.

На северо-западном участке побережья Тайу-ской губы (Атарган — Харбиз) вид произрастает как в сомкнутых сообществах разнообразного видового состава (разнотравно-кустарничковые тундры и разнотравные луга в окружении каменноберезняков и с участием караганы гривастой), так и в разреженных группировках, проективное покрытие *Magadania olaënsis* везде меньше 1% (+).

1. Разреженный каменноберезняк с караганой гривастой в верхней части склона юго-западной экспозиции, ОПП 100%. *Betula lanata* (Regel) V. Vassil. — сомкнутость 0.1—0.2; высота 2.5—3 м; *Caragana jubata* 2, *Salix sphenophylla* A.K. Skvortsov 2, *Dryas ajanensis* 3, *Hierochloë alpina* 2, *Arctous alpina* 1, *Rhododendron camtschaticum* 1, *Oxytropis evenorum* Jurtzev et

A.P. Khokhr. 1, *Vaccinium vulcanorum* Kom. 1, *Pulsatilla ajanensis* 1, *Bistorta vivipara* (L.) Delarbre +, *Aconogonon ochreatum* (L.) Hara +, *Halenia corniculata* (L.) Cornaz +, *Myosotis asiatica* (Vestergren) Shischk. et Serg. +, *Bupleurum triradiatum* +, *Pedicularis alopecuroides* +, *Oxytropis ajanensis* (Regel et Tiling) Bunge +, *Astrocodon expansus* (J. Rudolph) Fed. +, *Patrinia sibirica* (L.) Juss. +, *Poa* sp. +, *Trisetum spicatum* (L.) K. Richt. +, *Carex* sp. +, *Coeloglossum viride* (L.) C. Hartm. r, лишайники 1, мхи 2.

2. Разнотравный луг с караганой гривастой в верхней части склона южной экспозиции, ОПП 60%. *Caragana jubata* 2, *Astragalus tugarinovii* Basil. 1, *Bistorta vivipara* 1, *Corydalis magadanica* A.P. Khokhr. 1, *Dryas ajanensis* 1, *Erigeron kora-ginensis* (Kom.) Botsch. 1, *Festuca rubra* 1, *Hierochloë alpina* 1, *Lychnis ajanensis* (Regel et Tiling) Regel 1, *Oxytropis evenorum* 1, *Patrinia sibirica* 1, *Primula mazurenkoe* A.P. Khokhr. 1, *Pulsatilla multifida* (G. Pritz.) Juz. 1, *Tephrosia integrifolia* (L.) Holub 1, *Trisetum spicatum* 1, *Viola biflora* L. 1, *Aconogonon ochreatum* 1, *Androsace capitata* Willd. ex Roem. et Schult. +, *Bupleurum atargense* Gorovoi +, *Lloydia serotina* (L.) Reichenb. +, *Potentilla nivea* L. +, *Scorzonera radiata* +, *Adoxa moschatellina* L. +, лишайники 2, мхи 3.

3. Каменистая осыпь в средней части склона южной экспозиции, ОПП 10%. *Caragana jubata* 1, *Saxifraga derbekii* Sipl. 1, *Woodсия ilvensis* (L.) R. Br. +, *Hierochloë alpina* +, *Bistorta elliptica* +, *Pedicularis alopecuroides* +, *Oxytropis evenorum* +, *Aconogonon ochreatum* +, *Potentilla arenosa* (Turcz.) Juz. +, *Artemisia lagopus* Fisch. ex Bess. +, мхи +.

На о. Завьялова магадания ольская встречается исключительно редко близ вершины г. Завьялова, на высоте более 700–800 м над ур. м., на каменистых склонах (ОПП 20%), в пятнах кустарничково-лишайниковой тундры, ОПП 90%, *Rhododendron camtschaticum* 4, *Salix arctica* 3, *Pinus pumila* 1, лишайники 3, мхи 1.

На о. Спафарьева произрастает группа из 10–15 растений, находящихся на расстоянии 2–5 м одно от другого, на разнотравном лугу с участием можжевельника и ивы клинолистной на приморском склоне южной экспозиции, на высоте около 80 м над ур. м. ОПП 100%. *Salix sphe-nophylla* A.K. Skvortsov 2, *Juniperus sibirica* Burgsd. 2, *Anemonastrum sibiricum* (L.) Holub 2, *Geranium erianthum* DC. +, *Fritillaria camtschaticensis*

(L.) Ker-Gawl. +, *Bistorta elliptica* +, *B. vivipara* (L.) Gray +, *Angelica gmelinii* (DC.) M. Pimen. +, *Tilingia ajanensis* +, *Erigeron thunbergii* A. Gray +, *Festuca rubra* +, *Poa* sp. +, лишайники +.

Примечательно, что почти во всех местонахождениях (Ольское плато: склоны г. Скиф, Арманское плато, Атарган — Харбиз, о. Завьялова) *Magadania olaënsis* соседствует с реликтовым центральноазиатским мигрантом *Caragana jubata*. Кроме того, на Атаргане, в луговых сообществах на приморских склонах, вместе с *Magadania olaënsis* произрастают узколокальные приохотские эндемики *Corydalis magadanica*, *Primula mazurenkoe* и *Bupleurum atargense*.

Биология и сезонный ритм развития. *Magadania olaënsis* — многолетнее монокарпическое растение, размножение только семенное. Ювенильные и имматурные растения в природных условиях нам не встречались, т.к. малозаметны как среди растительности, так и на крупнокаменистых осыпях. У виргинильных, которым не менее 2–3 лет, имеются 2–3 розеточных листа и корень диаметром 0.5–0.8 см, основание которого покрыто 5–9 пленчатыми остатками расширенных оснований листьев прошлых лет (рис. 3, 4). В последующие годы у растений в июне развивается розетка из 2–3 листьев на корне диаметром более 1 см (рис. 5). Пересчитать остатки оснований отмерших листьев, по которым можно судить о возрасте, сложно, т.к. нормально сохраняются только основания листьев прошлого и позапрошлого года. Длительность виргинильного периода, вероятно, зависит как от локальных условий места произрастания, так и от условий вегетационного сезона, предшествующего цветению и плодоношению. Оцениваем возраст перехода растений в генеративную фазу промежутком от 5 до 10 лет.

Период вегетации с 5–10 июня по 1 сентября (~80 дн.) на Ольском плато и с (25 мая) 1 июня по 20 (30) сентября (~110–120 дн.) на побережье. Фенологические стадии в разных местонахождениях, особенно на Ольском плато, могут различаться на 2 (3) недели, что связано с микроклиматическими условиями на разных участках склонов и водоразделов. По данным Н.И. Хлыновской (Khlynovskaya, 1981), разница в сумме температур выше +5°C на склонах

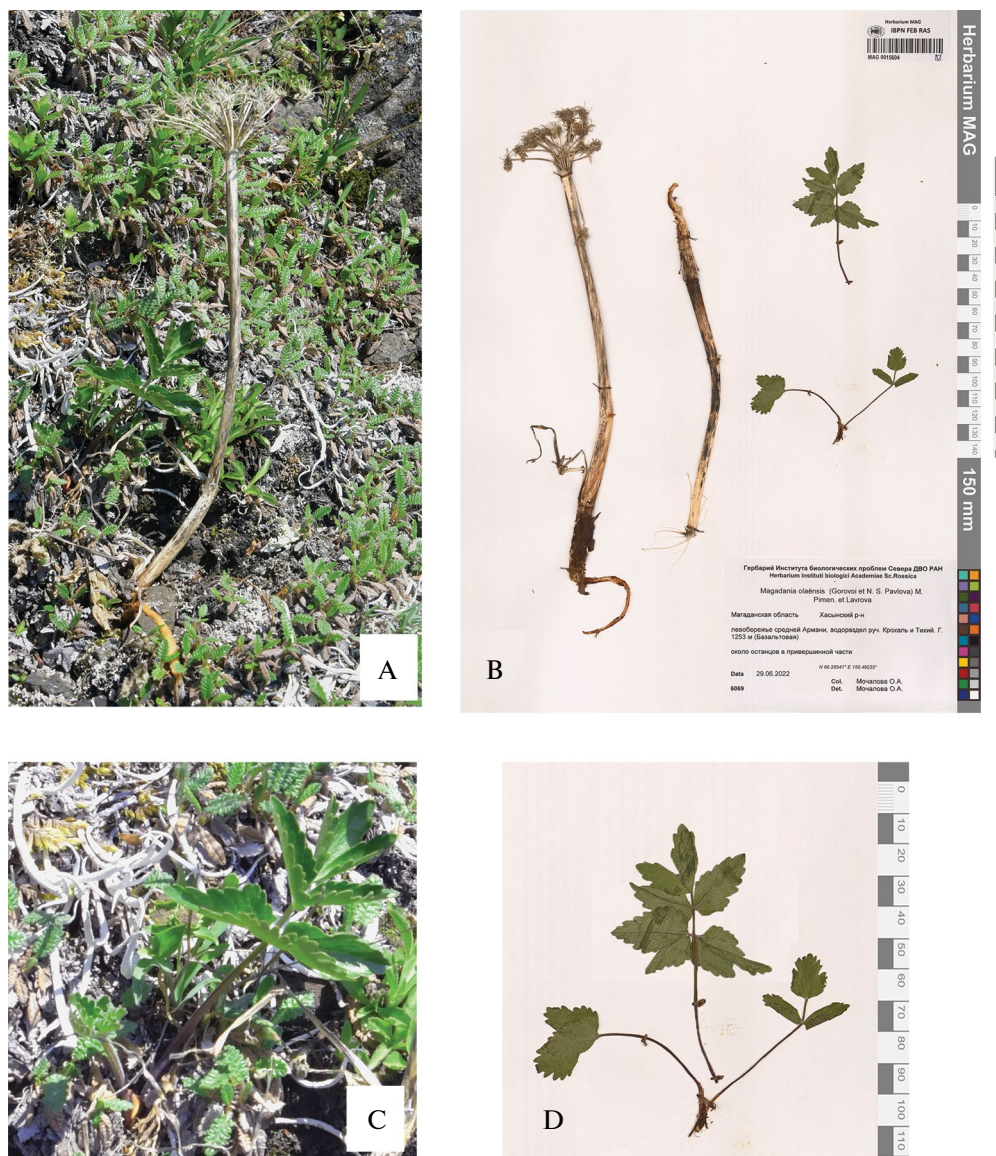


Рис. 3. Прошлогодний стебель (А, В) и двулетнее растение (С, D) *Magadania olaënsis* в природной обстановке (А, С) и в гербарии (В, D) (29 июня 2022, MAG0015604).

Fig. 3. The last year's stem (A, B) and biennial plant (C, D) of *Magadania olaënsis* in nature (A, C) and in herbarium (B, D) (June 29, 2022, MAG0015604).

северной и южной экспозиций составляет около 200°C.

Начало вегетации, появление первых листьев ~ (1) 10 июня, примерно через 10–15 дней после схода снега (рис. 3, 4). У растений в генеративной фазе генеративные побеги появляются почти одновременно с розеткой листьев в начале июня. Бутонизация начинается во второй половине июня с центрального зонтика, цветение — с конца июня. Боковые соцветия зацветают позже центрального, нераскрытые бутоны на них отмечаются до конца августа. Цветение — 3

декада июня — 3 декада августа (рис. 6). Семена начинают формироваться на центральных зонтиках 8–15 июля, самая ранняя дата 05.07.2020 зафиксирована на южных склонах г. Скиф. В период образования семян на центральном зонтике боковые зонтики цветут, случается, что они уходят в зиму в стадии бутонизации. Обычно семена вызревают только на центральных зонтиках, на боковых зонтиках семена формируются редко и, как правило, не вызревают. Нами отмечались отдельные случаи (1 на 20–30 растений) формирования



Рис. 4. Виргинильное 3 (4)-летнее растение *Magadania olaënsis* в природной обстановке (А) и в гербарии (В) (18 июня 2021, MAG0011715).

Fig. 4. Virginal 3(4)-year-old plant of *Magadania olaënsis* in nature (A) and in herbarium (B) (June 18, 2021, MAG0011715).

второго соплодия с выполненными зрелыми семенами (MAG0013287). Плодоношение — 3-я декада июля — конец августа. Созревание семян — вторая половина августа. Созревают семена с начала августа до начала сентября, когда начинаются заморозки, самая ранняя дата — 26.07.1981 на г. Лебединая (MAG0013301). После созревания семена на центральном зонтике осыпаются почти сразу, а на боковых невызревшие семена могут сохраняться до следующего лета. В начале сентября генеративные побеги засыхают и сохраняются обычно до следующего лета (рис. 3). Вегетативная надземная часть растений виргинильного периода онтогенеза отмирает с началом заморозков.

Семенная продуктивность изучалась нами на ключевом участке в районе Атарганской косы (59°32'30" N 151°30'10" E) и существенно варьировала в разные годы (табл. 1). Для исследования изымалось около 10% из числа генеративных растений (10–15 экз.) с последующим

возвращением диаспор в природу. Численность генеративных растений на ключевом участке протяженностью 0.8 км с площадью подходящих местообитаний около 0.004 км² была относительно стабильной и составляла 100–200 экз. во все годы наблюдений (2012, 2016, 2018, 2019, 2020, 2021), кроме 2017 г., когда ни цветения, ни плодоношения на ключевом участке не отмечалось. Возможная причина — холодная затяжная весна в 2017 г.

Семенная продуктивность магадании ольской существенно различается в разные годы и у разных растений. В 2012 и 2020 гг. у 20% растений не было выполненных семян, а при ненулевых значениях минимальные и максимальные значения реальной семенной продуктивности (РСП) и условно-реальной семенной продуктивности (УРСП) отличаются в 7–15 раз у разных растений. Средние значения РСП и коэффициента созревания (КС) в разные годы могут различаться в 2 раза, средние



Рис. 5. *Magadania olaënsis* в прегенеративной фазе возрастом более 5 лет в природной обстановке (А, В) (Ольское плато, июль и август 2011 г.) и на гербарном листе (С) (август 2008 г.).

Fig. 5. *Magadania olaënsis* at the pregenerative stage over 5 years old in nature (A, B) (Ola Plateau, July and August 2011) and in herbarium (C) (August, 2008).

значения УРСП более стабильны. Отметим, что в 2012 году было повреждено 20% от количества выполненных семян (РСП), в 2020 году — 3%.

Прорастание семян затруднено. При комнатной температуре (+18...+22°C) они не прорастают. После стратификации при +5°C в течение 5 месяцев проросло $11 \pm 2.6\%$ семян. Они прорастали медленно, в течение 2 месяцев, по 1–2 в день с большими периодами между появлением отдельных проростков (от 2 до 12 дней). Через 3.5 месяца семена снова были помещены в холодильник при +5°C на 3 месяца. Прорастание началось еще при +5°C, было более дружным и продолжалось в течение месяца при +18...+22°C. Общая всхожесть составила $84 \pm 3.7\%$. Качество семян хорошее, несмотря на столь длительный период прораствания, загнило очень небольшое количество семян — всего 13%, а 3% не загнили и не проросли.

Судя по небольшой всхожести после первого периода стратификации, семена магадании ольской находятся в состоянии покоя разной глубины и, вероятно, лишь частично прорастают на следующий вегетационный сезон, а частично прорастают в течение нескольких

последующих лет. В наших опытах 11% семян проросло через год после сбора и еще 73% — через 2 года после сбора.

Состояние популяций. Мероприятия по охране. Вид *Magadania olaënsis* ранее был занесен в Красную книгу Российской Федерации (Krasnaya..., 2008b) с категорией 3а: “Редкий вид, эндемик России (Хабаровского края и Магаданской обл.). Представитель олиготипного рода, эндемичного для России”. Согласно Приказу Минприроды России от 24.05.2020 г.² внесены изменения в п. 3.7. Порядка ведения Красной книги Российской Федерации. Теперь каждый объект животного и растительного мира относится не только к одной из категорий статуса редкости, но также к одной из категорий угрозы исчезновения и к одной из категорий степени и первоочередности принимаемых и планируемых к принятию природоохранных мер. В новый Перечень объектов растительного

² Приказ Министерства природных ресурсов и экологии РФ № 161 от 24.03.2020 “О внесении изменений в порядок ведения Красной книги Российской Федерации, утвержденный приказом Минприроды России № 306 от 23.03.2016”.



Рис. 6. *Magadania olaënsis* в генеративной фазе (22 июля 2017 г., MAG0013288) в природной обстановке (А) и в гербарии (В).

Fig. 6. *Magadania olaënsis* at the generative stage (July 22, 2017, MAG0013288) in nature (A) and in herbarium (B).

мира, занесенных в Красную книгу РФ³, вид включен с категорией статуса редкости 3 (редкие). Категория угрозы исчезновения — У — уязвимые (Vu — Vulnerable). Согласно категориям и критериям Красного списка МСОП (Kategorii..., 2001) вид относится к категории Vulnerable (Vu) на основании критерия В2а: вид с ограниченным ареалом, составляющим менее 2000 км²

³ Приказ Министерства природных ресурсов и экологии РФ № 320 от 23.05.2023 “Об утверждении Перечня объектов растительного мира, занесенных в Красную книгу Российской Федерации”.

с сильно фрагментированной областью обитания. Что касается категории природоохранного статуса, то для вида достаточно общих мер, предусмотренных нормативными правовыми актами РФ для сохранения объектов животного или растительного мира, занесенных в Красную книгу РФ (III приоритет).

Состояние популяций в настоящее время не внушает опасений. Растения цветут и плодоносят, жизненное состояние большинства экземпляров хорошее. Антропогенная нагрузка во всех

известных местообитаниях низкая (эпизодические туристические маршруты) или отсутствует. Лимитирующим фактором является узкая экологическая приуроченность вида к склонам южных экспозиций, породам основного состава (преимущественно базальтам), а также невысокая семенная продуктивность у этого монокарпического вида. К потенциальным угрозам факторам, в первую очередь для приохотских популяций, можно отнести лесные пожары. Осенью 2020 г. обширный пожар уничтожил растительность на склонах близ Атарганской косы в 2–5 км от местонахождений магадании ольской. Рекреационное воздействие вряд ли станет лимитирующим фактором в ближайшее десятилетие. Незначительная часть популяций на Охотско-Колымском водоразделе произрастает в районе месторождений агатов, однако их промышленная разработка не ведется. Угроза популяциям *M. olaënsis* возникнет в случае начала промышленной добычи ювелирно-поделочных камней. Важно проведение экологической экспертизы всех хозяйственных проектов, особенно дорожного строительства, затрагивающих местообитания вида и влияющих на их численность.

Основная мера охраны вида – сохранение среды обитания *M. olaënsis* и организация ООПТ в основных местах его произрастания. Необходимы наблюдения за состоянием популяций, особенно учитывая исключительно семенное возобновление вида. Также необходим поиск новых местонахождений, в первую очередь проведение ботанической экспедиции на Янское плато на юго-западе Магаданской области.

В Магаданской области вид произрастает на территории региональных памятников природы «Ольское плато» и «Атарганский», однако реальной охраны популяций этого вида они не обеспечивают из-за маленькой площади (0.4 и 0.3 км² соответственно). Необходимо расширение площадей этих ООПТ в десятки раз, а также расширение территории памятника природы «Базальтовый» (0.15 км²), рядом с границами которого произрастает вид. Также для охраны вида перспективна организация природного парка на Охотско-Колымском водоразделе на Ольском плато (Andreev, 2013). В Хабаровском крае местонахождение *M. olaënsis* на г. Топко находится близ границы

государственного природного заповедника «Джугджурский»; предлагается г. Топко присоединить к заповеднику или объявить ее ландшафтным памятником природы (Krasnaya..., 2008с, 2019b). Однако в список охраняемых видов сосудистых растений Джугджурского заповедника *M. olaënsis* включен (Gosudarstvenniy..., 2023). Отметим, что в Красной книге Хабаровского края (Krasnaya..., 2008с, 2019b) перепутаны иллюстрации к видовым очеркам *M. olaënsis* и *M. victoris*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Гербарные сборы *Magadania olaënsis* представлены в 4 гербариях: MAG – 38, VLA – 8, МНА – 5, MW – 1. Типовой образец (holotypus) хранится во VLA, паратипы, вероятно, утеряны. В цифровых гербариях в открытом доступе представлены 39 образцов (MAG – 38, MW – 1).

Основная часть ареала *Magadania olaënsis* расположена в Магаданской области. Известно также изолированное местонахождение на хр. Джугджур в Хабаровском крае, расстояние от которого до ближайших местонахождений в Магаданской области (о. Спафарьева) – 730 км. Выявленная площадь ареала *M. olaënsis* в Магаданской области составляет около 390 км², его наиболее крупная часть (около 380 км²) расположена на Охотско-Колымском водоразделе на Ольском плато, где площадь местообитаний с наибольшей плотностью популяций (2.5–3 тыс. на км²) составляет около 1.5 км². Площадь участка ареала на охотском побережье – 4–5 км², на островах – 0.1–0.5 км². Общая численность популяций составляет примерно 4–8.5 тыс.: на Охотско-Колымском водоразделе – 3.5–7.5 тыс., на побережье – 0.6–0.9 тыс. и около 50 растений на островах.

M. olaënsis – многолетний монокарпик, формирование генеративных побегов происходит на 5–10-й год. На растении в генеративной фазе кроме центрального соцветия обычно формируются 2 боковых (не так часто их меньше или больше), но семена на них, даже если формируются, редко достигают полной зрелости. Численность генеративных особей в популяциях примерно одинакова в разные годы, однако отмечался сезон, когда в одной из

популяций на побережье генеративные растения отсутствовали.

Семенная продуктивность (РСП) существенно различалась в разные годы и составляла в среднем от 146 до 326 вызревших семян на одно растение, варьируя от нуля до 694 семян.

Прорастание семян затруднено. При комнатной температуре (+18...+22°C) они не прорастают. После двух периодов стратификации общая всхожесть составила $84 \pm 3.7\%$. Семена магадании ольской находятся в состоянии покоя разной глубины и лишь частично прорастают в следующий вегетационный сезон, а остальные — в течение нескольких последующих лет.

M. olaënsis произрастает преимущественно в разнотравно-кустарничковых, кустарничковых тундрах, реже на слабо задернованных щебнистых россыпях на высотах более 700 и до 1300 м над ур. м. (Охотско-Колымский водораздел, о. Завьялова) либо в сообществах с большим участием разнотравья на высотах 50–350 м над ур. м. (Атарган — Харбиз, о. Спафарьева).

Основными лимитирующими факторами являются узкая экологическая приуроченность вида к породам основного состава (преимущественно базальтам), а также исключительно семенное размножение и неравномерность семенного возобновления в разные годы.

M. olaënsis относится к редким видам (категория 3), III приоритет природоохранных мер. Согласно категориям и критериям Красного списка МСОП является уязвимым — Vulnerable. К этой категории он отнесен на основании критерия В2а: вид с ограниченным ареалом, составляющим менее 2000 км² с сильно фрагментированной областью обитания. Существующие ООПТ — региональные памятники природы в Магаданской области — не обеспечивают охраны магадании ольской. Современные данные о произрастании на территории заповедника «Джугджурский» противоречивы и нуждаются в уточнении.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследования проводились в рамках тем НИР лаборатории ботаники ИБПС ДВО РАН АААА-А17-117122590002-0, 1022040500936-0, частично поддержаны грантами Rufford Small Grants Foundation, UK, (2010–2011 гг. — проект 8284-1 и 2012–2013

гг. — проект 11690-2) The research and conservation of rare and threatened plants and its habitats in the Magadan Region (Northern Far East Asia, Russia), комплексные экспедиции на о-ва Завьялова и Спафарьева поддержаны грантами ДВО РАН (09-III-Д-06-305, 10-III-Д-06-022, 13-III-Д-06-020). Авторы признательны С.Д. Шведову, В.П. Гартвику, Е.С. и Л.В. Тимошенко за помощь в проведении полевых работ; В.В. Якубову (ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН) за фотографии образцов из VLA, Н.Ю. Степановой и С.А. Полуэктову (ГБС РАН) за консультации и фотографии гербарного материала в МНА, М.В. Легченко (БИН РАН) за подтверждение отсутствия сборов в LE.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [Andreev] Андреев А.В. 2013. Эталоны природы Охотско-Колымского края. Магадан. 322 с.
- Andriyanova E.A., Mochalova O.A. 2016. IAPT/IOPB chromosome data 21 (K. Marchold ed.). — Taxon. 65 (3): 673. <http://dx.doi.org/10.12705/653.44>
- [Flora...] Флора и растительность Магаданской области (конспект сосудистых растений и очерк растительности). 2010. Магадан. 364 с.
- GBIF.org (13 March 2023) GBIF Occurrence Download <https://doi.org/10.15468/dl.cpsyyw>
- [Geologicheskies...] Геологические памятники Северо-Востока России. Магаданская область и Чукотский автономный округ. 2021. Магадан. 120 с.
- [Gorovoy, Pavlova] Горовой П.Г., Павлова Н.С. 1972. Новый вид *Cnidium* Cuss. из Магаданской обл. — Бюл. Гл. бот. сада АН СССР. 85: 47–49.
- [Gosudarstvenniy...] Государственный природный заповедник Джугджурский. Красная книга. 2023. <http://www.djugdjur.ru/territoriya/krasnaya-kniga.html> (дата обращения: 20.10.2023).
- [Ivanov, Malakhova] Иванов Ю.Ю., Малахова Г.Ю. 2014. Палеомагнитное обоснование кампанского возраста базальтов магдыкитской свиты Охотско-Чукотского вулканогенного пояса Северо-востока России. — Фундаментальные исследования. 6 (7): 1432–1436.
- [Kategorii...] Категории и критерии Красного списка МСОП. Версия 3.1 2001. МСОП — Всемирный союз охраны природы. 48 с.
- [Khlynovskaya] Хлыновская Н.И. 1981. Агроклиматическое районирование Северо-Востока СССР. Магадан. 10 с. + карта.
- Khodachek E.A. 1996. Seed reproduction in Arctic environments. — Opera Bot. 132: 129–136.
- [Khokhryakov, Yurtsev] Хохряков А.П., Юрцев Б.А. 1974. Флора Ольского базальтового плато (Колымско-Охотский водораздел). — Бюл. МОИП. Отд. Биол. 79 (5): 59–70.

- [Klugin] Ключин Н.К. 1970. Климат. — В кн.: Север Дальнего Востока. М. С. 101–132.
- [Kozhevnikov] Кожевников А.Е. 2007. Эндемичный элемент во флоре российского Дальнего Востока. — Комаровские чтения. 54: 8–81.
- [Krasnaya...] Красная книга Магаданской области. Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды растений и животных. 2008а. Магадан. 430 с.
- [Krasnaya...] Красная книга Магаданской области. Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды животных, растений и грибов. 2019а. Магадан. 356 с.
- [Krasnaya...] Красная книга Российской Федерации (растения и грибы). 2008b. М. 855 с.
- [Krasnaya...] Красная книга РСФСР. Растения. 1988. М. 590 с.
- [Krasnaya...] Красная книга Хабаровского края: Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды растений и животных. 2008с. Хабаровск. 632 с.
- [Krasnaya...] Красная книга Хабаровского края (растения, грибы и животные). 2019b. Воронеж. 604 с.
- [Mochalova] Мочалова О.А. 2023. Флора Арманского базальтового плато (Магаданская область). — Вестник Северо-Восточного научного центра ДВО РАН. 3: 60–66. <https://doi.org/10.34078/1814-0998-2023-3-60-66>
- [Mochalova et al.] Мочалова О.А., Хорева М.Г., Андриянова Е.А. 2022. Новые местонахождения сосудистых растений из Красной книги Магаданской области. — Вестник Северо-Восточного научного центра ДВО РАН. 2: 92–95. <https://doi.org/10.34078/1814-0998-2022-2-92-95>
- Ostroumova T.A. 2018. Fruit micromorphology in the Umbelliferae of the Russian Far East. — *Botanica Pacifica. A journal of plant science and conservation*. 7 (1): 41–49. <https://doi.org/10.17581/bp.2018.07107>
- [Pimenov, Lavrova] Пименов М.Г., Лаврова Т.В. 1985. *Magadania* — новый род семейства *Umbelliferae* эндемичный для северо-восточной Азии. — Бот. журн. 70 (4): 528–532.
- [Pimenov, Ostroumova] Пименов М.Г., Остроумова Т.А. 2012. Зонтичные (Umbelliferae) России. М. 477 с.
- Valiejo-Roman K.M., Shneyer V.S., Samigullin T.H., Terentieva E.I., Pimenov M.G. 2006. An attempt to clarify taxonomic relationships in “Verwandtschaftskreis der Gattung Ligusticum” (Umbelliferae-Apioideae) by molecular analysis. — *Plant Syst. Evol.* 257: 25–43.
- [Volkova] Волкова С.А. 2015. Кариотипы *Cnidium cniidifolium* и *C. olaënsis* (Apiaceae). — *Turczaninowia*. 18 (2): 76–79.
- [Volkova, Gorovoy] Волкова С.А., Горовой П.Г. 2011. Числа хромосом видов рода *Cnidium* (Apiaceae) Дальнего Востока и Аляски. — *Turczaninowia*. 14 (2): 145–147.
- [Yurtsev, Khokhryakov] Юрцев Б.А., Хохряков А.П. 1975. Анализ флоры Ольского плато (в связи с историей растительного покрова Колымского нагорья). — Бюл. МОИП. Отд. Биол. 80 (2): 120–133.
- [Zamoshch] Замощ М.Н. 2006. Климат побережья. — В кн.: Ландшафты, климат и природные ресурсы Тауйской губы Охотского моря. Владивосток. С. 117–137.

DISTRIBUTION AND PECULIARITIES OF BIOLOGY OF *MAGADANIA OLAËNSIS* (APIACEAE)

O. A. Mochalova^{a,#}, M. G. Khoreva^{a,##}, E. A. Andriyanova^a

^a*Institute of Biological Problems of the North FEB RAS*

Portovaya Str., 18, Magadan, 685000, Russia

[#]*e-mail: mochalova@inbox.ru*

^{##}*e-mail: mkhoreva@ibpn.ru*

Magadania olaënsis (Gorovoi et N.S. Pavlova) Pimenov et Lavrova is a species of the oligotypic genus *Magadania*, endemic to North-Eastern Asian Russia, included in the Red Data Book of the Russian Federation. Information on its distribution in the Magadan Region, phytocenotic confinement and some features of biology is given.

The herbarium specimens of *M. olaënsis* are kept in 4 herbaria: MAG — 38, VLA — 8, MHA — 5, MW — 1. The type specimen (holotypus) is deposited in VLA, the paratypes are probably lost. There are 39 specimens in digital Herbaria (MAG — 38, MW — 1).

The main part of the range of *M. olaënsis* is located in the Magadan Region. An isolated locality on the Dzhugdzhur Ridge in the Khabarovsk Territory is also known, 730 km away from the nearest localities in the Magadan Region (Island Spafaryev). The identified area of the range of *M. olaënsis*

in the Magadan Region is about 390 km². The largest part of the range (about 380 km²) is located on the Okhotsk–Kolyma watershed on the Ola Plateau, where the area of habitats with the highest population density (2500–3000 per km²) is about 1.5 km². Habitats on the coast of the Sea of Okhotsk take 4–5 km², and on the islands – 0.1–0.5 km². The total number of populations is approximately 4000–8500: 3500–7500 on the Okhotsk–Kolyma watershed, 600–900 on the coast, and about 50 plants on the islands.

M. olaënsis is a perennial monocarpic plant. The formation of generative shoots occurs at the age of 5–10 years. The number of generative plants in the populations is approximately the same in different years. However, there was the season when generative plants were missing in the populations on the coast. In a plant at the generative stage, in addition to the central inflorescence, 2 lateral inflorescences are usually formed (somewhat less often none or one, rarely 3–5 lateral inflorescences), but the seeds on them, even if formed, rarely reach full maturity. Real seed productivity varies significantly from year to year from 0 to 694, and averages from 146 to 326 mature seeds per plant. Seeds do not germinate at temperature +18...+22°C. The total germination percentage after two periods of stratification was 84±3.7%. Seeds of *M. olaënsis* are in dormancy of different depths and probably only partially germinate in the next growing season, while the rest germinate over the next few years.

M. olaënsis grows mainly in herb-shrub or shrub tundra, less often on open gravel screes at altitudes from over 700 to 1300 m a. s. l. (Okhotsk–Kolyma watershed, Zavyalov Island), or in communities with a large participation of forbs at 50–350 m a. s. l. (Atargan-Kharbiz coast, Spafaryev Island).

The main limiting factors are a strict ecological confinement of the species to basic rocks (mostly basalts), as well as exclusively seed reproduction and irregular seed renewal in different years.

Magadania olaënsis is a rare species (category 3), with III priority of conservation measures. According to the categories and criteria of the IUCN Red List the species is vulnerable (Vu). It is assigned to this category on the base of criterion B2a: a species with a limited range less than 2000 km² with a highly fragmented habitat area. Existing local protected areas in the Magadan Region do not provide protection of the species. Current data on its presence at the territory of the Dzhugdzhur Nature Reserve are contradictory and need to be clarified.

Keywords: protected species, endemic genus, *Magadania olaënsis*, population size, range, Magadan Region, Russian Far East, Red Data Book of Russian Federation

ACKNOWLEDGEMENTS

The work was carried out within the frameworks of the projects of Laboratory of Botany IBPN FEB RAS AA-AA-A17-117122590002-0, 1022040500936-0, and was partially supported by Rufford Small Grants Foundation, UK (2010–2011 – project 8284-1, 2012–2013 – project 11690-2) “The research and conservation of rare and threatened plants and its habitats in the Magadan Region (Northern Far East Asia, Russia)”. Complex expeditions to the Zavyalov and Spafaryev Islands were supported by grants from the Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences (09-III-D-06-305, 10-III-D-06-022, 13-III-D-06-020).

We are sincerely grateful for comprehensive help during investigations to S.D. Shvedov, V.P. Gartvik, E.S. and L.V. Timoshchenko for help in field work, to V.V. Yakubov (FSC Biodiversity FEB RAS) for photographs of specimens from VLA, to N.Yu. Stepanova and S.A. Poluektov (MBG RAS) for consultations and photographs of the herbarium material in MHA, to M.V.

Legchenko (BIN RAS) for confirming the absence of specimens in LE.

REFERENCES

- Andreev A.V. 2013. Etalony prirody Okhotsko-Kolym-skogo kraja [Okhotsk-Kolyma country: the standards of nature]. Magadan. 322 p. (In Russ.).
- Andriyanova E.A., Mochalova O.A. 2016. IAPT/IOPB chromosome data 21 (K. Marchold ed.). – Taxon. 65 (3): 673. <http://dx.doi.org/10.12705/653.44>
- GBIF.org (13 March 2023) GBIF Occurrence Download <https://doi.org/10.15468/dl.cpsyyw>
- Geologicheskiye pamyatniki Severo-Vostoka Rossii. Magadanskaya oblast' i Chukotskiy avtonomnyy okrug [Geological Natural Monuments, North-East of Russia. Magadan Region and Chukotka Autonomous Okrug]. 2021. Magadan. 120 p. (In Russ.).
- Gorovoy P.G., Pavlova N.S. 1972. A new species of *Cnidium* Cuss. from Magadan region. – Byulleten' Glavnogo botanicheskogo sada AN SSSR. 85: 47–49 (In Russ.).

- Ivanov Y.Y., Malakhova G.Y. 2014. Paleomagnetic evidence of campanian age of basalts of mygdykit formation of the ochotsk-chukchi volcanic belt, northeast of Russia. — *Fundamentalnyye issledovaniya*. 6 (7): 1432–1436 (In Russ.).
- Flora i rastitel'nost' Magadanskoy oblasti (konspekt sotsudistyykh rasteniy i ocherk rastitel'nosti [Flora and vegetation of Magadan Region (conspectus of vascular plants and outline of vegetation)]). 2010. Magadan. 364 p. (In Russ.).
- Khlynovskaya N.I. 1981. Agroklimaticheskoye rayonirovaniye Severo-Vostoka SSSR [Agro-climatic zoning of the North-East of the USSR]. Magadan. 10 p. + map (In Russ.).
- Khodachek E.A. 1996. Seed reproduction in Arctic environments. — *Opera Bot.* 132: 129–136.
- Khokhryakov A.P., Yurtsev B.A. 1974. Flora of the Olsk basalt plateau (Kolyma-Okhotsk watershed). — *Bulluyen MOIP, seria biologicheskaya*. 79 (2): 59–70 (In Russ.).
- Klugin N.K. 1970. Climate. — In: *Sever Dalnego Vostoka [North of the Far East]*. Moscow. P. 101–132 (In Russ.).
- Kozhevnikov A.E. 2007. Endemic element in the flora of the Russian Far East. — *Komarov Readings*. 54: 8–81 (In Russ.).
- Krasnaya kniga Khabarovskogo kraya: Redkiye i nakhodyashchiyesya pod ugrozoy ischeznoveniya vidy rasteniy i zhivotnykh. [Red Data Book of the Khabarovsk Territory: Rare and endangered species of plants and animals]. 2008c. Khabarovsk. 632 c. (In Russ.).
- Krasnaya kniga Khabarovskogo kraya (rasteniya, griby i zhivotnyye). [Red Data Book of the Khabarovsk Territory (plants, mushrooms and animals). 2019b. Voronezh. 604 p. (In Russ.).
- Krasnaya kniga Magadanskoy oblasti. Redkiye i nakhodyashchiyesya pod ugrozoy ischeznoveniya vidy rasteniy i zhivotnykh [Red Data Book of the Magadan Region. Rare and endangered species of plants and animals]. 2008a. Magadan. 430 p. (In Russ.).
- Krasnaya kniga Magadanskoy oblasti. Redkiye i nakhodyashchiyesya pod ugrozoy ischeznoveniya vidy zhivotnykh, rasteniy i gribov [Red Data Book of the Magadan Region. Rare and endangered species of animals, plants and fungi]. 2019a. Magadan. 356 p. (In Russ.).
- Krasnaya kniga Rossiiskoi Federatsii (rasteniya i griby) [Red Data Book of Russian Federation (plants and fungi)]. 2008b. Moscow. 855 p. (In Russ.).
- Krasnaya kniga RSFSR. Rasteniya [Red Data Book of RSFSR. Plants]. 1988. Moscow. 855 p. (In Russ.).
- Mochalova O.A. 2023. Flora of the Arman basalt plateau (Magadan Region, Russia). — *Vestnik SVNTs FEB RAS [Vestnik of the North East Science Center FEB RAS]*. 3: 60–66 (In Russ.).
<https://doi.org/10.34078/1814-0998-2023-3-60-66>.
- Mochalova O.A., Khoreva M.G., Andriyanova E.A. 2022. New locations of vascular plants from the Red Data Book of the Magadan Region. — *Vestnik SVNTs DVO RAN [Vestnik of the North East Science Center FEB RAS]*. 2: 92–95 (In Russ.).
<https://doi.org/10.34078/1814-0998-2022-2-92-95>
- Ostroumova T.A. 2018. Fruit micromorphology in the Umbelliferae of the Russian Far East. — *Botanica Pacifica. A journal of plant science and conservation*. 7 (1): 41–49.
- Pimenov M.G., Lavrova T.V. 1985. *Magadania* is a new genus of the family Umbelliferae endemic for North-Eastern Asia. — *Bot. Zhurn.* 70 (4): 528–532 (In Russ.).
- Pimenov M.G., Ostroumova T.A. 2012. *Zontichnyye (Umbelliferae) Rossii [Umbelliferae of Russia]*. Moscow. 477 p. (In Russ.).
- Valiejo-Roman K.M., Shneyer V.S., Samigullin T.H., Terentieva E.I., Pimenov M.G. 2006. An attempt to clarify taxonomic relationships in “Verwandtschaftskreis der Gattung Ligusticum” (Umbelliferae-Apioideae) by molecular analysis. — *Plant Syst. Evol.* 257: 25–43.
- Volkova S.A. 2015. Karyotypes of *Cnidium cnidiifolium* и *C. olaense* (Apiaceae). — *Turczaninowia*. 18 (2): 76–79 (In Russ.).
- Volkova S.A., Gorovoy P.G. 2011. Chromosome numbers of *Cnidium* (Apiaceae) species from the Russian Far East and Alaska. — *Turczaninowia*. 14 (2): 145–147 (In Russ.).
- Yurtsev B.A., Khokhryakov A.P. 1975. Analysis of the flora of the Ola Plateau (in connection with the history of the vegetation cover of the Kolyma Highlands). — *Bulluyen MOIP, seria biologicheskaya*. 80 (2): 120–133 (In Russ.).
- Zamoshch M.N. 2006. Climate of the coast. — In: *Landshafty, klimat i prirodnyye resursy Tauyskoy guby Okhotskogo morya [Landscapes, climate and natural resources of the Tauyskaya Bay of the Sea of Okhotsk]*. Vladivostok. P. 117–137 (In Russ.).

Приложение. Список образцов *Magadania olaënsis* из Магаданской области, хранящихся в MAG
Appendix. List of herbarium specimens of *Magadania olaënsis* from Magadan Region deposited in MAG

Номер образца Barcode	Координаты места сбора Coordinates	Район District	Место сбора Locality	Экология Habitat	Дата Date	Собрал Collected by	Определил Identified by
MAG 0005404	59° 32' 40.78" N, 151° 30' 10.76" E	Ольский район	Окрестности Атарганской косы, хребет в основании косы	верхняя часть ю.-зап. экс., разреженный каменноберезняк с караганой гривастой	08.06.2020	Хорева М.Г.	Хорева М.Г.
MAG 0013278	59° 32' 42.07" N, 151° 30' 16.38" E	Ольский район	пос. Атарган	луговой приморский склон, h-500 м	28.07.1983	Мазурен- ко М.Т.	Мазурен- ко М.Т.
MAG 0013280	59° 32' 42.07" N, 151° 30' 16.38" E	Ольский район	пос. Атарган	луговой приморский склон, h-500 м	28.07.1983	Мазурен- ко М.Т.	Мазурен- ко М.Т.
MAG 0013281	59° 30' 30.05" N, 151° 31' 19.27" E	Ольский район	пос. Атарган, h-400 м, юж- ная экспо- зиция мыса Харбис	остепненный склон	09.06.1979	Мазурен- ко М.Т., Ершова С.В., Хохря- ков А.П.	Хохря- ков А.П.
MAG 0013282	59° 32' 34.12" N, 151° 30' 18.25" E	Ольский район	пос. Атарган, h-600 м	кустарничковая тундра	10.09.1979	Мазурен- ко М.Т., Ершова С.В., Хохря- ков А.П.	Хохря- ков А.П.
MAG 0013283	59° 33' 2.45" N, 151° 29' 52.91" E	Ольский район	пос. Атарган, в распадке ручья	щебнистый склон северной экспозиции	02.08.1978	Иконни- кова О.А., Тузов О.А.	Хохря- ков А.П.
MAG 0013284	59° 33' 2.45" N, 151° 29' 52.91" E	Ольский район	пос. Атарган, в распадке ручья	щебнистый склон северной экспозиции	02.08.1978	Иконни- кова О.А., Тузов О.А.	Хохря- ков А.П.
MAG 0013285	59° 5' 46.72" N, 150° 43' 38.34" E	Ольский район	о. Завьялова	каменистый склон	23.08.1976	Ершова С.В., Хохря- ков А.П.	Хохря- ков А.П.
MAG 0013286	59° 5' 46.72" N, 150° 43' 38.34" E	Ольский район	о. Завьялова	каменистый склон	23.08.1976	Ершова С.В., Хохря- ков А.П.	Хохря- ков А.П.
MAG 0013287	59° 6' 22.86" N, 150° 43' 36.07" E	Ольский район	о. Завьялова, северная часть, около 850 м н.у.м.	каменистый кустарничково- лишайниковый склон северной экспозиции	15.08.2009	Хорева М.Г.	Хорева М.Г.
MAG 0013288	59° 6' 52.96" N, 148° 58' 35.94" E	Ольский район	о. Спафарь- ева, южный массив, близ репера	приморский склон южной экспозиции, разнотравный луг	22.07.2013	Хорева М.Г.	Хорева М.Г.
MAG 0013289	60° 35' 43.44" N, 151° 21' 31.1" E	Хасынский район	Ольское плато, г. Скиф, южные склоны в окр. руч. Глинистого	кустарничково- разнотравный лужок	05.08.2011	Мочало- ва О.А.	Мочало- ва О.А.

MAG 0013290	60°38'36.82"N, 151°10'54.66"E	Хасынский район	Ольское плато, верховья Олы. Водо- раздел Бу- лума и Нила	разнотравно- кустарничковая тундра по склону	04.08.2011	Мочало- ва О.А.	Мочало- ва О.А.
MAG 0013291	60°41'9.46"N, 151°12'45.83"E	Хасынский район	Ольское плато, верховья Олы. Водо- раздел рр. Олы и Хуренди	кустарничковая тундра на плато	03.08.2011	Мочало- ва О.А.	Мочало- ва О.А.
MAG 0013292	60°35'43.44"N, 151°21'31.1"E	Хасынский район	Ольское плато, верховья Олы, левый исток ("усы")	кустарничковые заросли ольховника со стлаником по склону	05.08.2011	Мочало- ва О.А.	Мочало- ва О.А.
MAG 0013293	60°35'43.44"N, 151°21'31.1"E	Хасынский район	Ольское плато, г. Скиф, южные склоны в окр. руч. Глинистого	кустарничковые тундры, обычна	05.08.2011	Мочало- ва О.А.	Мочало- ва О.А.
MAG 0013294	60°37'7.14"N, 151°14'21.01"E	Хасынский район	Ольское плато, г. Скиф, в окр. руч. Базальтового	южные склоны	31.08.2011	Мочало- ва О.А.	Мочало- ва О.А.
MAG 0013295	60°39'25.31"N, 151°13'24.14"E	Хасынский район	верховья р. Олы, плато над правым склоном каньона Олы	тундра лишайниково- кустарничково- разнотравная	04.08.2001	Андрия- нова Е.А.	Андрия- нова Е.А.
MAG 0013296	60°37'54.86"N, 151°33'59.49"E	Хасынский район	истоки Малтана	щебнистый склон, базальт	04.09.1970	Хохря- ков А.П.	Хохря- ков А.П.
MAG 0013297	60°37'43.5"N, 151°34'26.08"E	Хасынский район	истоки Малтана	щебнистый склон, базальт	04.09.1970	Хохря- ков А.П.	Хохря- ков А.П.
MAG 0013305*	60°27'15.98"N, 151°22'58.4"E	Хасынский район	150 км Колымской трассы, пос. Яблоне- вый, правый берег р. Олы	щебнистый склон в разреженном кедровом стланике	10.08.1978	Тузов О.А., Хохря- ков А.П.	Хохря- ков А.П.
MAG 0013306*	60°27'15.98"N, 151°22'58.4"E	Хасынский район	150 км Колымской трассы, пос. Яблоне- вый, правый берег р. Олы	щебнистый склон в разреженном кедровом стланике	10.08.1978	Тузов О.А., Хохря- ков А.П.	Хохря- ков А.П.
MAG 0013307*	60°28'58.58"N, 151°28'33.82"E	Хасынский район	150 км трассы	пологие каменистые скалы	20.08.1972	Хохря- ков А.П.	Хохря- ков А.П.

MAG 0014324*	60°27'45.58"N, 151°29'24.04"E	Хасынский район	руч. Неорчан в нескольких км севернее верхнего Ольского моста	около останцов на склоне сопки к ручью	04.06.2019	Мочало- ва О.А.	Мочало- ва О.А.
MAG 0014328	60°27'25.6"N, 151°30'57.82"E	Хасынский район	седловина на истоках руч. Звездного и притока Неорчана (напротив пос. Яблоневый)	мохово-кустар- ничковый уча- сток на склоне рядом с седло- виной	04.06.2019	Мочало- ва О.А.	Мочало- ва О.А.
MAG 0011715	60°22'24.08"N, 150°50'01.82"E	Хасынский район	верховья р. Аган, склоны горы севернее г. Трог	истоки ручейка, стекающего с горы	18.06.2021	Мочало- ва О.А.	Мочало- ва О.А.
MAG 0015602	60°17'07.41"N, 150°29'32.54"E	Хасынский район	левобережье средней Армани, водораздел руч. Крохаля и Тихого. Г. 1253 м (Базальтовая)	около останцов в привершинной части	29.06.2022	Мочало- ва О.А.	Мочало- ва О.А.
MAG 0015604	60°17'07.50"N, 150°29'32.47"E	Хасынский район	левобережье средней Армани, водораздел руч. Крохаля и Тихого. Г. 1253 м (Базальтовая)	около останцов в привершинной части	29.06.2022	Мочало- ва О.А.	Мочало- ва О.А.
MAG 0013308	60°38'18.67"N, 151°4'5.48"E	Тенькин- ский район	Ольское плато, верх. р. Нил		09.08.1971	Хохря- ков А.П.	Хохря- ков А.П.
MAG 0013309	60°38'18.67"N, 151°4'5.48"E	Тенькин- ский район	Ольское плато, Нил	кустарниковая каменистая тундра	00.00.1971	Хохря- ков А.П.	Хохря- ков А.П.
MAG 0013310	60°38'18.67"N, 151°4'5.48"E	Тенькин- ский район	Ольское плато, Нил	кустарниковая каменистая тундра	00.00.1971	Хохря- ков А.П.	Хохря- ков А.П.
MAG 0013298	60°37'54.86"N, 151°33'59.49"E	Тенькин- ский район	Ольское плато	на щебенке	18.08.1971	Хохря- ков А.П.	Хохря- ков А.П.
MAG 0013299	60°38'18.67"N, 151°4'5.48"E	Тенькин- ский район	Ольское плато, верх. р. Нил		09.08.1971	Хохря- ков А.П.	Хохря- ков А.П.
MAG 0013300	60°38'18.67"N, 151°4'5.48"E	Тенькин- ский район	Ольское плато, верх. р. Нил		09.08.1971	Хохря- ков А.П.	Хохря- ков А.П.

MAG 0013301	60° 39' 8.12" N, 150° 54' 2.64" E	Тенькин- ский район	Ольское плато, г. Ледяная (Лебединая)	травянистый склон	26.07.1981	Мазурен- ко М.Т., Хохряков П.	Хохря- ков А.П.
MAG 0013302	60° 39' 8.12" N, 150° 54' 2.64" E	Тенькин- ский район	Ольское плато, г. Ледяная (Лебединая)	травянистый склон	26.07.1981	Мазурен- ко М.Т., Хохряков П.	Хохря- ков А.П.
MAG 0013303	60° 39' 8.12" N, 150° 54' 2.64" E	Тенькин- ский район	Ольское плато, г. Ледяная (Лебединая)	кустарничковая тундра	26.07.1981	Мазурен- ко М.Т., Хохряков П.	Хохря- ков А.П.
MAG 0013304	60° 38' 18.67" N, 151° 4' 5.48" E	Тенькин- ский район	Ольское плато, Нил	кустарниковая каменистая тундра	00.00.1971	Хохря- ков А.П.	Хохря- ков А.П.

Примечание. Звездочкой (*) отмечены топотипы. Жирным шрифтом выделены образцы, упомянутые как *specimina examinata* (Pimenov, Lavrova, 1985).

Note. Topotypes are marked with an asterisk*. The specimens referred to as “*specimina examinata*” (Pimenov, Lavrova, 1985) are highlighted in bold.

СООБЩЕНИЯ

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОМНОЙ ДНК *MYRICA GALE* (MYRICACEAE)
НА ТЕРРИТОРИИ ГОСУДАРСТВЕННОГО ПРИРОДНОГО
ЗАКАЗНИКА “ЛЕБЯЖИЙ” (ЮЖНОЕ ПОБЕРЕЖЬЕ ФИНСКОГО
ЗАЛИВА)

© 2024 г. О. А. Семичева^{1,2}, У. А. Галактионова^{1,2}, В. Н. Большаков¹, А. Э. Романович²,
М. Ю. Тиходеева², О. Н. Тиходеев^{2,*}

¹ООО “Вега” ГК “Алкор Био”

Железнодорожный пр., 40а, Санкт-Петербург, 192148, Россия

²Санкт-Петербургский государственный университет

Университетская наб., 7/9/11, Санкт-Петербург, 199034, Россия

*e-mail: tikhodeyev@mail.ru, o.tikhodeev@spbu.ru

Поступила в редакцию 24.11.2023 г.

После доработки 01.12.2023 г.

Принята к публикации 05.12.2023 г.

Анализ полиморфизма геномной ДНК — один из широко используемых подходов при изучении генетической структуры природных популяций. Его успешно применяют к различным видам растений. Но многие виды пока практически не исследованы, что в первую очередь связано с методическими сложностями при выделении хорошо очищенной геномной ДНК. Эти сложности связаны с тем, что для растений характерны многочисленные органические соединения (полисахариды, полифенолы, липиды и т.п.), загрязняющие ДНК и значительно снижающие ее качество. К числу таких видов относится восковник болотный (*Myrica gale* L.) — многолетний приатлантический кустарник, размножающийся главным образом вегетативно (проростки восковника встречаются в природе очень редко). Мы разработали простой протокол выделения высококачественной геномной ДНК из листьев восковника и провели AFLP-анализ 42 растений этого вида из трех субпопуляций на территории природного заказника “Лебяжий”. Используя три пары праймеров, вычленили 22 фрагмента амплификации, 8 из которых оказались мономорфными. По остальным 14 фрагментам средний уровень их полиморфизма был невысок: в зависимости от исследованной субпопуляции он варьировал от 0.079 до 0.129. Как показал проведенный нами анализ, все три исследованные субпопуляции восковника оказались полиморфными с преобладанием двух общих AFLP-генотипов. По-видимому, соответствующие растения являются вегетативными потомками основателей данной популяции. Обнаруженные редкие AFLP-генотипы (представлены всего одним или двумя растениями; в общей сложности таких генотипов выявлено 12), вероятно, возникли в результате мутационных и рекомбинационных процессов. Полученные данные свидетельствуют о том, что в воспроизведении и расселении восковника роль полового размножения тоже существенна.

Ключевые слова: Красная книга РФ, *Myrica gale* L., периферические популяции, геномная ДНК, AFLP-анализ, генетический полиморфизм

DOI: 10.31857/S0006813624010053, **EDN:** EXQPZP

Myrica gale L. (восковник болотный) — многолетний двудомный листопадный кустарник из семейства Myricaceae. Приурочен к сильно увлажненным умеренно-бореальным приатлантическим экотопам Северного полушария.

В Европе наиболее обилен на Британских островах и в Фенноскандии. На территории Российской Федерации встречается только в Карелии и Ленинградской области (Komarov, 1936; Ivanter, Kuznetsov, 2007; Volkova et al., 2021),

это самые восточные популяции в ареале вида. Как правило, они сравнительно малочисленны (обычно не более двухсот-трехсот растений), причем некоторые испытывают сильное антропогенное воздействие, что приводит к их сокращению и угрозе исчезновения. Соответственно, данный вид растений включен в Красную книгу РФ (The Red Book..., 2008) со статусом “редкий” (категория 3).

Одной из интересных биологических особенностей восковника является его преимущественно вегетативное размножение (Poore, 1956; Skene et al., 2000). Дело в том, что соотношение полов у данного вида резко сдвинуто в сторону мужских растений: женские обычно составляют абсолютное меньшинство, а в некоторых природных популяциях не отмечены вовсе (Ivanter, Kuznetsov, 2007; Volkova et al., 2021). Кроме того, даже в самых благоприятных условиях всхожесть семян восковника невысока (Schwintzer, Ostrofsky, 1989; Skene et al., 2000). Его проростки встречаются в природе редко (Poore, 1956), а их жизнеспособность зависит от многих факторов, в том числе от симбиотических отношений с азотфиксирующими актиномицетами из рода *Frankia* (Bond, 1951; Schwintzer, Lancelle, 1983; Schwintzer, Ostrofsky, 1989; Crocker, Schwintzer, 1993). Соответственно, принято считать, что у восковника роль полового размножения весьма невелика (Poore, 1956; Skene et al., 2000).

Перечисленные факты позволяют предположить, что многие популяции восковника, особенно периферические, имеют сугубо клональное происхождение, т.е. представлены ракетами одного и того же генотипа. Чтобы проверить справедливость этой гипотезы, необходимо провести молекулярно-генетический анализ растений восковника из достаточно крупной популяции, находящейся на краю ареала и в значительной степени изолированной от других популяций. Однако таких исследований не проводили.

Генетических данных о восковнике крайне мало. Предполагают, что он является гексаплоидом: для этого вида характерно 48 хромосом при $n = 8$ для семейства Mугісасеае (MacDonald, 1989; Skene et al., 2000). Молекулярно-генетические данные о восковнике сводятся к результатам штрих-кодирования (de Vere et al., 2012;

Kuzmina et al., 2017) и отдельным геномным последовательностям в GeneBank. В этих работах были использованы дорогостоящие методы на основе зарубежных коммерческих наборов реагентов (de Vere et al., 2012) или автоматизированных систем для выделения ДНК (Kuzmina et al., 2017). Наше исследование требовало более дешевых подходов.

Проблема осложняется тем, что для восковника характерен широкий спектр соединений, затрудняющих выделение высококачественной геномной ДНК. К подобным соединениям в первую очередь относятся полисахариды, липиды и полифенолы (Rogers, Bendich, 1985; 1989; Dairawan, Shetty, 2020; Ryabushkina et al., 2012; Aggarwal et al., 2022; Galaktionova et al., 2023). Между тем высокоточные молекулярно-генетические методы, в частности широко используемый AFLP-анализ (Amplified Fragment Length Polymorphism; Vos et al., 1995; Blears et al., 1998; Mueller, Wolfenbarger, 1999, требуют хорошего уровня очистки ДНК.

Показано, что стебли и листья *Myrica gale* покрыты многочисленными железистыми трихомами, выделяющими широкий спектр липидов, в том числе восков (Svoboda et al., 1998; Popovici et al., 2008). В экссудатах генеративных и вегетативных органов присутствуют разнообразные флавоноиды и эфирные масла (Malterud, 1992; Popovici et al., 2008; 2010; Rosa et al., 2020). Благодаря десяткам вариантов полифенолов восковник проявляет отчетливо выраженную лекарственную, фитотоксическую, репеллентную и антимикробную активность (Blackwell et al., 2003; Sylvestre et al., 2005; Popovici et al., 2008; 2011; Silva et al., 2015; Rosa et al., 2020). Таким образом, восковник является сложным объектом для выделения высококачественной геномной ДНК.

В настоящей работе предложен простой протокол, позволяющий выделять из восковника геномную ДНК, пригодную для последующего AFLP-анализа. Используя данный протокол, мы исследовали генетический полиморфизм восковника, произрастающего на территории государственного природного заказника “Лебяжий” (южное побережье Финского залива). Этот локус выбран нами по трем причинам. Во-первых, местная популяция восковника — одна из самых крупных в Ленинградской области. Во-вторых, она находится на значительном



Рис. 1. Заросли восковника в субпопуляции А.

Fig. 1. *Myrica gale* thickets in subpopulation A.

удалении (более 25 км) от других известных популяций данного вида, т.е. в достаточно высокой степени изолирована от них. В-третьих, выбранный локус неоднороден, в результате чего исследованная нами популяция разделена на три обособленные субпопуляции в трактовке Беклемишева (Beklemishev, 2015). Анализируя генетический полиморфизм этих субпопуляций, мы проверяли справедливость гипотезы о том, что каждая из них имеет сугубо клональное происхождение, т.е. представлена ракетами одного и того же AFLP-генотипа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Место исследования. Растительный материал собирали в государственном природном заказнике регионального значения “Лебяжий” (Ломоносовский р-н, Ленинградская обл.), а также непосредственно прилегающих к нему территориях. Для данного заказника характерны эталонные приморские ландшафты южного берега Финского залива. К их числу относятся мелководная часть акватории и прибрежная зона, представленная вытянутыми вдоль берега дюнными песчаными грядами, чередующимися с межгрядовыми понижениями. Гряды заняты разреженными зеленомошными сосняками с брусникой, вороникой и вереском. Межгрядовые понижения заболочены. В экотонах болот с сосняками сформировались заросли черноольшаников. Местная популяция восковника представлена тремя субпопуляциями, удаленными на разное расстояние от Финского залива и отделенными друг от друга песчаными грядами с сосняками.

Субпопуляция А (рис. 1). Произрастает на песчаном участке, отделенном от Финского залива первой узкой дюнной грядой и сформировавшимися за ней зарослями тростника. При изменении уровня воды в заливе и во время весеннего снеготаяния регулярно затопляется. Испытывает интенсивную рекреационную нагрузку. Восковник произрастает узкой прерывистой полосой на границе между зарослями тростника и второй песчаной грядой с сосняком бруснично-вороничным. В полосе тростниковых зарослей (ширина 50–60 м) помимо *Phragmites australis* (проективное покрытие 80%) произрастает *Galium palustre* (5%), *Carex acuta* (3%), *C. elangata* (1%), *Sium latifolium* (1%) и мхи (10%): *Sphagnum squarrosum*, *Sphagnum* sp., *Calliergon cuspidatum*. В древостое сосняка бруснично-вороничного кроме *Pinus sylvestris* (высотой 12–15 м) отмечена *Sorbus aucuparia* (2–4 м), а также единичные особи *Viburnum opulus* (0.6 м) и *Aronia melanocarpa* (0.7 м). В напочвенном покрове преобладает *Impetrum nigrum* (30%), *Vaccinium vitis-idaea* (20%), *V. myrtillus* (3%), *Deschampsia caespitosa* (7%), *Carex nigra* (2%), *Fragaria vesca* (5%) и *Melica nutans* (2%). Отмечены единичные экземпляры *Luzula pilosa* и *Hieracium umbellatum*. Из-за вытаптывания моховой покров практически отсутствует. В зоне произрастания

восковника, достигающего покрытия до 60%, встречается *Alnus glutinosa* (10–12 м), *Frangula alnus* (1.5–3 м), *Salix cinerea* (2.5 м) и *S. starkeana* (3 м). Напочвенный покров состоит из *Chamaepericlymenum suecicum* (до 15%), *Phragmites australis* (10%), *Calamagrostis epigeios* (3%), *Sium latifolium* (2%), *Galium palustre* (1%), *Carex acuta* (1%), *C. elangata* (1%). Эта субпопуляция разбита на фрагменты, различающиеся по виталитету растений. В некоторых фрагментах высота восковника составляет 1.2 м, в других восковник активно усыхает, его высота не превышает 0.7 м. Обнаружены только мужские растения.

Субпопуляция Б (рис. 2). Произрастает в понижении за второй дюнной грядой в низинном мезо-евтрофном болоте, облесенном по краевым кочкам ольхой черной и березой пушистой. Восковник присутствует как в облесенной, так и в болотной зоне, частично заходя до центра последней. На освещенных участках он демонстрирует высокий виталитет (высота растений 1.0–1.4 м, покрытие 40%). Резко преобладают мужские растения, но встречаются и единичные женские. Среди травянистых растений наблюдается чередование доминирования *Phragmites australis* (10–40%) и *Eriophorum vaginatum* (5–30%), а также *Carex acuta* (5–20%), *C. elangata* (5%), *Viola epipsela* (5%), *Comarum palustre* (5%), *Menyanthes trifoliata* (2%), *Calla palustris* (2%), *Naumburgia thyrsofolia* (1%) и др. В облесенной части – *Alnus glutinosa* (4–6 м), *Betula pubescens* (до 8 м), *Pinus sylvestris* (7–8 м) и *Salix cinerea* (до 3 м). В напочвенном покрове произрастают *Phragmites australis* (40%), *Carex rostrata* (10%), *Carex elangata* (10%), *Eriophorum vaginatum* (3%), *Calla palustris* (2%), *Agrostis canina* (2%), *Dryopteris cartusiana* (2%), *Comarum palustre* (1%). Из мхов на обоих участках преобладает *Sphagnum squarrosum* и *Sphagnum centrale*.

Субпопуляция В (рис. 3) наиболее удалена от Финского залива. Отделена от субпопуляции Б широкой песчаной грядой с проложенной по ней дорогой, окруженной березо-сосняком восковниково-сфагновым. Восковник характеризуется высоким виталитетом, высота растений 1.0–1.2 м. Все растения мужские, но на одном зафиксирован небольшой женский побег. Древостой низкой сомкнутости (0.3–0.4) состоит из *Pinus sylvestris* (7–11 м), *Betula pubescens* (5–8 м), *Alnus glutinosa* (4–6 м), *Salix cinerea* (3 м).



Рис. 2. Заросли восковника в субпопуляции Б.

Fig. 2. *Myrica gale* thickets in subpopulation B.

В напочвенном покрове присутствуют *Carex rostrata* (10%), *Carex elangata* (10%), *Eriophorum vaginatum* (30%), *Calla palustris* (2%), *Comarum palustre* (2%), *Naumburgia thyrsofolia* (1%) и мхи: *Sphagnum centrale* (10%), *Sphagnum fallax* (10%), *S. squarrosum* (30%), *Polytrichum commune* (1%).

Несмотря на близкое расположение друг к другу и несомненное отсутствие строгой изоляции (особенно во время сильных наводнений), каждая из трех перечисленных субпопуляций заслуживает отдельного внимания в связи с разнородностью от Финского залива.

Сбор растительного материала. Материал собирали в мае – июне 2022–2023 гг. Как показали



Рис. 3. Заросли восковника в субпопуляции В.

Fig. 3. *Myrica gale* thickets in subpopulation C.

наши предыдущие исследования (Galaktionova et al., 2023), даже молодые листья восковника, собранные в природе, малопригодны для выделения высококачественной геномной ДНК из-за высокого содержания восков (неслучайно вид получил такое название). Поэтому мы модифицировали сбор растительного материала. Выбирали побег с неполностью раскрытыми почками, отрезали его верхнюю часть (5–6 почек), помещали отрезанную часть побега в бутылку с питьевой водой и выдерживали при комнатной температуре в течение недели. В этих условиях происходило интенсивное раскрытие вегетативных почек, в результате чего развивались обильно облиственные, быстро растущие боковые побеги без заметных признаков накопления восков. По мере формирования листовых пластинок восковника мы собирали их в пластиковые пробирки и немедленно замораживали в холодильнике при -70°C . Такой свежемороженый растительный материал, полученный из листьев с малым содержанием восков (в дальнейшем мы называем его “оптимизированным биоматериалом восковника”), длительное время хорошо сохраняет ДНК и легко гомогенизируется.

Выделение геномной ДНК из оптимизированного биоматериала восковника. За основу мы взяли максимально упрощенный протокол, разработанный для выделения геномной ДНК из свежих листьев резуховидки Таля (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) (Kotchoni, Gachomo, 2009).

Адаптируя данный протокол к оптимизированному биоматериалу восковника, мы внесли в него несколько изменений, что позволило значительно повысить качество выделяемой геномной ДНК. Модифицированный протокол выглядит следующим образом:

20–50 мг оптимизированного биоматериала восковника быстро переносили в охлажденную на льду микроцентрифужную пробирку объемом 1.5 мл и тщательно гомогенизировали пластиковым пестиком;

к полученному гомогенату добавляли 800 мкл лизирующего раствора (0.5 M NaCl, 2%-й SDS, 1%-й поливинилпирролидон МВ 40 КДа), vortexировали в течение 20 с, инкубировали с перемешиванием при комнатной температуре в течение 10 мин, после чего оставляли на льду на 10 мин. Полученную смесь центрифугировали при 13000 об/мин 4 минуты при комнатной температуре;

надосадочную жидкость (около 400 мкл) аккуратно переносили в чистую микроцентрифужную пробирку, добавляли равный объем холодного изопропанола и аккуратно перемешивали, переворачивая пробирку в течение 2 минут. Полученную смесь центрифугировали при 13000 об/мин, 30 минут при комнатной температуре;

аккуратно удаляли надосадочную жидкость, к полученному осадку добавляли 500 мкл отмывочного раствора (1 M гуанидин изотиоцианат,

Таблица 1. Названия и последовательности олигонуклеотидов, использованных в работе
Table 1. Names and sequences of the oligonucleotides used

Название олигонуклеотида Oligonucleotide name	Нуклеотидная последовательность (5' → 3') Base sequence (5' → 3')
Адаптеры для реакции лигирования с фрагментами рестрикции Adapters for ligation with the restriction fragments	
EcoRI-AF	CTCGTAGACTGCGTACC
EcoRI-AR	AATTGGTACGCAGTCTAC
Tru9I-AF	GACGATGAGTCCTGAG
Tru9I-AR	TACTCAGGACTCA
Праймеры для реакции преамплификации Primers for preamplification	
EcoRI-PA	GACTGCGTACCAATTC
Tru9I-PA	GATGAGTCCTGAGTAA
Праймеры для реакции селективной амплификации Primers for selective amplification	
F-EcoRI-CAT	FAM-GACTGCGTACCAATTCCAT
F-EcoRI-ATG	FAM-GACTGCGTACCAATTTCATG
F-EcoRI-AAT	FAM-GACTGCGTACCAATTCAAT
Tru9I-CTT	GATGAGTCCTGAGTAACTT

Примечание. FAM – флуорофор флуоресцеин.
Note. FAM – fluorophore fluorescein.

50%-й изопропанол), вортексировали в течение 20 с и инкубировали в шейкере при 500 об/мин 5 мин при комнатной температуре. Полученную смесь центрифугировали при 13000 об/мин 10 минут при комнатной температуре;

аккуратно удаляли надосадочную жидкость, к полученному осадку добавляли 500 мкл холодного 70%-го этанола, вортексировали в течение 30 с и инкубировали 2 мин при комнатной температуре. Полученную смесь центрифугировали при 13000 об/мин 10 минут при комнатной температуре;

аккуратно удаляли надосадочную жидкость, держали пробирку открытой до полного испарения этанола, затем добавляли 100 мкл деионизированной воды и аккуратно перемешивали до растворения осадка. Полученный раствор геномной ДНК хранили при –20°С для последующего использования.

Качество выделенной ДНК проверяли методом электрофореза в 1%-м агарозном геле с окраской бромистым этидием (в качестве маркера длин фрагментов использовали ДНК-маркер Sky-High, “Биолабмикс”, Россия). Количество выделенной ДНК определяли на

флуориметре Qubit-1 (Thermo Fisher Scientific, США) набором QuDye dsDNA HS Assay Kit (Lumiprobe, Россия) согласно инструкциям производителей.

Получение флуоресцентно меченных фрагментов ДНК для AFLP-анализа. В качестве основы мы использовали протокол, описанный в статье (Blignaut et al., 2013). Мы оптимизировали данный протокол, используя в нем следующие реагенты:

эндонуклеаза рестрикции (рестриктаза) EcoR I с 10x SE-буфером EcoRI (ООО “СибЭнзайм”, Россия),

рестриктаза Tru9 I с 10x SE-буфером W (ООО “СибЭнзайм”, Россия) – изошизомер рестриктазы Mse I,

T4 ДНК лигаза с 10x Overnight ligation buffer (“Евроген”, Россия), мастер-микс для ПЦР БиоМастер LR HS-ПЦР (2×) (“Биолабмикс”, Россия),

мастер-микс для ПЦР БиоМастер LR HS-ПЦР (2×) (“Биолабмикс”, Россия).

Все необходимые олигонуклеотиды были заказаны и синтезированы в ООО “Вега” ГК “Алкор Био” (Россия). Названия и нуклеотидные

Таблица 2. Координаты проанализированных растений *Myrica gale*
Table 2. Coordinates of the analyzed *Myrica gale* plants

Субпопуляция А Subpopulation A		Субпопуляция Б Subpopulation B		Субпопуляция В Subpopulation C	
59°95'07.66"	29°56'79.95"	59°95'54.96"	29°55'70.20"	59°95'55.59"	29°55'60.14"
59°95'07.79"	29°56'79.97"	59°95'54.83"	29°55'68.37"	59°95'55.33"	29°55'61.67"
59°94'93.90"	29°57'22.05"	59°95'54.68"	29°55'67.19"	59°95'55.79"	29°55'41.88"
59°94'96.93"	29°57'24.57"	59°95'54.71"	29°55'67.18"	59°95'55.78"	29°55'41.98"
59°94'96.14"	29°57'25.57"	59°95'54.72"	29°55'67.39"	59°95'55.32"	29°55'41.86"
59°94'93.65"	29°57'29.05"	59°95'54.74"	29°55'67.44"	59°95'55.42"	29°55'40.63"
59°94'91.33"	29°57'31.30"	59°95'54.72"	29°55'67.41"	59°95'55.62"	29°55'40.70"
59°94'90.32"	29°57'32.46"	59°95'54.72"	29°55'67.41"	59°95'55.80"	29°55'42.11"
59°94'90.28"	29°57'33.27"	59°95'54.75"	29°55'67.39"	59°95'55.71"	29°55'42.02"
		59°95'54.75"	29°55'67.38"	59°95'55.58"	29°55'40.69"
		59°95'54.76"	29°55'67.18"	59°95'55.33"	29°55'39.29"
		59°95'54.75"	29°55'67.36"	59°95'55.25"	29°55'38.19"
		59°95'54.81"	29°55'66.05"	59°95'55.19"	29°55'37.98"
				59°95'55.02"	29°55'36.21"
				59°95'55.25"	29°55'34.02"
				59°95'55.38"	29°55'33.81"
				59°95'55.49"	29°55'33.60"
				59°95'55.63"	29°55'33.43"
				59°95'55.71"	29°55'33.05"
				59°95'55.86"	29°55'29.84"

последовательности олигонуклеотидов приведены в табл. 1.

Реакция с рестриктазой EcoR I. К 200–300 нг геномной ДНК добавляли 5 е.а. EcoR I, 1х SE-буфер W и деионизированную воду до объема 30 мкл. Реакцию проводили в ПЦР-амплификаторе при +37°C в течение 4 часов. Для окончания реакции рестриктазу инактивировали при +65°C в течение 20 мин. Качество реакции проверяли методом электрофореза в 1.5%-м агарозном геле с окраской бромистым этидием (10 мкл реакции на дорожку).

Реакция с рестриктазой Tru9 I. В пробирку с геномной ДНК, обработанной рестриктазой EcoR I (20 мкл), добавляли 5 е.а. Tru9 I, 1 мкл 10х SE-буфера W и деионизированную воду до объема 30 мкл. Реакцию проводили в ПЦР-амплификаторе при +65°C в течение 4 часов. Для окончания реакции рестриктазу инактивировали при +80°C в течение 20 мин. Полученную смесь хранили при температуре –20°C до проведения реакции лигирования.

Подготовка адаптеров к лигированию. Непосредственно перед реакцией лигирования адаптеры EcoRI-AF (5 мкМ) и EcoRI-AR (5 мкМ) смешивали в пропорции 1 : 1 в пробирке, инкубировали при +95°C в течение 5 минут, а затем охлаждали при комнатной температуре в течение 10 мин. Аналогично адаптеры Tru9I-AF (50 мкМ) и Tru9I-AR (50 мкМ) смешивали в пропорции 1 : 1 в пробирке, инкубировали при +95°C в течение 5 мин и охлаждали при комнатной температуре в течение 10 мин.

Лигирование адаптеров с фрагментами рестрикции. В пробирку объемом 0.5 мл вносили 8 мкл рестрикционной смеси, 2 мкл 10х Overnight ligation buffer, 4 мкл адаптера EcoR I, 4 мкл адаптера Mse I и 2 мкл лигазы (конечный объем реакции 20 мкл), инкубировали при температуре +14°C в течение 14–16 часов, после чего хранили при температуре –20°C до проведения реакции преамплификации.

Реакция преамплификации. Аликвоту реакции лигирования разводили в 10 раз в деионизированной воде и переносили 5 мкл в 0.2-мл

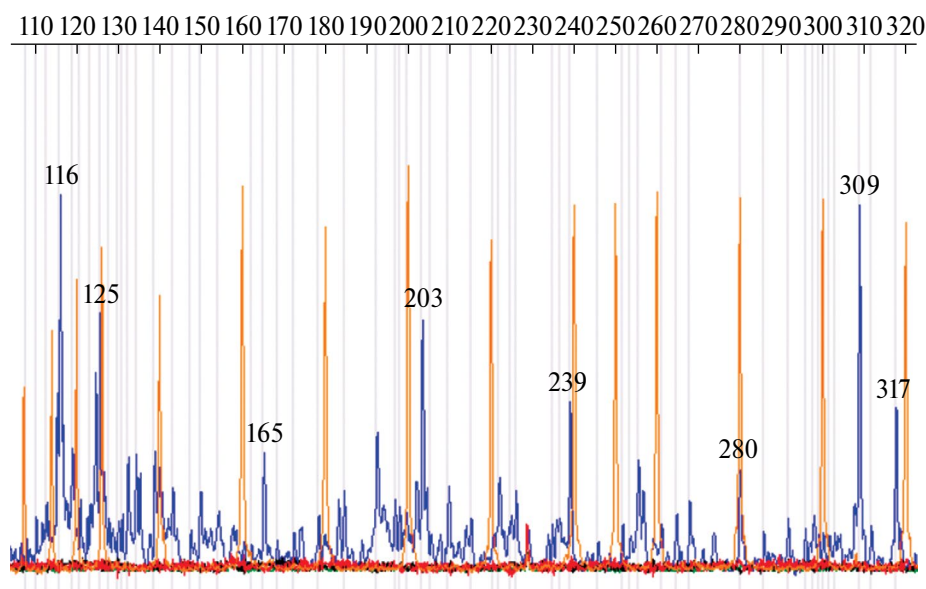


Рис. 4. Пример хроматограммы с выбранными для анализа амплифицированными фрагментами геномной ДНК *Myrica gale*. Использована пара праймеров F-EcoRI-AAT и Tru9I-CTT. Число над пиком означает размер выбранного фрагмента (п.н.). Фрагменты, соответствующие другим высоким пикам на этой хроматограмме, не были выбраны для анализа, поскольку не всегда воспроизводились в независимых технических повторностях. Оранжевым цветом показаны маркеры длин фрагментов.

Fig. 4. An example of a chromatogram with the amplified of *Myrica gale* genomic DNA fragments chosen for the analysis. The used pair of primers is F-EcoRI-AAT and Tru9I-CTT. The number above a peak indicates the size of the selected fragment (bp). Fragments corresponding to other high peaks in this chromatogram were not selected for analysis because they were not always reproducible in independent technical replicates. Fragment length markers are shown in orange.

ПЦР-пробирку. Затем в пробирку добавляли 5 пМ праймера EcoRI-PA, 5 пМ праймера Tru9I-PA, 12.5 мкл мастер-микса для ПЦР и деионизированную воду до 25 мкл. Реакцию проводили в ПЦР-амплификаторе с нагреваемой крышкой по следующей программе:

1 цикл: денатурация: +95°C – 5 мин;
25 циклов: денатурация: +95°C – 20 с; отжиг: +56°C – 35 с; элонгация: +72°C – 30 с;

1 цикл: +62°C – 30 мин.

Качество реакции проверяли методом электрофореза в 1.5%-м агарозном геле с окраской бромистым этидием (5 мкл реакции на дорожку). Пробирку с реакцией хранили при –20°C до проведения реакции селективной амплификации.

Реакция селективной амплификации. Аликвоту реакции преамплификации разводили в 20 раз в деионизированной воде и переносили по 5 мкл в три 0.2-мл ПЦР-пробирки. В пробирки добавляли соответственно 5 пМ праймера F-EcoRI-CAT, или 5 пМ праймера F-EcoRI-ATG, или 5 пМ праймера F-EcoRI-AAT. В каждую пробирку добавляли по 20 пМ праймера Tru9I-CTT,

12.5 мкл мастер-микса для ПЦР и деионизированную воду до объема 25 мкл. Реакции проводили в ПЦР-амплификаторе с нагреваемой крышкой по следующей программе:

1 цикл: денатурация: +95°C – 5 мин;
30 циклов: денатурация: +95°C – 20 с; отжиг: +56°C – 35 с; элонгация: +72°C – 30 с;
1 цикл: +62°C – 30 мин.

Качество реакции проверяли методом электрофореза в 1.5%-м агарозном геле с окраской бромистым этидием (5 мкл реакции на дорожку). Пробирки с результатами реакции хранили в светонепроницаемом контейнере при –20°C до проведения дальнейшего анализа.

Проведение фрагментного анализа (AFLP). Один микролитр каждого анализируемого ПЦР-продукта, содержащего флуоресцентную метку, разводили в 10 раз в деионизированной воде. К 1 мкл разведенного амплификата добавляли 10 мкл Hi-Di формамида (Applied Biosystems, США) и 1 мкл стандарта молекулярного веса CD-450 (“Синтол”, Россия). Затем образцы денатурировали при +95°C в течение 5 мин

Таблица 3. Выбранные для AFLP-анализа амплифицированные фрагменты геномной ДНК *Myrica gale*
Table 3. The amplified genomic DNA fragments of *Myrica gale* chosen for AFLP analysis

Использованные пары праймеров Used pairs of primers	Размер выбранных фрагментов ДНК (п.н.) Size of chosen DNA fragments (bp)
F-EcoRI-CAT и Tru9I-CTT F-EcoRI-CAT and Tru9I-CTT	103, 117, 133, 303, 306, 437
F-EcoRI-ATG и Tru9I-CTT F-EcoRI-ATG and Tru9I-CTT	101, 118, 121, 128, 267, 415
F-EcoRI-AAT и Tru9I-CTT F-EcoRI-AAT and Tru9I-CTT	116, 125, 165, 203, 239, 280, 309, 313, 317, 363

Таблица 4. AFLP-генотипы исследованных растений *Myrica gale* в заказнике “Лебяжий”
Table 4. AFLP genotypes of the studied *Myrica gale* plants in the Lebyazhiy Reserve

AFLP-генотип AFLP genotype		Субпопуляция Subpopulation		
		A	B	C
1	Все фрагменты All fragments	2	3	3
2	Все, кроме 103 п.н. All fragments except 103 bp	6	3	9
3	Все, кроме 313 п.н. All fragments except 313 bp	—	1	—
4	Все, кроме 101 и 121 п.н. All fragments except 101 and 121 bp	—	1	—
5	Все, кроме 101 и 267 п.н. All fragments except 101 and 267 bp	—	2	—
6	Все, кроме 103 и 118 п.н. All fragments except 103 and 118 bp	—	1	—
7	Все, кроме 103 и 313 п.н. All fragments except 103 and 313 bp	—	2	—
8	Все, кроме 101, 103 и 267 п.н. All fragments except 101, 103, and 267 bp	—	—	1
9	Все, кроме 101, 118 и 280 п.н. All fragments except 101, 118, and 280 bp	—	—	2
10	Все, кроме 103, 117 и 313 п.н. All fragments except 103, 117, and 313 bp	—	—	2
11	Все, кроме 117, 121, 128 и 165 п.н. All fragments except 117, 121, 128, and 165 bp	1	—	—
12	Все, кроме 103, 117, 125 и 313 п.н. All fragments except 103, 117, 125, and 313 bp	—	—	1
13	Все, кроме 165, 239, 313, 317 и 363 п.н. All fragments except 165, 239, 313, 317, and 363 bp	—	—	1
14	Все, кроме 117, 239, 280, 313, 317 и 363 п.н. All fragments except 117, 239, 280, 313, 317, and 363 bp	—	—	1
Всего / Total		9	13	20

и помещали на лед. Электрофорез образцов проводили с помощью генетического анализатора ABI3500xL (Applied Biosystems, США). Для анализа амплифицированных фрагментов использовали программное обеспечение Genemarker, Version 1.85 (SoftGenetics, LLC, США).

Статистическая обработка результатов. Соотношение обычных и редких AFLP-генотипов в субпопуляциях сравнивали с использованием метода хи-квадрат (Glotov et al., 1982).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для анализа полиморфизма геномной ДНК восковника мы использовали оптимизированный биоматериал, полученный из 51 побега, собранного в государственном природном заказнике “Лебяжий”. Учитывая высокую склонность восковника к вегетативному размножению, мы собирали побеги, отстоящие друг от друга на расстояние около 5 м. При этом старались равномерно охватить всю территорию, занимаемую каждой из трех исследуемых субпопуляций. В субпопуляции А были собраны 14 побегов, в субпопуляции Б — 15, в субпопуляции В — 22.

Выделить достаточное количество высококачественной ДНК (не менее 1 мкг на образец), пригодной для использования в AFLP-анализе, удалось из 42 образцов оптимизированного биоматериала восковника. В результате мы проанализировали 9 растений из субпопуляции А, 13 из субпопуляции Б и 20 из субпопуляции В. Координаты этих растений представлены в табл. 2.

При проведении AFLP-анализа мы использовали три комбинации праймеров: F-EcoRI-CAT и Tru9I-CTT, F-EcoRI-ATG и Tru9I-CTT, F-EcoRI-AAT и Tru9I-CTT. В каждом случае мы выявили широкий спектр амплифицированных фрагментов ДНК размером от 100 до 450 п.н. Большинство из них были плохо вычленимы из-за множественности и близкого расположения друг к другу. Для каждой использованной пары праймеров мы выбрали хорошо вычлениваемые, четко выраженные фрагменты (рис. 4), стабильно воспроизводимые при повторном анализе. Каждый образец анализировали в двух технических повторностях. В общей сложности выбрали 22 амплифицированных фрагмента (табл. 3).

По восьми фрагментам (116, 133, 203, 303, 306, 309, 415 и 437 п.н.) все проанализированные растения были одинаковыми. По остальным фрагментам мы обнаружили полиморфизм, при этом средний уровень их полиморфности

составлял 0.079 для субпопуляции А, 0.088 для субпопуляции Б и 0.129 для субпопуляции В.

В исследованной выборке из 42 растений восковника мы выявили 14 разных AFLP-генотипов (табл. 4). Два из них присутствовали в каждой из субпопуляций и составляли более половины исследованной выборки (62%). По-видимому, это результат вегетативного размножения двух генетически разных растений восковника, когда-то послуживших основателями всей популяции.

Остальные обнаруженные нами AFLP-генотипы представлены в исследованной выборке единичными растениями (либо всего одним, либо двумя). Примечательно, что каждый из этих редких генотипов был выявлен только в одной из субпопуляций. Суммарная доля таких генотипов в субпопуляции А была ниже, чем в субпопуляциях Б и В (11, 54 и 40% соответственно). Этот вывод подтверждается критерием хи-квадрат ($p < 0.05$ при $v = 1$). Однако с учетом специфики сбора материала и ограниченной численности восковника в обследованном локусе объем использованной выборки весьма невелик, что не позволило провести детальный статистический анализ генетической структуры указанных субпопуляций. Для прояснения ситуации необходимы дополнительные исследования с использованием значительно более крупной выборки.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе впервые проведен молекулярно-генетический анализ растений восковника. Данный вид многократно использовали в молекулярных исследованиях для выяснения спектра азотфиксирующих эндосимбионтов (Huguet et al., 2001, 2004; Popovici et al., 2010, 2011), но сам восковник оставался практически неизученным. Генетические сведения об этом объекте сводились к числу хромосом ($2n = 48$) (MacDonald, 1989; Skene et al., 2000), результатам штрих-кодирования (de Vere et al., 2012), а также единичным геномным последовательностям в GeneBank.

Мы разработали простой и сравнительно дешевый протокол выделения высококачественной геномной ДНК из этого вида. Взяв за основу максимально упрощенный протокол,

предложенный Kotchoni и Gachomo (2009) для выделения ДНК из свежих листьев резуховидки Таля, мы внесли в него ряд модификаций:

ДНК выделяли из оптимизированного биоматериала восковника (Galaktionova et al., 2023);

увеличили концентрацию NaCl и SDS в лизирующем буфере до 0.5 М и 2% соответственно;

ввели в состав лизирующего буфера 1%-й поливинилпирролидон МВ 40 КДа;

увеличили объем лизирующего буфера до 800 мкл;

увеличили время инкубации с лизирующим буфером до 10 мин;

после лизиса ввели дополнительную инкубацию на льду 10 мин;

изменили состав отмывочного буфера, введя в него 1 М гуанидин изотиоцианат;

изменили объем этанола для осаждения ДНК до количества, равного объему надосадочной жидкости, собранной после центрифугирования.

Перечисленные модификации позволили нам осуществить хорошую очистку геномной ДНК восковника от многочисленных липидов и полифенолов, характерных для данного вида растений.

Выделенная нами геномная ДНК восковника оказалась пригодной для проведения AFLP-анализа. Используя три пары праймеров (F-EcoRI-CAT и Tru9I-CTT, F-EcoRI-ATG и Tru9I-CTT, F-EcoRI-AAT и Tru9I-CTT), мы получили 22 четко вычлняемых и хорошо воспроизводимых амплифицированных фрагмента. Обычно при проведении AFLP-анализа количество вычлняемых фрагментов заметно выше и может исчисляться даже несколькими сотнями (Saunders et al., 2001; Nguyen et al., 2004; Gil-Vega et al., 2006; Patsias, Bruelheide, 2011; Leipold et al., 2020). В нашем случае фрагменты тоже были многочисленными, но большинство из них не поддавалось четкому вычлнению из-за близкого расположения друг к другу. Возможно, это связано с полиплоидной природой восковника при наличии существенного межгеномного полиморфизма: каждый геном дает множество фрагментов, накладывающихся друг на друга и затрудняющих анализ. Подобные ситуации описаны для *Lolium* spp. (Roldan-Ruiz et al., 2000). Тем не менее даже при использовании

двух десятков амплифицированных фрагментов мы обнаружили генетический полиморфизм изучаемого вида.

Принято считать, что в воспроизведении восковника однозначно преобладает вегетативное размножение (Poore, 1956; Skene et al., 2000; Volkova et al., 2021). В связи с этим казалось вполне логичным ожидать, что обследованная нами популяция восковника, будучи в достаточно высокой степени изолированной, является клоном, ведущим свое происхождение от некоего единичного растения-основателя. Если бы такое предположение было верным, все или почти все представители данной популяции имели бы один и тот же AFLP-генотип. Между тем исследованная выборка оказалась полиморфной.

Мы выявили в ней 14 AFLP-генотипов (табл. 4). Два из них (№ 1 и 2) – самые обильные во всех трех субпопуляциях: в общей сложности растения этих генотипов составляли более 60% всей выборки. По-видимому, они представляют собой два клона, возникших в результате вегетативного размножения двух разных основателей данной популяции.

Остальные AFLP-генотипы относятся к редким. Каждый из них представлен в исследованной выборке всего лишь одним или двумя растениями. Возможно, такие растения являются мутантами, возникшими на основе двух AFLP-генотипов, наиболее обильных в обследованной нами популяции. В частности, AFLP-генотип № 3 может быть мутантом на основе AFLP-генотипа № 1. Аналогично AFLP-генотип № 6 может быть производным AFLP-генотипа № 2.

Разнообразие редких AFLP-генотипов восковника, по-видимому, связано не только с мутационным процессом. В пользу такого предположения свидетельствует отсутствие одного и того же амплифицированного фрагмента сразу в нескольких разных AFLP-генотипах. Например, фрагмент длиной 117 п.н. отсутствует в AFLP-генотипах № 10, 11, 12 и 14. Маловероятно, чтобы такой эффект был обусловлен четырьмя независимо возникшими мутациями, приводящими к отсутствию одного и того же фрагмента. Более вероятно, что одна и та же мутация оказалась в четырех разных

AFLP-генотипах в результате неких рекомбинационных процессов.

Этот вывод хорошо согласуется с тем обстоятельством, что некоторые из выявленных нами AFLP-генотипов можно рассматривать в качестве рекомбинантных. В частности, это касается AFLP-генотипов № 1, 2, 3 и 7: здесь наблюдается отчетливая рекомбинация по наличию/отсутствию фрагментов длиной 103 и 313 п.н. Приведенные факты указывают на то, что в воспроизведении и расселении восковника заметную роль играет не только вегетативное, но и семенное (т.е. половое) размножение.

Наши данные не позволяют ответить на вопрос, где именно происходит половое размножение восковника. Возможно, оно осуществляется, хотя бы и редко, непосредственно в исследованных нами субпопуляциях. В пользу такой гипотезы свидетельствует тот факт, что среди проанализированных растений было несколько женских (этот вопрос будет рассмотрен в отдельной статье). Впрочем, вполне вероятно, что редкие генотипы поступают в обследованную нами популяцию извне — из других популяций с иной генетической структурой. Для ответа на этот вопрос необходимо исследовать как минимум несколько разных популяций восковника.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана грантом РНФ № 22-24-00138 «Анализ генетического полиморфизма периферических популяций на модели охраняемого вида растений *Myrica gale* (Красная книга РФ)» <https://rscf.ru/project/22-24-00138/>. Фрагментный анализ геномной ДНК *Myrica gale* осуществлен с использованием оборудования ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» Научного парка СПбГУ. Настоящее исследование посвящается 300-летию Санкт-Петербургского государственного университета.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Aggarwal G., Edhigalla P., Walia P. 2022. A comprehensive review of high-quality plant DNA isolation. — The Pharma Innovation Journal. SP-11(6): 171–176. <https://doi.org/10.3390/plants11030242>
- [Beklemishev] Беклемишев В.Н. 2015. Пространственная и функциональная структура популяций. — Русский орнитологический журнал. 24 (1093): 87–100.
- Blackwell A., Stuart A.E., Estambale B.B. 2003. The repellent and antifeedant activity of *Myrica gale* oil against *Aedes aegypti* mosquitoes and its enhancement by the addition of salicylic acid. — J. R. Coll. Physicians Edinb. 33: 209–214.
- Bleas M.J., De Grandis S.A., Lee H., Trevors J.T. 1998. Amplified fragment length polymorphism (AFLP): a review of the procedure and its applications. — J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 21: 99–114. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900537>
- Blignaut M., Ellis A.G., Le Roux J.J. 2013. Towards a transferable and cost-effective plant AFLP protocol. — PloS One. 8 (4): e61704. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061704>
- Bond G. 1951. The fixation of nitrogen associated with the root nodules of *Myrica gale* L., with special reference to its pH relation and ecological significance. — Ann. Bot. 15 (4): 447–459. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a083291>
- Crocker L.J., Schwintzer C.R. 1993. Factors affecting formation of cluster roots in *Myrica gale* seedlings in water culture. — Plant Soil. 152: 287–298. <https://doi.org/10.1007/BF00029099>
- Dairawan M., Shetty P.J. 2020. The evolution of DNA extraction methods. — Am. J. Biomed. Sci. Res. 8: 39–45. <http://dx.doi.org/10.34297/AJBSR.2020.08.001234>
- de Vere N., Rich T.C., Ford C.R., Trinder S.A., Long C., Moore C.W., Satterthwaite D., Davies H., Allainguillaume J., Ronca S., Tatarinova T., Garbett H., Walker K., Wilkinson M.J. 2012. DNA barcoding the native flowering plants and conifers of Wales. — PloS One. 7 (6): e37945. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037945>
- [Galaktionova et al.] Галактионова У.А., Большаков В.Н., Тиходеева М.Ю., Тиходеев О.Н. 2023. Специфические проблемы при выделении геномной ДНК из растений: пути решения. — Бот. журн. 108 (6): 603–614.
- Gil-Vega K., Díaz C., Nava-Cedillo A., Simpson J. 2006. AFLP analysis of *Agave tequilana* varieties. — Plant Sci. 170 (4): 904–909. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.12.014>
- [Glotov et al.] Глотов Н.В., Животовский Л.А., Хованов Н.В., Хромов-Борисов Н.Н. 1982. Биометрия. Л. 264 с.
- Huguet V., Batzli J.M., Zimpfer J.F., Normand P., Dawson J.O., Fernandez M.P. 2001. Diversity and specificity of *Frankia* strains in nodules of sympatric *Myrica gale*, *Alnus incana*, and *Shepherdia canadensis* determined by *rrs* gene polymorphism. — Appl. Environ. Microbiol. 67 (5): 2116–2122. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.5.2116-2122.2001>
- Huguet V., Mergeay M., Cervantes E., Fernandez M.P. 2004. Diversity of *Frankia* strains associated to *Myrica gale* in Western Europe: impact of host plant (*Myrica* vs. *Alnus*) and of edaphic factors. — Environ. Microbiol. 6 (10): 1032–1041. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00625.x>

- [Ivanter, Kuznetsov] Ивантер Э.В., Кузнецов О.Л. (ред.) 2007. Красная книга Республики Карелия. Петрозаводск. 364 с.
- [Комаров] Комаров В.Л. (ред.) 1936. Восковник болотный. — В кн.: Флора СССР. Т. 5. М.; Л. С. 243–244.
- Kotchoni S.O., Gachomo E.W. 2009. A rapid and hazardous reagent free protocol for genomic DNA extraction suitable for genetic studies in plants. — *Mol. Biol. Rep.* 36: 1633–1636. <https://doi.org/10.1007/s11033-008-9362-9>
- Kuzmina M.L., Braukman T.W.A., Fazecas A.J., Graham S.W., Dewaard S.L., Rodrigues A., Bennett B.A., Dickinson T.A., Saarela J.M., Catling P.M., Newmaster S.G., Percy D.M., Fenneman E., Lauron-Moreau A., Ford B., Gillespie L., Subramanyam R., Whittton J., Jennings M.L., Metsger D., Warne C.P., Brown A., Sears E., Dewaard J.R., Zakharov E.V., Hebert P.D.N. 2017. Using herbarium-derived DNAs to assemble a largescale DNA barcode library for the vascular plants of Canada. — *Appl. Plant Sci.* 5 (12): 1700079. <https://doi.org/10.3732/apps.1700079>
- Leipold M., Tausch S., Hirtreiter M., Poschlo P., Reisch C. 2020. Sampling for conservation genetics: how many loci and individuals are needed to determine the genetic diversity of plant populations using AFLP? — *Conserv. Genet. Res.* 12: 99–108. <https://doi.org/10.1007/s12686-018-1069-1>
- MacDonald A.D. 1989. The morphology and relationships of the Myricaceae. — In: *Evolution, Systematics and Fossil History of the Hamamelidae*. Vol. 2: Higher Hamamelidae. Oxford, UK. P. 147–165.
- Malterud K.E. 1992. C-methylated dihydrochalcones from *Myrica gale* fruit exudate. — *Acta Pharm. Nord.* 4: 65–68. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1996.tb00190.x>
- Mueller U.G., Wolfenbarger L.L. 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. — *Trends Ecol. Evol.* 14 (10): 389–394. [https://doi.org/10.1016/s0169-5347\(99\)01659-6](https://doi.org/10.1016/s0169-5347(99)01659-6)
- Nguyen T.T., Taylor P.W.J., Redden R.J., Ford R. 2004. Genetic diversity estimates in Cicer using AFLP analysis. — *Plant Breed.* 123 (2): 173–179. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2003.00942.x>
- Patsias K., Bruelheide H. 2011. Is the degree of clonality of forest herbs dependent on gap age? Using fingerprinting approaches to assess optimum successional stages for montane forest herbs. — *Ecol. Evol.* 1 (3): 290–305. <https://doi.org/10.1002/ece3.23>
- Poore M.E.D. 1956. The ecology of Woodwalton Fen. — *J. Ecol.* 44: 455–492.
- Popovici J., Bertrand C., Bagnarol E., Fernandez M.P., Comte G. 2008. Chemical composition of essential oil and headspace-solid microextracts from fruits of *Myrica gale* L. and antifungal activity. — *Nat. Prod. Res.* 22 (12): 1024–1032. <https://doi.org/10.1080/14786410802055568>
- Popovici J., Comte G., Bagnarol E., Alloisio N., Fournier P., Bellvert F., Bertrand C., Fernandez M.P. 2010. Differential effects of rare specific flavonoids on compatible and incompatible strains in the *Myrica gale*-*Frankia* actinorhizal symbiosis. — *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 2451–2460. <https://doi.org/10.1128/aem.02667-09>
- Popovici J., Walker V., Bertrand C., Bellvert F., Fernandez M.P., Comte G. 2011. Strain specificity in the Myricaceae–*Frankia* symbiosis is correlated to plant root phenolics. — *Funct. Plant Biol.* 38 (9): 682–689. <https://doi.org/10.1071/fp11144>
- Rogers S., Bendich A. 1985. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. — *Plant Mol. Biol.* 5 (2): 69–76. <https://doi.org/10.1007/BF00020088>
- Rogers S., Bendich A. 1989. Extraction of DNA from plant tissues. — In: *Plant Molecular Biology Manual*. Springer. P. 73–83. https://doi.org/10.1007/978-94-009-0951-9_6
- Roldan-Ruiz I., Dendauw J., Van Bockstaele E., Depicker A., De Loos M. 2000. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). — *Mol. Breed.* 6: 125–134. <https://doi.org/10.1023/A%3A1009680614564>
- Rosa G.P., Silva B.J., Seca A.M., Moujir L.M., Barreto M.C. 2020. Phytochemicals with added value from *Morella* and *Myrica* species. — *Molecules.* 25 (24): 6052. <https://doi.org/10.3390%2Fmolecules25246052>
- [Ryabushkina et al.] Рябушкина Н.А., Омашева М.Е., Галиакпаров Н.Н. 2012. Специфика выделения ДНК из растительных объектов. — *Биотехнология. Теория и практика.* 2: 9–26.
- Saunders J.A., Pedroni M.J., Penrose L.D., Fitt A.J. 2001. AFLP analysis of opium poppy. — *Crop Sci.* 41 (5): 1596–1601. <https://doi.org/10.2135/cropsci2001.4151596x>
- Schwintzer C.R., Lancelle S.A. 1983. Effect of water table depth on shoot growth, root growth and nodulation of *Myrica gale* seedlings. — *J. Ecol.* 71: 489–501. <https://doi.org/10.2307/2259730>
- Schwintzer C.R., Ostrofsky A. 1989. Factors affecting germination of *Myrica gale* seeds. — *Can. J. For. Res.* 19: 1105–1109. <http://dx.doi.org/10.1139/x89-167>
- Silva B.J., Seca A.M., Barreto M.D.C., Pinto D.C. 2015. Recent breakthroughs in the antioxidant and anti-inflammatory effects of *Morella* and *Myrica* species. — *Int. J. Mol. Sci.* 16 (8): 17160–17180. <https://doi.org/10.3390%2Fijms160817160>
- Skene K.R., Sprent J.I., Raven J.A., Herdman L. 2000. *Myrica gale* L. — *J. Ecol.* 88 (6): 1079–1094. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2745.2000.00522.x>
- Svoboda K.P., Inglis A., Hampson J., Galambosi B., Asakawa Y. 1998. Biomass production, essential oil yield and composition of *Myrica gale* L. harvested from wild populations in Scotland and Finland. — *Flavour Frag. J.* 13: 367–372. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1026\(199811/12\)13:6%3C367::AID-FFJ724%3E3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1026(199811/12)13:6%3C367::AID-FFJ724%3E3.0.CO;2-M)
- Sylvestre M., Legault J., Dufour D., Pichette A. 2005. Chemical composition and anticancer activity of leaf

- essential oil of *Myrica gale* L. — Phytomedicine. 12: 299–304. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2003.12.004>
- [The Red Book...] Красная книга Российской Федерации (растения и грибы). 2008. М. 885 с.
- [Volkova et al.] Волкова Е.А., Смагин В.А., Храмов В.Н. 2021. Сообщества с *Myrica gale* L. на болотах побережья Финского залива (Санкт-Петербург и Ленинградская область). — Растительность России. 41: 58–74.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Lee T.V.D., Hornes M., ... Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. — Nucleic Acids Res. 23 (21): 4407–4414. <https://doi.org/10.1093%2Fnar%2F23.21.4407>

GENOMIC DNA POLYMORPHISM IN *MYRICA GALE* (MYRICACEAE) IN THE LEBYAZHIY STATE NATURE RESERVE (THE SOUTHERN COAST OF THE GULF OF FINLAND)

O. A. Semicheva^{a,b}, U. A. Galaktionova^{a,b}, V. N. Bolshakov^a, A. E. Romanovich^b,
M. Yu. Tikhodeeva^b, O. N. Tikhodeyev^{b,#}

¹Vega Ltd, Alkor Bio Group
Zheleznodorozhny Ave., 40a, St. Petersburg, 192148, Russia

²Saint-Petersburg State University
University Emb., 7/9/11, St. Petersburg, 199034, Russia

[#]e-mail: tikhodeyev@mail.ru, o.tikhodeev@spbu.ru

The analysis of genomic DNA polymorphism is one of widely used approaches for studying the genetic structure of natural populations. It has been successfully applied to various plants. However, many species have not yet been studied, which is primarily due to methodological difficulties in isolating well-purified and non-degraded genomic DNA. These difficulties are due to the fact that plants possess numerous bioorganic compounds (polysaccharides, polyphenols, lipids, etc.) that contaminate DNA and significantly reduce its quality. Such species include marsh waxweed (*Myrica gale* L.), a perennial sub-Atlantic shrub with presumably vegetative propagation (in nature, waxweed seedlings are quite rare). We developed a simple protocol for isolation of high-quality genomic DNA from waxweed leaves and performed AFLP analysis of 42 plants of this species from three subpopulations in the Lebyazhiy Nature Reserve. Using three primer pairs, we isolated 22 amplification fragments, 8 of which were monomorphic. For the remaining 14 fragments, the average level of their polymorphism was low: depending on the subpopulation studied, it varied from 0.079 to 0.129. As shown by our analysis, all three studied subpopulations are polymorphic with a predominance of two common AFLP-genotypes. The corresponding plants are apparently the vegetative descendants of the founders. The rare AFLP-genotypes (represented by just one or two plants; a total of 12 such genotypes were identified) are likely the result of mutational and recombination processes. Our data give evidence that in the life cycle and dispersal of waxweed, the role of sexual reproduction is also noticeable.

Keywords: Red Data Book of Russian Federation, *Myrica gale*, edge populations, genomic DNA, AFLP-analysis, genetic polymorphism

ACKNOWLEDGEMENTS

The study was supported by grant No. 22-24-00138 of the Russian Science Foundation “Analysis of the genetic polymorphism of edge-populations of the protected plant species *Myrica gale* (Red Book of the Russian Federation) as a model” <https://rscf.ru/project/22-24-00138/>. Fragment analysis of the *Myrica gale* genomic DNA was performed using the equipment of the Resource Center “Development of Molecular and Cellular Technologies”

of the Science Park of Saint Petersburg State University. This study is dedicated to the 300th anniversary of Saint Petersburg State University.

REFERENCES

- Aggarwal G., Edhigalla P., Walia P. 2022. A comprehensive review of high-quality plant DNA isolation. — The Pharma Innovation Journal. SP-11 (6): 171–176. <https://doi.org/10.3390/plants11030242>

- Baydar N.G., Baydar H., Debener T. 2004. Analysis of genetic relationships among *Rosa damascena* plants grown in Turkey by using AFLP and microsatellite markers. — J. Biotechnol. 111 (3): 263–267. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.04.014>
- Beklemishev V.N. 2015. Prostranstvennaya i funktsional'naya struktura populyatsiy [Spatial and functional structure of populations]. — Russ. Ornithol. J. 24 (1093): 87–100 (In Russ.).
- Blackwell A., Stuart A.E., Estambale B.B. 2003. The repellent and antifeedant activity of *Myrica gale* oil against *Aedes aegypti* mosquitoes and its enhancement by the addition of salicylic acid. — J. R. Coll. Physicians Edinb. 33: 209–214.
- Bleas M.J., De Grandis S.A., Lee H., Trevors J.T. 1998. Amplified fragment length polymorphism (AFLP): a review of the procedure and its applications. — J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 21: 99–114. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900537>
- Blignaut M., Ellis A.G., Le Roux J.J. 2013. Towards a transferable and cost-effective plant AFLP protocol. — PloS One. 8 (4): e61704. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061704>
- Bond G. 1951. The fixation of nitrogen associated with the root nodules of *Myrica gale* L., with special reference to its pH relation and ecological significance. — Ann. Bot. 15 (4): 447–459. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a083291>
- Crocker L.J., Schwintzer C.R. 1993. Factors affecting formation of cluster roots in *Myrica gale* seedlings in water culture. — Plant Soil. 152: 287–298. <https://doi.org/10.1007/BF00029099>
- Dairawan M., Shetty P.J. 2020. The evolution of DNA extraction methods. — Am. J. Biomed. Sci. Res. 8: 39–45. <http://dx.doi.org/10.34297/AJBSR.2020.08.001234>
- de Vere N., Rich T.C., Ford C.R., Trinder S.A., Long C., Moore C.W., Satterthwaite D., Davies H., Allainguillaume J., Ronca S., Tatarinova T., Garbett H., Walker K., Wilkinson M.J. 2012. DNA barcoding the native flowering plants and conifers of Wales. — PloS One. 7 (6): e37945. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037945>
- Galaktionova U.A., Bolshakov V.N., Tikhodeeva M.Yu., Tikhodeyev O.N. 2023. Specific problems of genomic DNA extraction from plants: ways for solution. — Bot. Zhurn. 108 (6): 603–614 (In Russ.).
- Gil-Vega K., Díaz C., Nava-Cedillo A., Simpson J. 2006. AFLP analysis of *Agave tequilana* varieties. — Plant Sci. 170 (4): 904–909. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.12.014>
- Glotov N.V., Zhivotovskiy L.A., Khovanov N.V., Khromov-Borisov N.N. 1982. Biometriya [Biometry]. Leningrad. 264 p. (In Russ.).
- Huguet V., Batzli J.M., Zimpfer J.F., Normand P., Dawson J.O., Fernandez M.P. 2001. Diversity and specificity of *Frankia* strains in nodules of sympatric *Myrica gale*, *Alnus incana*, and *Shepherdia canadensis* determined by *rrs* gene polymorphism. — Appl. Environ. Microbiol. 67 (5): 2116–2122. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.5.2116-2122.2001>
- Huguet V., Mergeay M., Cervantes E., Fernandez M.P. 2004. Diversity of *Frankia* strains associated to *Myrica gale* in Western Europe: impact of host plant (*Myrica* vs. *Alnus*) and of edaphic factors. — Environ. Microbiol. 6 (10): 1032–1041. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00625.x>
- Ivanter E.V., Kuznetsov O.L. (eds.). 2007. Krasnaya Kniga Respubliki Karelia [Red Book of the Republic of Karelia]. Petrozavodsk. 364 p. (In Russ.).
- Komarov V.L. (ed.). 1936. Voskovnik bolotnyi [Sweet gale]. — In: Flora of SSSR. Vol. 5. Moscow, Leningrad. P. 243–244 (In Russ.).
- Kotchoni S.O., Gachomo E.W. 2009. A rapid and hazardous reagent free protocol for genomic DNA extraction suitable for genetic studies in plants. — Mol. Biol. Rep. 36: 1633–1636. <https://doi.org/10.1007/s11033-008-9362-9>
- Kuzmina M.L., Braukman T.W.A., Fazecas A.J., Graham S.W., Dewaard S.L., Rodrigues A., Bennett B.A., Dickinson T.A., Saarela J.M., Catling P.M., Newmaster S.G., Percy D.M., Fenneman E., Lauron-Moreau A., Ford B., Gillespie L., Subramanyam R., Whitton J., Jennings L., Metsger D., Warne C.P., Brown A., Sears E., Dewaard J.R., Zakharov E.V., Hebert P.D.N. 2017. Using herbarium-derived DNAs to assemble a largescale DNA barcode library for the vascular plants of Canada. — Appl. Plant Sci. 5 (12): 1700079. <https://doi.org/10.3732/apps.1700079>
- Leipold M., Tausch S., Hirtreiter M., Poschlod P., Reisch C. 2020. Sampling for conservation genetics: how many loci and individuals are needed to determine the genetic diversity of plant populations using AFLP? — Conserv. Genet. Resour. 12: 99–108. <https://doi.org/10.1007/s12686-018-1069-1>
- MacDonald A.D. 1989. The morphology and relationships of the Myricaceae. — In: Evolution, Systematics and Fossil History of the Hamamelidae. Vol. 2: Higher Hamamelidae. Oxford, UK. P. 147–165.
- Malterud K.E. 1992. C-methylated dihydrochalcones from *Myrica gale* fruit exudate. — Acta Pharm. Nord. 4: 65–68. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1996.tb00190.x>
- Mueller U.G., Wolfenbarger L.L. 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. — Trends Ecol. Evol. 14 (10): 389–394. [https://doi.org/10.1016/s0169-5347\(99\)01659-6](https://doi.org/10.1016/s0169-5347(99)01659-6)
- Nguyen T.T., Taylor P.W.J., Redden R.J., Ford R. 2004. Genetic diversity estimates in *Cicer* using AFLP analysis. — Plant Breed. 123 (2): 173–179. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2003.00942.x>
- Patsias K., Bruehlheide H. 2011. Is the degree of clonality of forest herbs dependent on gap age? Using fingerprinting approaches to assess optimum successional stages for montane forest herbs. — Ecol. Evol. 1 (3): 290–305. <https://doi.org/10.1002/ece3.23>

- Poore M.E.D. 1956. The ecology of Woodwalton Fen. — J. Ecol. 44: 455–492.
- Popovici J., Bertrand C., Bagnarol E., Fernandez M.P., Comte G. 2008. Chemical composition of essential oil and headspace-solid microextracts from fruits of *Myrica gale* L. and antifungal activity. — Nat. Prod. Res. 22 (12): 1024–1032. <https://doi.org/10.1080/14786410802055568>
- Popovici J., Comte G., Bagnarol E., Alloisio N., Fournier P., Bellvert F., Bertrand C., Fernandez M.P. 2010. Differential effects of rare specific flavonoids on compatible and incompatible strains in the *Myrica gale*-*Frankia* actinorhizal symbiosis. — Appl. Environ. Microbiol. 76: 2451–2460. <https://doi.org/10.1128/aem.02667-09>
- Popovici J., Walker V., Bertrand C., Bellvert F., Fernandez M.P., Comte G. 2011. Strain specificity in the Myricaceae–*Frankia* symbiosis is correlated to plant root phenolics. — Funct. Plant Biol. 38 (9): 682–689. <https://doi.org/10.1071/fp11144>
- Rogers S., Bendich A. 1985. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. — Plant Mol. Biol. 5 (2): 69–76. <https://doi.org/10.1007/BF00020088>
- Rogers S., Bendich A. 1989. Extraction of DNA from plant tissues. — In: Plant Molecular Biology Manual. Springer. P. 73–83. https://doi.org/10.1007/978-94-009-0951-9_6
- Roldan-Ruiz I., Dendauw J., Van Bockstaele E., Depicker A., De Loos M. 2000. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). — Mol. Breeding. 6: 125–134. <https://doi.org/10.1023/A%3A1009680614564>
- Rosa G.P., Silva B.J., Seca A.M., Moujir L.M., Barreto M.C. 2020. Phytochemicals with added value from *Morella* and *Myrica* species. — Molecules. 25 (24): 6052. <https://doi.org/10.3390%2Fmolecules25246052>
- Ryabushkina N.A., Omasheva M.E., Galiakparov N.N. 2012. Spetsifika vydeleniya DNK is rastitel'nykh ob'ektov [Specificity of DNA extraction from plants]. — Biotekhnologia. Teoria i Praktika. 2: 9–26 (In Russ.).
- Saunders J.A., Pedroni M.J., Penrose L.D., Fist A.J. 2001. AFLP analysis of opium poppy. — Crop Sci. 41 (5): 1596–1601. <https://doi.org/10.2135/cropsci2001.4151596x>
- Schwintzer C.R., Lancelle S.A. 1983. Effect of water table depth on shoot growth, root growth and nodulation of *Myrica gale* seedlings. — J. Ecol. 71: 489–501. <https://doi.org/10.2307/2259730>
- Schwintzer C.R., Ostrofsky A. 1989. Factors affecting germination of *Myrica gale* seeds. — Can. J. For. Res. 19: 1105–1109. <http://dx.doi.org/10.1139/x89-167>
- Silva B.J., Seca A.M., Barreto M.D.C., Pinto D.C. 2015. Recent breakthroughs in the antioxidant and anti-inflammatory effects of *Morella* and *Myrica* species. — Int. J. Mol. Sci. 16 (8): 17160–17180. <https://doi.org/10.3390%2Fijms160817160>
- Skene K.R., Sprent J.I., Raven J.A., Herdman L. 2000. *Myrica gale* L. — J. Ecol. 88 (6): 1079–1094. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2745.2000.00522.x>
- Svoboda K.P., Inglis A., Hampson J., Galambosi B., Asakawa Y. 1998. Biomass production, essential oil yield and composition of *Myrica gale* L. harvested from wild populations in Scotland and Finland. — Flavour Frag. J. 13: 367–372. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1026\(199811/12\)13:6%3C367::AID-FFJ724%3E3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1026(199811/12)13:6%3C367::AID-FFJ724%3E3.0.CO;2-M)
- Sylvestre M., Legault J., Dufour D., Pichette A. 2005. Chemical composition and anticancer activity of leaf essential oil of *Myrica gale* L. — Phytomedicine. 12: 299–304. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2003.12.004>
- The Red Book of the Russian Federation. 2008. Krasnaya kniga Rossiyskoy Federatsii (rasteniya i griby). Moscow. 885 p. (In Russ.).
- Volkova E.A., Smagin V.A., Khramtsov V.N. 2021. Societies with *Myrica gale* L. in bogs on the edge of Finn Gulf (Saint-Petersburg and Leningrad District). — Vegetation of Russia. 41: 58–74 (In Russ.).
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Lee T.V.D., Hornes M., ... Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. — Nucleic Acids Res. 23 (21): 4407–4414. <https://doi.org/10.1093%2Fnar%2F23.21.4407>

СООБЩЕНИЯ

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ И ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОПУЛЯЦИЙ *CORYDALIS BRACTEATA* SENSU LATO (PAPAVERACEAE) ИЗ ЮЖНОЙ СИБИРИ

© 2024 г. К. К. Рябова^{1,2,*}, И. Е. Ямских^{1,**}, Н. В. Степанов^{1,***}, М. Г. Куцев^{1,3,****}

¹Сибирский федеральный университет

пр-т Свободный, 79, Красноярск, 660041, Россия

²Федеральный исследовательский центр “Красноярский научный центр СО РАН”

ул. Академгородок, 50, Красноярск, 660036, Россия

³Алтайский государственный университет

пр-т Ленина, 61, Барнаул, 656049, Россия

*e-mail: ryabova.kseniya.k@mail.ru

**e-mail: iyamskikh@mail.ru

***e-mail: stepanov-nik@mail.ru

****e-mail: m_kucev@mail.ru

Поступила в редакцию 09.03.2023 г.

Получена после доработки 28.11.2023 г.

Принята к публикации 05.12.2023 г.

В работе впервые проведено изучение морфологического и генетического разнообразия 6 популяций *Corydalis bracteata* Pers. s.l., произрастающих в растительных сообществах Красноярской лесостепи, Западного Саяна, Кузнецкого Алатау, Алтая. В ходе морфологического анализа выявлено разделение совокупности популяций на две группы. Наличие крупного вытянутого дополнительного клубенька в пазухе прикорневой чешуи, крупные размеры прицветника и цветков, максимальная высота растений сближают особи из красноярской и западносаянской популяций с недавно описанным видом *Corydalis talpina* Stepanov – хохлаткой кротовой. Эти результаты подтверждаются и проведенным ISSR-PCR анализом генетической изменчивости популяций хохлатки. Высокие значения коэффициента подразделенности популяций ($G_{st} = 37.58\%$) свидетельствуют о наличии в общей выборке разных видов. Разделение на две группы также продемонстрировано при построении дендрограммы и при кластеризации генотипов с использованием байесовского подхода, реализованного в программном обеспечении STRUCTURE 2.3.4. Секвенирование последовательностей хлоропластного гена *matK* и межгенного спейсера *trnB-trnC* показало, что растения из популяций СВ1 и СВ2, выделяемых нами в вид *C. talpina*, отличаются от других образцов тремя видоспецифичными нуклеотидными заменами (SNPs), одна из которых – миссенс-мутация. Согласованные результаты морфологического и генетического анализов свидетельствуют о дифференциации популяций желтоцветковых хохлаток из Южной Сибири, изначально относимых к виду *C. bracteata*, и указывают на морфологическую и генетическую обособленность *C. talpina*.

Ключевые слова: морфологическое разнообразие, генетическое разнообразие, хохлатка крупноприцветниковая, хохлатка кротовая, ISSR-PCR маркеры, филогенетический анализ, *Corydalis bracteata*, *C. talpina*, Fumarioidae, Papaveraceae

DOI: 10.31857/S0006813624010069, EDN: EWXODA

Род хохлатка (*Corydalis* DC.), относящийся к семейству Papaveraceae, подсемейству Fumarioidae, является таксономически сложным и включает 546 видов (<http://www.worldfloraonline.org>). По данным «Конспекта флоры Азиатской

России» (Malyshev, 2012), распространенным видом на этой территории является *C. bracteata* Pers., относящийся к секции *Pes-gallinaceus* Irmisch. Из родства *C. bracteata* с севера Красноярского края К.Ф. Ледебуром был описан

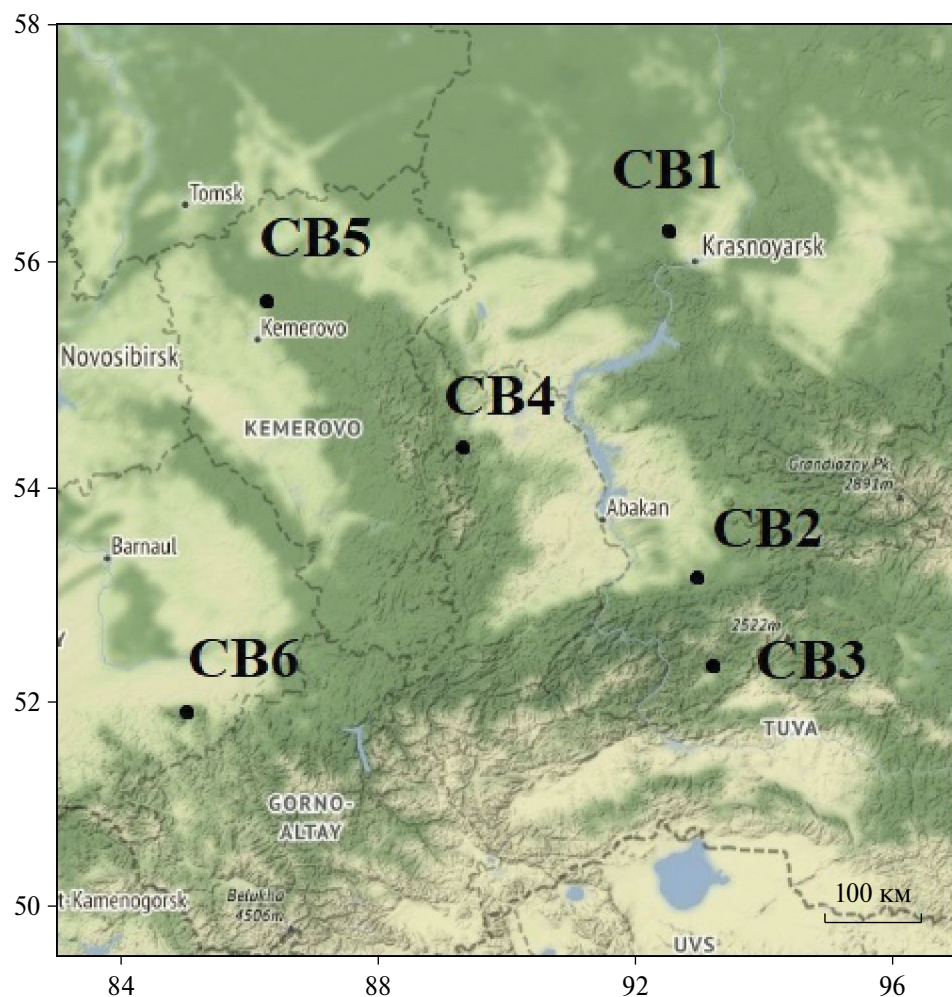


Рис. 1. Расположение популяций *Corydalis bracteata* s. l. (нумерация в соответствии с табл. 1).

Fig. 1. Map of the location of *Corydalis bracteata* s. l. populations (the numbers correspond to Table 1).

вид *Corydalis gracilis* Ledeb. (Ledebour, 1842), а с территории Приенисейских Саян недавно было описано еще два вида — *Corydalis talpina* Stepanov и *Corydalis bombylina* Stepanov (Stepanov, 2015). В иностранной литературе *C. bracteata* входит в секцию *Corydalis* в связи с объединением секций *Pes-gallinaceus* Irmisch. и *Raphanituber* Khokhryakov (Zhang et al., 2008).

C. bracteata s.l. имеет неморальную природу, является весенним эфемероидом. Основной ареал вида охватывает Южную Сибирь с явным тяготением к западной ее части. Г.А. Пешкова (Peshkova, 1984) относит *C. bracteata* к монтанному элементу флоры, максимальную активность вид имеет в пределах черневого и подтаежного горных поясов, при этом тяготеет к мелколистным и смешанным лесным сообществам. По предварительным данным, *C. bracteata* s.str. распространен преимущественно на юге Западной

Сибири, а восточная граница может достигать р. Енисей. В остальных частях ареала *C. bracteata* замещается родственными видами. Один из них — *Corydalis talpina* — наиболее редкий, связанный с реликтовыми черневыми сообществами в нижних высотных поясах Приенисейских Саян (Stepanov, 2016). *C. bracteata* и *C. talpina* обладают морфологическим сходством, однако у особей *C. talpina* отмечено формирование дочернего клубенька в пазухе прикорневого листа. Для выявления таксономически значимых морфологических признаков с использованием методов современной статистики и изучения генетической дифференциации популяций желтоцветковой хохлатки нами были проведены настоящие исследования.

Цель исследований — сравнительный морфолого-генетический анализ популяций *Corydalis*

Таблица 1. Характеристика местообитаний *Corydalis bracteata* s.l.

Table 1. Description of habitats of *Corydalis bracteata* s.l.

№ популяции Population number	Фитоценоз; местоположение Phytocoenosis; location	Состав древостоя Stand composition	Доминирующие виды травяного яруса Dominants of the grass cover
Красноярская лесостепь (Красноярский край) / Krasnoyarsk forest-steppe (Krasnoyarsk Territory)			
CB1	Сосново-березовый лес, разнотравный; Емельяновский р-н, окр. д. Крутая Pine-birch forb forest; Emelyanovsky district, Krutaya village N56.259061°, E92.452176°	6Б2Е2С <i>Betula pendula</i> – 60% <i>Picea obovata</i> – 20% <i>Pinus sylvestris</i> – 20%	<i>Corydalis bracteata</i> (15%) <i>Carex macroura</i> (15%) <i>Calamagrostis arundinacea</i> (15%) <i>Adoxa moschatellina</i> (10%) <i>Equisetum pratense</i> (10%)
Западный Саян (Красноярский край) / Western Sayan (Krasnoyarsk Territory)			
CB2	Черновой осинник папоротниково-разнотравный; Ермаковский р-н, окр. пос. Танзыбей Chern aspen forest with fern and forb cover; Yermakovsky District, Tanzybey village N53.136475°, E92.915468°	8Ос2П <i>Populus tremula</i> – 80% <i>Abies sibirica</i> – 20%;	<i>Anemone altaica</i> (40%) <i>Matteuccia struthiopteris</i> (40%) <i>Corydalis bracteata</i> (20%) <i>Corydalis subjenisseensis</i> (10%)
CB3	Березово-лиственничный лес разнотравно-осочковый; Ермаковский р-н, природный парк “Ергаки”, кордон Таловка Birch-larch forest, with forb and sedge cover; Yermakovsky District, Natural Park “Ergaki”, Talovka ranger station N52.341828°, E93.164233°	6Л4Б <i>Larix sibirica</i> – 60% <i>Betula pendula</i> – 40%	<i>Carex macroura</i> (50%) <i>Corydalis bracteata</i> (10%) <i>Anemone jenseensis</i> (5%)
Кузнецкий Алатау (Республика Хакасия) / Kuznetsk Alatau (Republic of Khakassia)			
CB4	Смешанный лес разнотравно-осочковый; Ширинский р-н, окр. пос. Коммунар Mixed forest with forb and sedge cover; Shirinsky district, Kommunar village N54.347447°, E89.293087°	4Е3Б3Л <i>Picea obovata</i> – 40% <i>Betula pendula</i> – 30% <i>Larix sibirica</i> – 30%	<i>Carex macroura</i> (60%) <i>Corydalis bracteata</i> (20%) <i>Calamagrostis langsdorffii</i> (15%)
Кузнецкий Алатау (Кемеровская область) / Kuznetsk Alatau (Kemerovo Region)			
CB5	Пихтово-осиновый лес крупнотравный, окр. г. Кемерово; 55.470358° с.ш., 86.235021° в.д. Fir-aspen forest, with tall herbs, Kemerovo district, Kemerovo; N55.470358°, E86.235021°	7Ос3П <i>Populus tremula</i> – 70% <i>Abies sibirica</i> – 30%	<i>Corydalis bracteata</i> (20%) <i>Anemone altaica</i> (10%) <i>Erythronium sibiricum</i> (10%)
Алтай (Алтайский край) / Altai (Altai Territory)			
CB6	Смешанный лес разнотравно-орляковый; Смоленский район, окр. г. Белокурихи Mixed forest with forbs and bracken; Smolensky district, Belokurikha N51.916393°, E84.960607°	4Б3С3Ос <i>Betula pendula</i> – 40% <i>Pinus sylvestris</i> – 30% <i>Populus tremula</i> – 30%	<i>Pteridium pinetorum</i> (70%) <i>Carex macroura</i> (40%) <i>Corydalis bracteata</i> (30%) <i>Aegopodium podagraria</i> (20%)

bracteata sensu lato, произрастающих в горах Южной Сибири.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор материала проводился в мае – июне 2018–2022 гг. в пределах Красноярской лесостепи (Емельяновский р-н), северо-восточной части Западного Саяна (Ермаковский р-н) Красноярского края, в восточных отрогах Кузнецкого Алатау (Ширинский р-н, Республика Хакасия), в центральной части Кузнецкого Алатау (окр. г. Кемерово), а также в предгорьях Алтая (окр. г. Белокурихи, Алтайский край) (рис. 1). Объектами исследований служили 6 популяций желтоцветковой хохлатки (табл. 1).

Измерения морфометрических параметров для оценки внутри- и межпопуляционной изменчивости проводились на 30 генеративных особях в каждой популяции. Для репрезентативности выборки использовался метод случайного отбора: по выбранной наугад линии, не повторяющей каких-либо определенных условий, отбиралось каждое седьмое растение (Shmidt, 1984). Большая часть оцениваемых нами морфометрических признаков приводится в качестве диагностических для определения видов во “Флоре Сибири” (Flora..., 1994). Измерены следующие параметры: длина цветоноса (x_1); длина стебля (x_2); количество цветков (x_3); длина прикорневой чешуи (x_4); длина (x_5), ширина (x_6), количество зубчиков (x_7) нижнего прицветника; длина отгиба (x_8), длина шпорца (x_9) венчика нижнего цветка; длина (x_{10}), ширина (x_{11}) клубенька в пазухе прикорневой чешуи. Также вычислялись относительные признаки: отношение длины цветоноса к длине стебля (x_1/x_2); форма нижнего прицветника (x_5/x_6); отношение длины венчика к длине шпорца (x_8/x_9); длина венчика (x_8+x_9); размер клубенька в пазухе прикорневой чешуи ($x_{10}*x_{11}$).

Тестирование данных на нормальность распределения признаков проводили с помощью метода Шапиро – Уилка (Shapiro, 1968). При математической обработке данных рассчитывали пределы варьирования признака, среднее арифметическое и его ошибку, среднее квадратичное отклонение, коэффициент вариации. Для установления достоверных различий

между средними значениями измеренных признаков использовали тест Тьюки, позволяющий проводить попарные сравнения между средними значениями каждой группы, реализуемые в пакете stats для RStudio версии 3.6.2. (Miller, 1981; Chambers, 1992; Yandell, 1997). Для изучения сопряженной изменчивости и выявления диагностического комплекса ключевых индикаторных признаков в общей морфологической структуре растений был использован метод главных компонент (Principal component analysis, PCA), реализованный в базовом пакете stats, с последующей визуализацией с помощью пакета factoextra версия 1.0.7 для R (Kassambara, Mundt, 2020). Собственные значения значимых факторов превышали единицу согласно критерию Кайзера (Kaiser, 1960), а совместный вклад в общую дисперсию составлял более 80%.

Образцами для генетического анализа служили выделенные ДНК 5–10 экземпляров из каждой популяции. Экстракцию тотальной ДНК производили с помощью коммерческого набора DiamondDNA (ООО «Научно-производственная фирма “Алтайбиотех”», Барнаул). Для изучения генетической изменчивости использовался ISSR-PCR (Inter Simple Sequence Repeats) метод. Амплификацию проводили в 20 мкл реакционной смеси с помощью набора для проведения ПЦР с HS-Taq (+MgCl₂) (ООО “Биолабмикс”, Новосибирск) в следующем составе на один образец: 7 мкл ddH₂O; 4 мкл 5x ПЦР буфер (+MgCl₂); 4 мкл 10мМ праймера; 0.2 мкл HS-Taq DNA-полимеразы (5 ед. акт/мкл); 0.4 мкл 50x смеси dNTP; 2.4 мкл 50мМ MgCl₂; 2 мкл ДНК.

Программа амплификации: 95°C (5 мин); 13 циклов: 95°C (20 с), 55°C (45 с, понижение температуры на 0.7°C в каждом последующем цикле), 72°C (90 с); 25 циклов: 95°C (20 с), 44°C (30 с), 72°C (90 с); 72°C (7 мин). Предварительно на 2 образцах ДНК были выявлены праймеры, дающие воспроизводимый полиморфный результат (Mansour et al., 2009; Paterson et al., 2009). Разделение продуктов амплификации производилось в 1.3%-м агарозном геле в горизонтальной электрофорезной камере в ТАЕ-буфере при 220 V с применением бромистого этидия. Визуализацию продуктов амплификации проводили в проходящем УФ-излучении с помощью системы гель-документирования

Gel Doc XR (Bio-Rad, USA). Для определения длины амплифицированных фрагментов использовали ДНК-маркеры (ООО “Биолабмикс”, Новосибирск).

Электрофореграммы анализировали с помощью программы Quantity One 1-D Analysis Software. При этом учитывали только воспроизводимые в повторных экспериментах фрагменты. Обработку результатов анализа проводили с помощью программы Popgene version 1.32 (Yeh et al., 1999) и определяли: процент полиморфных локусов (P), генетическое разнообразие Нея (I_o), информационный индекс Шеннона (H_o), генетические дистанции Нея (D), показатель подразделенности популяций (G_{st}). Дендрограмма сходства особей популяций строилась при помощи R-пакета pvcust (Suzuki, Shimodaira, 2006) невзвешенным парно-групповым методом (UPGMA — unweighted pair-group method using arithmetic average) при 5000 репликаций бутстрэпа.

Для оценки генетической структуры популяций на основе данных ISSR-PCR анализа был использован байесовский подход (MCMC: марковская цепь Монте-Карло), реализованный в программном обеспечении STRUCTURE версии 2.3.4. (Pritchard et al., 2000). Использовалось длительное выгорание (Burn-In) 100 000 и MCMC 500 000 циклов. При проведении нескольких прогонов результаты были равнозначными, что говорит о стабильности результатов. Количество возможных кластеров (K) проверялось от 2 до 10.

Для проведения филогенетического анализа секвенировали участки хлоропластной ДНК: ген *matK* с использованием праймеров 1R_KIM (5'-CGT-ACA-GTA-CTT-TTG-TGT-TTA-CGA-G-3') и 3F_KIM (5'-CCC-AGT-CCA-TCT-GGA-AAT-CTT-GGT-TC-3') (Kim, 2010) и межгенный участок *rpoB-trnC* с праймерами rpoBF (5'-CCT-TGA-TCA-ATG-AAC-CTA-CAA-AAT-C-3') и trnCRR (5'-ATT-TGC-AGT-CCT-CTG-CCT-TAC-3') (Miikeda et al., 2006) производства ЗАО “Евроген” (г. Москва) в двух повторностях. Полимеразную цепную реакцию проводили в 50 мкл реакционной смеси с помощью набора для проведения ПЦР Биомастер HS-Taq ПЦР-Color 2x (ООО “Биолабмикс”, Новосибирск) в следующем составе на один образец: 25 мкл готовой PCR-смеси

(ООО “Биолабмикс”, Новосибирск), 21 мкл ddH₂O, по 1 мкл 10мМ соответствующих праймеров (forward и revers), 2 мкл ДНК. Программа амплификации: 3 мин 95°C; 35 циклов: 20 с 95°C, 30 с 57°C, 30 с 72°C; 5 мин 72°C. Для секвенирования использовали набор реактивов BigDye Terminator v. 3.1 (Applied Biosystems, MD, USA). Определение нуклеотидных последовательностей Forward цепей ПЦР-продуктов проводили методом Сэнгера на секвенаторе ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, MD, USA) (ЦКП “Геномика” СО РАН, г. Новосибирск).

Выравнивание последовательностей проводили с использованием алгоритма MUSCLE (Edgar, 2004), реализованного в программе MEGA X (Kumar et al., 2018). Для филогенетического анализа использовался метод максимального правдоподобия (maximum likelihood, ML) со значением параметра бутстрэпа 1000. В анализ были включены по 6 последовательностей, впервые секвенированных для *C. bracteata* s.l. участков *matK* и *rpoB-trnC*. Из базы данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) были добавлены наиболее похожие соответствующие последовательности хохлаток секции *Corydalis* (Zhang et al., 2008; Xu et al., 2022). В качестве аутгруппы использовали вид *Fumaria officinalis* L. При поиске мутаций их положение определялось при выравнивании секвенированных нами образцов на соответствующую последовательность BK063235 *Corydalis intermedia* (L.) Mérat как принадлежащую к наиболее близкородственному виду из имеющихся в базе данных GenBank.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Изученные популяции *Corydalis bracteata* s.l. произрастают в подтаежных смешанных сосново-березовых, березово-лиственных лесах, черневых осинниках и пихтарниках (табл. 1).

Оценку межпопуляционной изменчивости признаков хохлаток производили по 11 морфометрическим признакам и 5 относительным параметрам (табл. 2). В результате изучения внутрипопуляционной изменчивости установлено, что большинство вегетативных признаков вида характеризуются высоким и очень высоким уровнями изменчивости согласно шкале С.А. Мамаева (Мамаев, 1972). Наименее

Таблица 2. Среднепопуляционные значения признаков *Corydalis bracteata* s.l.
Table 2. Average population values of *Corydalis bracteata* s.l.

	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5	CB6
x1 – Длина цветоноса, см x1 – Peduncle length, cm	4.11 ± 0.96	3.57 ± 0.70	2.02 ± 0.39	5.69 ± 0.81	2.74 ± 0.37	1.70 ± 0.31
x2 – Длина стебля, см x2 – Stem length, cm	28.06 ± 1.32	27.07 ± 1.35	17.66 ± 1.05	19.89 ± 1.92	9.09 ± 0.40	12.23 ± 0.72
x3 – Количество цветков, ед. x3 – Number of flowers, pcs	4.57 ± 0.78	4.70 ± 0.72	4.59 ± 0.65	9.37 ± 1.52	9.74 ± 1.09	4.49 ± 0.60
x4 – Длина прикорневой чешуи, см x4 – Length of scale leaf, cm	1.53 ± 0.11	1.80 ± 0.17	1.69 ± 0.10	1.52 ± 0.13	1.65 ± 0.11	1.13 ± 0.09
x5 – Длина нижнего прицветника, мм x5 – Length of lowermost bract, mm	21.83 ± 1.74	22.04 ± 1.35	18.10 ± 1.30	18.69 ± 1.63	15.28 ± 0.77	11.09 ± 0.89
x6 – Ширина нижнего прицветника, мм x6 – Width of lowermost bract, mm	11.33 ± 0.87	12.35 ± 0.85	10.28 ± 1.06	12.23 ± 1.46	9.66 ± 0.72	6.86 ± 0.78
x7 – Количество зубчиков нижнего прицветника, ед. x7 – Number of lowermost bract teeth, pcs	5.50 ± 0.34	5.13 ± 0.19	6.21 ± 0.38	7.27 ± 0.91	5.66 ± 0.28	5.09 ± 0.32
x8 – Длина отгиба венчика нижнего цветка, см x8 – Length of corolla limb of lowermost flower, cm	1.92 ± 0.10	2.04 ± 0.07	1.70 ± 0.07	1.60 ± 0.08	1.23 ± 0.08	1.21 ± 0.07
x9 – Длина шпорца венчика нижнего цветка, см x9 – Length of spur of lowermost flower, cm	1.70 ± 0.06	1.71 ± 0.05	1.49 ± 0.08	1.51 ± 0.08	0.77 ± 0.08	1.19 ± 0.07
x10 – Длина клубенька, мм x10 – Tuber length, mm	5.39 ± 0.90	8.39 ± 1.55	–	–	–	–
x11 – Ширина клубенька, мм x11 – Tuber width, mm	4.25 ± 0.52	4.80 ± 0.64	–	–	–	–
x5/x6 – Отношение длины нижнего прицветника к его ширине x5/x6 – Length to width ratio in lowermost bract	1.98 ± 0.17	1.82 ± 0.15	1.82 ± 0.13	1.59 ± 0.12	1.66 ± 0.12	1.71 ± 0.16
x8/x9 – Отношение длины отгиба венчика нижнего цветка к длине шпорца x8/x9 – Limb length to spur length ratio in corolla of lowermost flower	1.13 ± 0.06	1.20 ± 0.04	1.15 ± 0.05	1.07 ± 0.05	1.75 ± 0.15	1.05 ± 0.08
x8+x9 – Длина цветка, см x8+x9 – Flower length, cm	3.62 ± 0.14	3.75 ± 0.10	3.18 ± 0.14	3.11 ± 0.14	2.00 ± 0.14	2.40 ± 0.10
x10*x11 – Размер клубенька x10*x11 – Tuber size	25.61 ± 6.80	43.91 ± 12.18	–	–	–	–

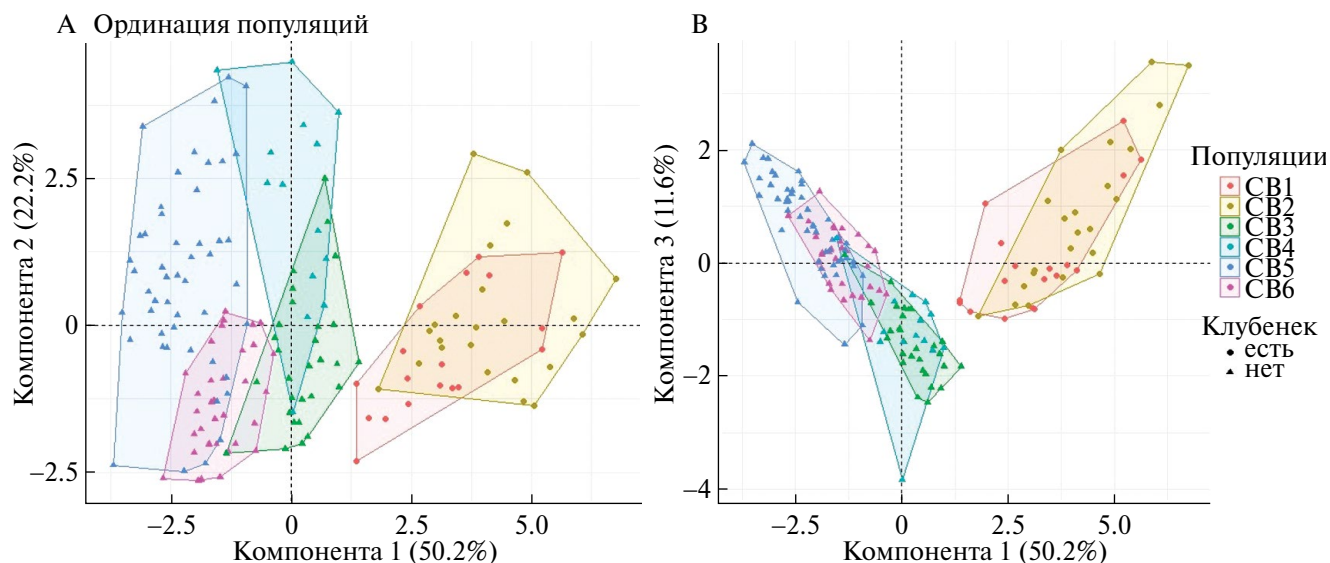


Рис. 2. Ординация популяций в плоскостях 1 и 2 компонент (А) и 1 и 3 компонент (В).

Fig. 2. Ordination of populations in the planes of the 1st and 2nd components (A), and 1st and 3rd components (B).

изменчивыми являются признаки цветка: x_8 (коэффициент вариации изменяется от 9 до 25%), x_9 ($C_v = 8-37\%$), x_8+x_9 ($C_v = 7-26\%$). Высокая степень изменчивости характерна для длины цветоноса x_1 ($C_v = 38-65\%$) и сопряженных с ним параметров x_1/x_2 ($C_v = 41-63\%$), ($38-48\%$).

Максимальные размеры осевых органов (x_1 , x_2) наблюдаются у особей красной популяции хохлатки СВ1, длина цветоноса и стебля которых варьирует от 1.5 до 9.2 см и от 22.9 до 39.3 см соответственно. Также высокие показатели длины стебля характерны для западно-сибирской СВ2 (21.2–34.6 см), а длинные цветоносы отмечены для хакасской популяции СВ4 (1–9.9 см). Генеративные органы наилучшим образом развиты у особей популяций из Кузнецкого Алатау СВ4 и СВ5, где число цветков составляет 6–21 и 3–17 соответственно. Минимальная длина шпорца характерна для кемеровской СВ5 и алтайской СВ6 популяций и составляет 4–15 мм. Самые крупные венчики наблюдаются у особей популяций СВ1 (2.6–4.1 см) и СВ2 (3.3–4.2 см). Миниатюрные прицветники характерны для СВ5 (длина 10–21 мм, ширина 6–17 мм) и СВ6 (длина 7–17 мм, ширина 3–16 мм).

Следует отметить, что все представители популяций СВ1 и СВ2 содержали дочерний (дополнительный) клубенок 3–17 мм длиной и 3–8 мм шириной в пазухе прикорневой чешуи,

тогда как у особей популяций СВ3–СВ6 он отсутствовал.

Для выявления достоверных различий между исследуемыми признаками проведен тест Тьюки. В табл. 3 указано количество достоверных различий при попарном сравнении популяций. Так, красная популяция СВ1 и западно-сибирская СВ2 демонстрируют максимальные отличия от хакасской СВ4 и кемеровской СВ5. Морфологическим сходством обладают популяции СВ1 и СВ2, а также западно-сибирская СВ3 и хакасская СВ4.

Ввиду слабой информативности, связанной с низким уровнем внутри- и межпопуляционной изменчивости, из дальнейшего анализа были удалены следующие признаки: x_4 , x_6 , x_5/x_6 , x_8/x_9 . В результате изучения сопряженной изменчивости морфометрических признаков хохлаток с использованием РСА-метода выявлено, что первые три компонента являются значимыми. Их собственные значения превышают 1, а суммарный вклад в общую дисперсию равен 84.07%. Первая главная компонента наиболее тесно связана сильной положительной связью с признаками осевых органов, размером цветка и клубенька в пазухе прикорневой чешуи (x_2 , x_5 , x_8 , x_9 , x_8+x_9 , x_{10} , x_{11} , $x_{10}*x_{11}$). Вторая компонента описывает признаки количества цветков и параметры цветоноса (x_1 , x_1/x_2 , x_3), третья представляет признаки количества зубчиков прицветника (x_7).

Таблица 3. Количество достоверных различий морфометрических признаков между популяциями (тест Тьюки)
Table 3. The number of significant differences in morphometric characteristics between populations (Tukey’s test)

	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5
CB2	3				
CB3	9	10			
CB4	12	12	4		
CB5	13	12	8	9	
CB6	11	11	8	11	9

Ординация особей популяций в плоскостях первой и второй компонент обособляет популяции CB1 и CB2, имеющие длинные стебли и прицветники, крупные цветки, а главное — крупный вытянутый клубенок в пазухе прикорневого листа (рис. 2). Другие популяции не имеют клубенька и образуют вторую совокупность. Группа из 4 популяций также дифференцирована. Особи кемеровской (CB5) и алтайской (CB6) популяций, характеризующиеся короткими стеблями, мелкими цветками и прицветниками, несколько обособляются от популяций CB3 и CB4, занимающих промежуточное положение. Обращает на себя внимание распределение популяций относительно второй компоненты: CB3 и CB6 характеризуются короткими цветоносами, а CB4 и CB5 длинными цветоносами с большим количеством цветков. Также разделение наблюдается в плоскостях первой и третьей компонент: CB1, CB2, CB5, CB6 характеризуются малым, а CB3, CB4 — большим количеством зубчиков нижнего прицветника. Таким образом, мы видим четкое разделение популяций по морфологическим признакам на две группы. Первая представлена красноярской (CB1) и западносибирской (CB2) популяциями, которые характеризуются длинными стеблями, крупными прицветниками. Однако их главное отличие — крупный вытянутый клубенок в пазухе прикорневой чешуи. Аналогичные признаки характерны для недавно описанного вида *C. talpina* — хохлатки кротовой.

Вторая группа популяций объединяет многоцветковые растения, не имеющие клубенька в пазухе прикорневой чешуи: западносибирскую CB3, хакасскую CB4, кемеровскую CB5 и алтайскую CB6. В табл. 4 приводим наиболее

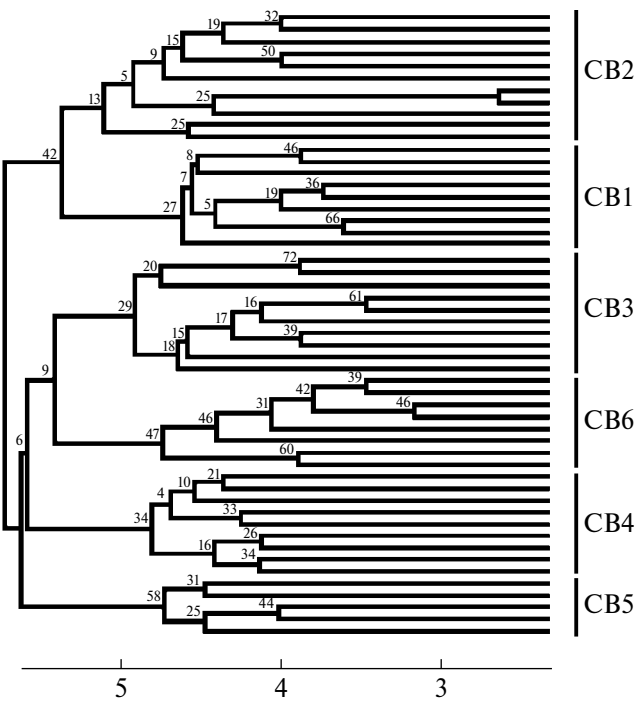


Рис. 3. Дендрограмма сходства образцов *Corydalis bracteata* s.l. на основе ISSR-PCR анализа.
Fig. 3. Dendrogram of similarity of *Corydalis bracteata* s.l. samples based on ISSR-PCR analysis.

информативные морфологические признаки, разделяющие наши популяции на две группы. Генетический полиморфизм 6 популяций изучен с помощью ISSR-PCR метода. В анализе использованы ISSR-праймеры, дающие воспроизводимый полиморфный результат: HB12, HB14, ISSR17, ISSR23 (Zietkiewicz et al., 1994). Выявлено 89 фрагментов ДНК, суммарный полиморфизм которых составляет 100% (табл. 5). Число амплифицированных фрагментов ДНК, в зависимости от праймера, варьировало от 19 (HB12 и ISSR23) до 29 (ISSR17). Генное разнообразие Нея (H_e) в суммарной выборке

Таблица 4. Значимые диагностические признаки хохлаток из родства *Corydalis bracteata* s.l.
Table 4. Significant diagnostic features of *Corydalis* affined to *C. bracteata* s.l.

Популяция Population	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5	CB6
Местоположение Location	Красноярская лесостепь (Красноярский край) Krasnoyarsk forest-steppe (Krasnoyarsk Territory)	Западный Саян (Красноярский край) Western Sayan (Krasnoyarsk Territory)	Западный Саян (Красноярский край) Western Sayan (Krasnoyarsk Territory)	Кузнецкий Алатау (Республика Хакасия) Kuznetsk Alatau (Republic of Khakassia)	Кузнецкий Алатау (Кемеровская область) Kuznetsk Alatau (Kemerovo Region)	Алтай (Алтайский край) Altai (Altai Territory)
Вид Species	<i>C. talpina</i>		<i>C. bracteata</i>			
Стебель Stem	Длинные (21–39 см) Long (21–39 cm)		Средней длины (10–29 см) Medium length (10–29 cm)		Короткие (6–16 см) Short (6–16 cm)	
Количество цветков Number of flowers	2–9			2–16 Длинные цветоносы относительно стеблей 2–16 Long peduncles relative to stems		2–9
Количество зубчиков прицветника Number of bract teeth	4–6		5–10		3–6	
Длина прицветника, мм Bract length, mm	15–28		12–26		7–20	
Клубенек Tuber	Вытянутый 2–9 мм дл. 3–6 мм шир. Elongated 2–9 mm long 3–6 mm wide	Вытянутый Длина 2–17 мм Ширина 2–7 мм Elongated Length 2–17 mm Width 2–7 mm	Нет None	Нет None	Нет None	Нет None
Длина шпорца, мм Spur length, mm	15–20		11–19		4–15	

составило 0.3331, индекс Шеннона (I_o) – 0.4991. Уровень выявляемого внутрипопуляционного генетического разнообразия средний (47.19–65.17%). Показатели генетического полиморфизма максимальны для западносаянских популяций CB2 ($P = 65.17\%$; $H_e = 0.2337$; $I_o = 0.3495$) и CB3 ($P = 61.80\%$; $H_e = 0.2187$; $I_o = 0.3289$). Минимальные значения отмечены

для кемеровской CB5 ($P = 47.19\%$; $H_e = 0.1888$; $I_o = 0.2769$) и алтайской CB6 ($P = 53.93\%$; $H_e = 0.1854$; $I_o = 0.2808$) популяций. Коэффициент подразделенности популяций (G_{st}) составляет 0.3758. Таким образом, на долю межпопуляционного разнообразия приходится 37%, а изученные популяции демонстрируют очень высокую степень дифференциации согласно

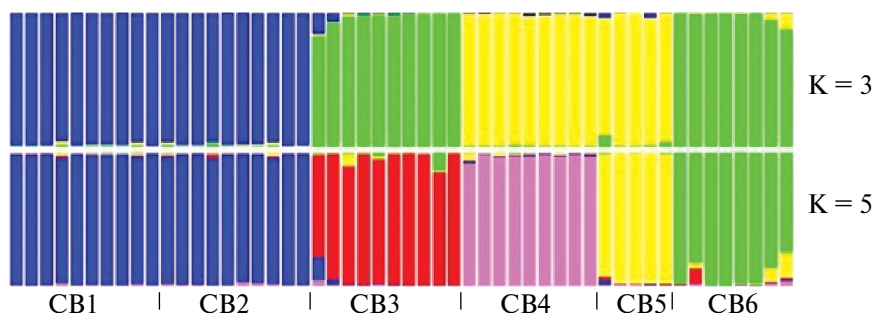


Рис. 4. Апостериорная вероятность отнесения образцов *Corydalis bracteata* s.l. к генетическим кластерам на основе анализа ISSR-PCR.

Fig. 4. Posterior probability of assigning *Corydalis bracteata* s.l. samples to genetic clusters based on ISSR-PCR analysis.

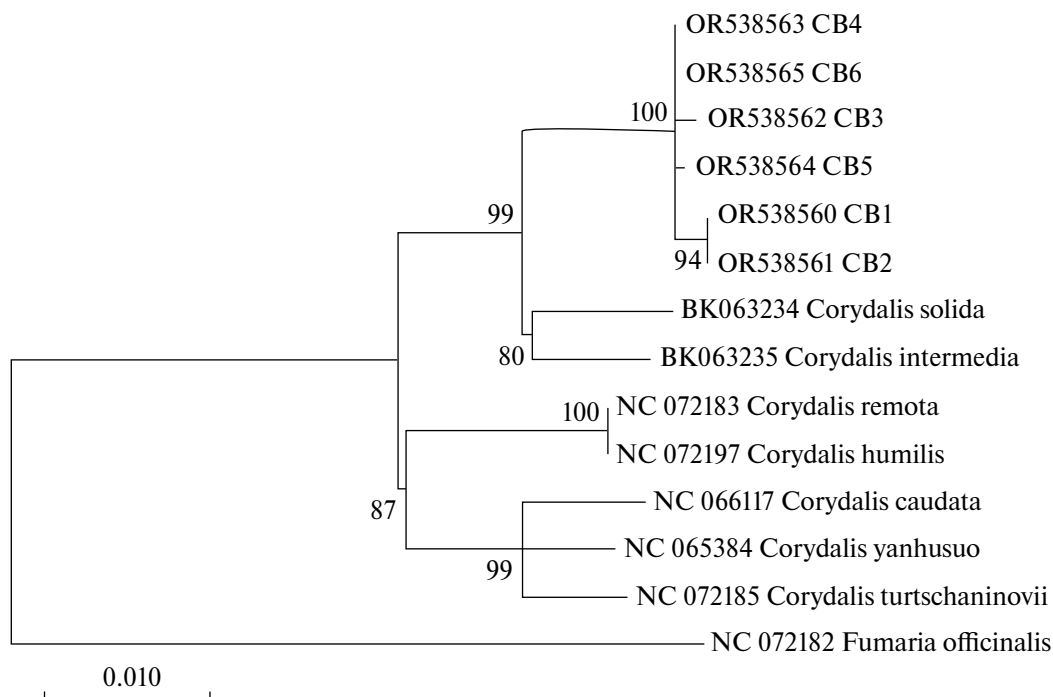


Рис. 5. Филогенетическое древо видов секции *Corydalis*, построенное на последовательностях гена *matK* и межгенного спейсера *rpoB-trnC* хлоропластной ДНК методом максимального правдоподобия (ML). Цифрами обозначены значения бутстрэпа. Длина ветвей пропорциональна количеству замен.

Fig. 5. Phylogenetic tree of the species of the *Corydalis* section, built based on sequences of the *matK* gene and the intergenic spacer *rpoB-trnC* of chloroplast DNA by the maximum likelihood (ML) method. The numbers indicate bootstrap values. The length of the branches is proportional to the number of substitutions.

классификации С. Райта (Wright, 1978), что может указывать на присутствие в исследуемой выборке представителей разных видов.

Наибольшее значение генетических дистанций Нея (Nei, 1972) (D) наблюдается между популяциями СВ2 и СВ5 и составляет 0.2799 (табл. 6). Минимальные генетические различия отмечены между популяциями СВ1 и СВ2 ($D = 0.1428$). Генетическую обособленность от других демонстрирует кемеровская популяция

СВ5 ($D = 0.2098$ – 0.2799). Следует отметить, что алтайская популяция СВ6 обнаруживает генетическое сходство с западносибирской СВ3 ($D = 0.1743$).

Дендрограмма сходства особей популяций, построенная на основе данных ISSR-PCR анализа, представлена на рис. 3. Особи разных популяций формируют обособленные группы. Генетическое сходство демонстрируют

Таблица 5. Полиморфизм межмикросателлитных фрагментов ДНК, амплифицированных ISSR-PCR методом
Table 5. Polymorphism of intermicrosatellite DNA fragments amplified by ISSR-PCR method

ISSR-праймер	Последовательность Sequence (5' → 3')	Общее число фрагментов Total number of fragments		Число полиморфных фрагментов ДНК (%) Number of polymorphic DNA fragments (%)					
		Всего Total	Полиморфных Polymorphic	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5	CB6
HB12	(CAC) ₃ GC	19	19	11 (57%)	13 (68%)	13 (68%)	11 (57%)	8 (42%)	11 (57%)
HB14	(CTC) ₃ GC	22	22	13 (59%)	13 (59%)	11 (50%)	11 (50%)	8 (36%)	7 (31%)
ISSR23	(AC) ₈ TA	19	19	6 (32%)	11 (58%)	14 (74%)	11 (58%)	12 (63%)	13 (68%)
ISSR17	(GACA) ₄	29	29	19 (66%)	21 (72%)	17 (59%)	20 (69%)	14 (48%)	17 (59%)
Всего Total		89	89	49 (55%)	58 (65%)	55 (62%)	53 (60%)	42 (47%)	48 (54%)

Таблица 6. Генетические дистанции М. Нея (1972) на основе ISSR-PCR
Table 6. Nei's genetic identity (1972) based on ISSR-PCR

	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5
CB2	0.1428				
CB3	0.2072	0.1944			
CB4	0.2068	0.1879	0.1612		
CB5	0.2243	0.2799	0.2314	0.2098	
CB6	0.241	0.2696	0.1743	0.2431	0.2048

популяции CB1 и CB2, имеющие дополнительный клубенок.

Анализ структуры распределения генотипов особей в программе STRUCTURE показывает, что исследуемые образцы максимально можно разделить на пять генетических кластеров (рис. 4). Основываясь на диаграмме вероятностей отнесения каждого образца к пяти кластерам, можно достоверно объединить популяции CB1 и CB2. Образование этой устойчивой группы свидетельствует о давнем относительно других популяций генетическом обособлении. Оставшиеся образцы дифференцируются в соответствии с принадлежностью к популяциям при K = 5.

Для филогенетического анализа нами было отобрано по одному образцу из исследуемых популяций. При анализе последовательностей на участке гена *matK*, длиной 761 п.н.

обнаружена трансверсия в положении 532 – характерный для всех последовательностей хохлаток аденин заменился на цитозин у образцов, выделяемых нами в вид *C. talpina* (CB1 и CB2). Эта миссенс-мутация приводит к замене аминокислоты треонина на пролин в полипептиде матуразы К. У западносибирского образца из CB3 обнаружены другие замены: трансверсия С на А в положении 551, приводящая к замене серина на тирозин и транзиция G на А в положении 813 (синонимичная мутация).

В межгенной области *rpoB-trnC* длиной 732 п.н. у особей популяций CB1 и CB2 найдена двойная замена AC на TA (положения 643–644), а кемеровский образец CB5 отличается от представителей других популяций однонуклеотидной заменой цитозина на тимин в положении 63.

При построении филогенетических деревьев на основе анализа последовательностей ДНК

гена *matK* и спейсера *rpoB-trnC* выявлена сходная топология. На рис. 5 приведено консенсусное дерево, построенное на основе анализа этих двух участков хлоропластной ДНК. Представители сибирских популяций *C. bracteata* с высокой степенью вероятности формируют отдельную кладу, занимающую терминальное положение. Причем особи из популяций СВ1 и СВ2 наиболее обособлены. Сестринскую с ними кладу образуют европейские виды *Corydalis intermedia* и *Corydalis solida* (L.) Clairv., имеющие фиолетово-розовые цветки. Отдельные кладу образуют азиатские (дальневосточные, китайские, корейские) виды хохлаток, отличающиеся друг от друга цветом и размерами венчика, формой плодов и строением нектарника. Согласно классификации М. Лидена, все приведенные виды хохлаток относятся к секции *Corydalis* (Liden, Zetterlund, 1997).

Следует отметить, что последовательно-сти видов, формирующих обособленные кладу, имеют от 0 до 16 вариабельных сайтов для участка *matK* и от 0 до 13 — для *rpoB-trnC*. Таким образом, между отдельными и хорошо различающимися видами, такими как *Corydalis remota* Fisch. и *Corydalis humilis* B.U. Oh et Y.S. Kim, могут отсутствовать различия в изучаемых последовательностях ДНК.

ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе морфологического анализа *Corydalis bracteata* s.l. на территории Южной Сибири было выявлено разделение изученных популяций на две группы. Особи красноярской (СВ1) и западносибирской (СВ2) популяций характеризуются длинными стеблями, крупными прицветниками и цветками. Однако основным отличием, сближающим представителей данных популяций с недавно описанным видом *C. talpina* (хохлаткой кротовой), является наличие крупного вытянутого клубенька в пазухе прикорневого листа. Подобное явление наблюдается и у других видов рода. Так, Т.А. Безделева (Bezdeleva, 2010) приводит две жизненные формы для вида *C. remota*: клубневой геофит без клубенька в пазухе прикорневого листа с коротким столоном и столонно-клубневой геофит с длинным ортотропным столоном и образующимся дочерним клубнем.

Однако результаты, полученные в ходе молекулярно-генетических исследований, также показывают различие красноярской и западносибирской популяций от остальной совокупности. В частности, при проведении ISSR-PCR анализа выявлено наличие в общей выборке особей, которые должны быть отнесены к разным видам, о чем свидетельствуют высокие значения коэффициента подразделенности популяций ($G_{st} = 0.3758$). Анализ последовательностей ДНК также обнаружил отличие в виде трех нуклеотидных замен у особей красноярской (СВ1) и западносибирской (СВ2) популяций не только по сравнению с представителями изучаемых популяций, но и с другими клубневыми хохлатками, последовательности ДНК которых размещены в базе данных GenBank. Таким образом, проведенный морфологический и генетический анализы указывают на генетическую обособленность хохлаток из популяций СВ1 и СВ2, которые, как мы полагаем, следует относить к виду *C. talpina*. Полученные нами в ходе филогенетического анализа дендрограммы не противоречат работам по филогении семейства Fumariaceae.

Следует отметить, что секвенирование участков хлоропластной ДНК (ген *matK*, спейсер *rpoB-trnC*) *C. bracteata* было проведено нами впервые. Наряду с данными последовательностями для филогении рода *Corydalis* другими авторами используются гены *rbcL*, *trnG* и межгенные спейсеры: *trnL-trnF*, *psbA-trnH* (Ren et al., 2019; Peng et al., 2023). Несмотря на то что участок ITS во многих исследованиях является эталонным маркером и зачастую используется для уточнения классификации семенных растений, для рода *Corydalis* он формирует противоречивую филогению ввиду своей мультикопийности (Jiang et al., 2018).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе морфологического анализа 6 популяций *Corydalis bracteata* s.l. выявлена высокая внутривидовая изменчивость признаков длины цветоноса и количества цветков, а также низкая изменчивость генеративных признаков. Диагностическими признаками, позволяющими разделить хохлатки на группы, являются: количество цветков, количество зубчиков прицветника и его размеры, длина шпорца

цветка, наличие клубенька в пазухе прикорневого листа.

В ходе ISSR-PCR анализа популяций хохлаток было показано высокое значение коэффициента подразделенности популяций ($G_{st} = 0.3758$). Уровень внутривидового генетического разнообразия — средний (47.19–65.17%). Показатели генетического полиморфизма максимальны для западносибирских популяций, минимальные значения отмечены для кемеровской и алтайской популяций.

Наибольшие значения генетических дистанций Нея (1972) наблюдаются между популяциями СВ2 и СВ5, СВ2 и СВ6 и составляют $D = 0.2799$ и $D = 0.2696$ соответственно. Эти результаты согласуются с морфологическим анализом популяций. Наибольшие морфологические различия также выявлены между этими парами популяций. Минимальные генетические и морфологические различия отмечены между красноярской СВ1 и западносибирской СВ2 популяциями ($D = 0.1428$), особи которых образуют дочерний клубенек.

В ходе анализа последовательностей хлоропластного гена матуразы К (*matK*) и межгенного спейсера *rpoB-trnC* обнаружены 3 нуклеотидные замены, отличающие особей из СВ1 и СВ2 от других популяций *C. bracteata*, причем одна из них приводит к замене аминокислоты. Перечисленные мутации отсутствуют как в последовательностях других видов, так и у особей близкородственных популяций. Также обнаружены две мутации в последовательности гена матуразы К у западносибирского образца СВ3 (синонимичная и миссенс-мутация), а кемеровский образец СВ5 отличается однонуклеотидной заменой в последовательности межгенного спейсера.

Филогенетические деревья, построенные на основе анализа участков *matK* и *rpoB-trnC*, обладают сходной топологией, а представители изучаемых нами популяций формируют хорошо обособленную кладу.

Таким образом, согласованные результаты морфологического и генетического анализов свидетельствуют о дифференциации популяций желтоцветковых хохлаток из Южной Сибири, изначально относимых к виду *Corydalis bracteata*

и указывают на морфологическую и генетическую обособленность *Corydalis talpina*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [Bezdeleva] Безделева Т.А. 2010. Структурное разнообразие травянистых растений флоры Дальнего Востока России. — Бюл. БСИ ДВО РАН. 5: 4–20.
- Chambers J.M., Freeny A.E., Heiberger R.M. 1992. Statistical Models in S. Wadsworth & Brooks Cole, Pacific Grove, California. 624 p.
- Edgar R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. — Nucleic Acids Res. 32 (5): 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- [Flora ...] Флора Сибири. 1994. Новосибирск. Т. 7. С. 32–42.
- GENBANK DataBase. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/> (Accessed 01.10.2023).
- Jiang L., Li M., Zhao F., Chu S., Zha L., Xu T., Peng H., Zhang W. 2018. Molecular Identification and Taxonomic Implication of Herbal Species in Genus *Corydalis* (Papaveraceae). — Molecules. 23 (6): 1393. <https://doi.org/10.3390/molecules23061393>
- Kaiser H.F. 1960. The application of electronic computers to factor analysis. — Educational and Psychological Measurement. 20 (1): 141–151. <https://doi.org/10.1177/001316446002000116>
- Kassambara F., Mundt F. 2020. Factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses. R package version 1.0.7.
- Kim K.-J. 2010. Broad-scale amplification of *matK* for DNA barcoding plants, a technical note. — Bot. J. Linn. Soc. 164: 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2010.01071.x>
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. — Mol. Biol. Evol. 35: 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Ledebour C.F. 1842. *Corydalis gracilis* Ledeb. — In: Flora Rossica. Vol. 1. Stuttgartiae. P. 97–106.
- Liden M., Zetterlund H. 1997. *Corydalis* a gardener's guide and a monograph of the tuberous species. — A G S Publications Limited. 140 p.
- [Malyshev] Малышев Л.И. 2012. Конспект флоры Азиатской России: Сосудистые растения. Новосибирск. 640 с.
- [Мамаев] Мамаев С.А. 1972. Формы внутривидовой изменчивости древесных растений. М. 284 с.
- Mansour A., Ismail H.M., Ramadan M.F., Gyulai G. 2009. Variations in tomato (*Lycopersicon esculentum*) cultivars grown under heat stress. — Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit. 4: 118–127. <https://doi.org/10.1007/s00003-009-0474-5>

- Miikeda O., Kita K., Handa T., Yukawa T. 2006. Phylogenetic relationships of *Clematis* (Ranunculaceae) based on chloroplast and nuclear DNA sequences. — Bot. J. Linn. Soc. 152: 153–168.
<https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2006.00551.x>
- [Mikhailova] Михайлова М.А. 2015. Основные направления эволюции в роде *Corydalis* (Fumariaceae). — Бот. журн. 100 (1): 3–14.
<https://doi.org/10.1134/S0006813615010019>
- Miller R.G. 1981. Simultaneous Statistical Inference. — Springer Series in Statistics. 311 p.
- Nei M. 1972. Genetic Distance between Populations. — Am. Nat. 106: 283–292.
- Paterson I.D., Downie D.A., Hill M.P. 2009. Using molecular methods to determine the origin of weed populations of *Pereskia aculeata* in South Africa and its relevance to biological control. — Biol. Control. 48 (1): 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.09.012>
- Peng H.W., Xiang K.L., Erst A.S., Erst T.V., Jabbour F., Ortiz R.D.C., Wang W. 2023. The synergy of abiotic and biotic factors correlated with diversification of *Fumarioideae* (Papaveraceae) in the Cenozoic. — Mol. Phylogenet. Evol. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2023.107868>
- [Peshkova] Пешкова Г.А. 1984. Растительность Сибири (Предбайкалье и Забайкалье). Новосибирск. 145 с.
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. — Genetics. 155: 945–959.
<https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945>
- R Core Team. 2013. Stats: The R stats package. R package version 3.6. 2.
- Ren F.M., Wang Y.W., Xu Z.C., Li Y., Xin T.Y., Zhou J.G., Qi Y.D., Wei X.P., Yao H., Song J.Y. 2019. DNA barcoding of *Corydalis*, the most taxonomically complicated genus of Papaveraceae. — Ecol. Evol. 9 (4): 1934–1945. <https://doi.org/10.1002/ece3.4886>
- Shapiro S.S., Wilk M.B., Chen H.J. 1968. A comparative study of various tests of normality. — Journal of the American Statistical Association. 63: 1343–1372.
- [Shmidt] Шмидт В.М. 1984. Математические методы в ботанике. Л. 288 с.
- [Stepanov] Степанов Н.В. 2015. Новые данные о желтоцветковых хохлатках (*Corydalis* DC. — Fumariaceae) секции *Corydalis* Красноярского края. — Вестник КрасГАУ. 6: 175–182.
- [Stepanov] Степанов Н.В. 2016. Сосудистые растения Приенисейских Саян. Красноярск. 252 с.
- Suzuki R., Shimodaira H. 2006. Pvcust: an R package for assessing the uncertainty in hierarchical clustering. Bioinformatics. 22: 1540–1542.
- WFO (2023): World Flora Online. Published on the Internet. <http://www.worldfloraonline.org/> (Accessed: 01.03.2023).
- Wright S. 1978. Evolution and the Genetics of Populations: Variability within and among natural populations. — University of Chicago Press. 590 p.
- Xu X., Li X., Wang D. 2022. New Insights Into the Backbone Phylogeny and Character Evolution of *Corydalis* (Papaveraceae) Based on Plastome Data. — Front Plant Sci. 13: 926574.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.926574>
- Yandell B.S. 1997. Practical data analysis for designed experiments. — Madras: Chapman and Hall. 312 p.
- Yeh F.C., Yang R.C., Boyle T. 1999. Popgene, version 1.32: the user friendly software for population genetic analysis. — Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada. P. 1–29.
- Zhang M.L., Su Z.Y., Lidén M. 2008. *Corydalis* DC. — Flora of China. Science Press, Beijing & Missouri Botanical Garden Press, St. Louis. 7: 295–428.
- Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. — Genomics. 20: 76–183.

COMPARATIVE MORPHOLOGICAL AND GENETIC ANALYSIS OF *CORYDALIS BRACTEATA* SENSU LATO (PAPAVERACEAE) POPULATIONS FROM SOUTHERN SIBERIA

K. K. Ryabova^{a,b,#}, I. E. Yamskikh^{a,##}, N. V. Stepanov^{a,###}, M. G. Kutsev^{a,c,####}

^aSiberian Federal University

Svobodnyy Ave., 79, Krasnoyarsk, 660049, Russia

^bFederal Research Center "Krasnoyarsk Science Center of the Siberian Branch of RAS"

Akademgorodok Str., 50, Krasnoyarsk, 660036, Russia

^cAltai State University

Lenin Ave., 61, Barnaul, 656049, Russia

[#]e-mail: ryabova.kseniya.k@mail.ru

^{##}e-mail: iyamskikh@mail.ru

^{###}e-mail: stepanov-nik@mail.ru

^{####}e-mail: m_kucev@mail.ru

This article presents the results of the first study of the morphological and genetic diversity of 6 populations of *Corydalis bracteata* Pers. s. l., growing in plant communities of the Krasnoyarsk forest-steppe, Western Sayan, Kuznetsk Alatau, Altai. The morphological analysis shows the division of the populations into two groups. A large elongated tuber near basal scales, large bracts and flowers, a large height of the plants unites the from the Krasnoyarsk and Western Sayan populations with a recently described species *C. talpina* Stepanov. These results are also confirmed by the ISSR-PCR analysis of the genetic variability of *Corydalis* populations. A high subdivision coefficient ($G_{st} = 37.58\%$) indicates the presence of different species in the total sample. The division into two groups is also demonstrated when clustering the genotypes using the Bayesian approach implemented in the STRUCTURE 2.3.4 software. Phylogenetic analysis based on comparison of the nucleotide polymorphism of the *matK* chloroplast gene sequences and the *rpoB-trnC* intergenic spacer also has revealed differences in three nucleotides in the plant with an additional tuber. These substitutions are absent in the sequenced plants without nodules and in sequences of other species with tufts of tubers published in GenBank. Similar results of morphological and genetic analyzes prove the differentiation of populations of yellow-flowered *Corydalis* in South Siberia, originally assigned to the species *C. bracteata*, and indicate the morphological and genetic isolation of *C. talpina*.

Keywords: morphological diversity, genetic diversity, *Corydalis bracteata* Pers., *Corydalis talpina* Stepanov, ISSR-PCR markers, phylogenetic analysis, Papaveraceae, Fumarioidae

REFERENCES

- Bezdeleva T.A. 2010. Strukturalnoye raznoobrazie travyanistykh rasteniy flory Dal'nego Vostoka Rossii [Structural diversity of herbar plants flora Far East of Russia]. – Byul. BSI DVO RAN. 5: 4–20 (In Russ.).
- Chambers J.M., Freney A.E., Heiberger R.M. 1992. Statistical Models in S. Wadsworth & Brooks Cole, Pacific Grove, California. 624 p.
- Edgar R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. – Nucleic Acids Res. 32 (5): 1792–1797.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Flora Sibiri [Flora of Siberia]. 1994. Novosibirsk. Vol. 7. P. 32–42 (In Russ.).
- GENBANK DataBase.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/> (Accessed 01.10.2023).
- Jiang L., Li M., Zhao F., Chu S., Zha L., Xu T., Peng H., Zhang W. 2018. Molecular Identification and Taxonomic Implication of Herbal Species in Genus *Corydalis* (Papaveraceae). – Molecules. 23 (6): 1393.
<https://doi.org/10.3390/molecules23061393>
- Kaiser H.F. 1960. The application of electronic computers to factor analysis. – Educational and Psychological Measurement. 20 (1): 141–151.
<https://doi.org/10.1177/001316446002000116>
- Kassambara F., Mundt F. 2020. factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses. R package version 1.0.7.

- Kim K.-J. 2010. Broad-scale amplification of *matK* for DNA barcoding plants, a technical note. — Bot. J. Linn. Soc. 164: 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2010.01071.x>
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. — Mol. Biol. Evol. 35: 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Ledebour C.F. 1842. *Corydalis gracilis* Ledeb. — In: Flora Rossica. Vol. 1. Stuttgartiae. P. 97–106.
- Liden M., Zetterlund H. 1997. *Corydalis* a gardener's guide and a monograph of the tuberous species. — A G S Publications Limited. 140 p.
- Malyshev L.I. 2012. Conspectus florum Rossiae Asiaticae: Plantae vasculares. Novosibirsk. 640 p. (In Russ.).
- Mamaev S.A. 1972. Formy vnutrividovoy izmenchivosti drevesnykh rasteniy. [Forms of intraspecific variation in woody plants]. Moscow. 284 p. (In Russ.).
- Mansour A., Ismail H.M., Ramadan M.F., Gyulai G. 2009. Variations in tomato (*Lycopersicon esculentum*) cultivars grown under heat stress. — Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit. 4: 118–127. <https://doi.org/10.1007/s00003-009-0474-5>
- Miikeda O., Kita K., Handa T., Yukawa T. 2006. Phylogenetic relationships of *Clematis* (Ranunculaceae) based on chloroplast and nuclear DNA sequences. — Bot. J. Linn. Soc. 152: 153–168. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2006.00551.x>
- Mikhailova M.A. 2015. The main evolution trends in the genus *Corydalis* (Fumariaceae). — Bot. Zhurn. 100 (1): 3–14 (In Russ.). <https://doi.org/10.1134/S0006813615010019>
- Miller R.G. 1981. Simultaneous Statistical Inference. — Springer Series in Statistics. 311 p.
- Nei M. 1972. Genetic Distance between Populations. — American Naturalist. 106: 283–292.
- Paterson I.D., Downie D.A., Hill M.P. 2009. Using molecular methods to determine the origin of weed populations of *Pereskia aculeata* in South Africa and its relevance to biological control. — Biol. Control. 48 (1): 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.09.012>
- Peng H.W., Xiang K.L., Erst A.S., Erst T.V., Jabbour F., Ortiz R.D.C., Wang W. 2023. The synergy of abiotic and biotic factors correlated with diversification of Fumarioideae (Papaveraceae) in the Cenozoic. — Mol. Phylogenet. Evol. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2023.107868>
- Peshkova G.A. 1984. Rastitel'nost' Sibiri [Vegetation of Siberia]. Novosibirsk. 145 p. (In Russ.).
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. — Genetics. 155: 945–959. <https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945>
- R Core Team. 2013. Stats: The R stats package. R package version 3.6.2.
- Ren F.M., Wang Y.W., Xu Z.C., Li Y., Xin T.Y., Zhou J.G., Qi Y.D., Wei X.P., Yao H., Song J.Y. 2019. DNA barcoding of *Corydalis*, the most taxonomically complicated genus of Papaveraceae. — Ecol. Evol. 9 (4): 1934–1945. <https://doi.org/10.1002/ece3.4886>
- Shapiro S.S., Wilk M.B., Chen H.J. 1968. A comparative study of various tests of normality. — Journal of the American Statistical Association. 63: 1343–1372.
- Shmidt V.M. 1984. Matematicheskie metody v botanike [Mathematical methods in botany]. Leningrad. 288 p. (In Russ.).
- Stepanov N.V. 2015. New data about yellow-flowered *Corydalis* (Fumariaceae) of section *Corydalis* in Krasnoyarsk region. — Vestnik KrasGAU. 6: 175–182.
- Stepanov N.V. 2016. Sosudistye rasteniya Priyeniseiskikh Sayan [Vascular plants of the Yenisei Sayans]. Krasnoyarsk. 252 p. (In Russ.).
- Suzuki, R., Shimodaira, H. 2006. Pvcust: an R package for assessing the uncertainty in hierarchical clustering. Bioinformatics 22: 1540–1542.
- WFO (2023): World Flora Online. Published on the Internet. <http://www.worldfloraonline.org/> (Accessed 01.03.2023).
- Wright S. 1978. Evolution and the Genetics of Populations: Variability within and among natural populations. — University of Chicago Press. 590 p.
- Xu X., Li X., Wang D. 2022. New Insights Into the Backbone Phylogeny and Character Evolution of *Corydalis* (Papaveraceae) Based on Plastome Data. — Front Plant Sci. 13: 926574. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.926574>
- Yandell B.S. 1997. Practical data analysis for designed experiments. — Madras: Chapman and Hall. 312 p.
- Yeh F.C., Yang R.C., Boyle T. 1999. Popgene, version 1.32: the user friendly software for population genetic analysis. — Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada. P. 1–29.
- Zhang M.L., Su Z.Y., Lidén M. 2008. *Corydalis* DC. — Flora of China. Science Press, Beijing & Missouri Botanical Garden Press, St. Louis. 7: 295–428.
- Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. — Genomics. 20: 76–183.

ФЛОРИСТИЧЕСКИЕ НАХОДКИ

ARTEMISIA VERLOTIORUM (ASTERACEAE) – НОВЫЙ ВИД ДЛЯ ФЛОРЫ АЗЕРБАЙДЖАНА

© 2024 г. Н. П. Мехтиева^{1,*}, К. К. Асадова¹, Нигяр Мурсал¹

¹Институт ботаники Министерства науки и образования Азербайджанской Республики
Бадамдарское шоссе, 40, Баку, AZ 1004, Азербайджан

*e-mail: naiba_m@mail.ru

Поступила в редакцию 17.10.2023 г.

После доработки 28.11.2023 г.

Принята к публикации 05.12.2023 г.

Впервые во флоре Азербайджана (Большой Кавказ западный, Малый Кавказ северный, Ленкоранская низменность и Апшерон) выявлен новый инвазивный вид *Artemisia verlotiorum* Lamotte. Приведены сведения относительно обнаруженных популяций вида, их численности, занимаемой площади, а также краткое описание фитоценозов в местах произрастания.

Ключевые слова: *Artemisia verlotiorum*, инвазивный вид, распространение, Азербайджан, Большой Кавказ западный, Малый Кавказ северный, Ленкоранская низменность, Апшерон

DOI: 10.31857/S0006813624010079, **EDN:** EWIWQW

Artemisia verlotiorum Lamotte (полынь китайская, полынь Верло) – многолетнее растение семейства Asteraceae Dumort. с восточноазиатским нативным ареалом, впервые был описан из Европы (Verlot, 1876). С.Л. Мосякин с соавторами (Mosyakin et al., 2019) указывают на сходство *A. verlotiorum* с *A. vulgaris* L., *A. umbrosa* (Turcz. ex Besser) Turcz. ex A.DC. и *A. argyi* H.Lév. et Vaniot, вследствие чего многие исследователи при первичной идентификации часто принимали один вид за другой. Однако в отличие от *A. vulgaris* для *A. verlotiorum* характерно наличие более широких, светлых и плотных листьев, образование столонов и присутствие сильного приятного запаха.

В настоящее время вид натурализовался во многих регионах мира (Европа, Северная и Южная Африка, Западная Азия, Южная Америка, Австралия, Новая Зеландия) со статусом заносного, сорного растения (Pampanini, 1923; Brenan, 1950; Esler, 1987; Webb et al., 1988; Ling et al., 2006; Sánchez, Verloove, 2013; Espinar, 1997; Mosyakin et al., 2019 и др.). Полагаем, что способность этого вида как к вегетативному, так и к семенному размножению, а также неприхотливость к природным условиям произрастания (типы почв, климат, высотные пояса и т.п.) и

являются причиной его достаточно широкого распространения вне естественного ареала.

В Бразилии, Италии, Маврикии и других странах вид *A. verlotiorum* издавна использовался в народной медицине при нарушениях кровообращения, заболеваниях органов пищеварения и мочеполовой системы, почечной недостаточности, а также при гипертонии, лихорадке, гриппе и псориазе (Gurib-Fakim, 1996; Martinotti et al., 1997; Mootoosamy, Mahomoodally, 2014). В последние годы Shanoo Suroowan с соавторами (Suroowan et al., 2019) в результате изучения фармакологических свойств экстрактов *A. verlotiorum* выявлена антиоксидантная, антиферментативная и цитотоксическая активность, что позволило авторам сделать вывод о том, что вид заслуживает внимания для проведения дальнейших исследований, учитывая его потенциал при лечении различных хронических заболеваний.

До недавнего времени считалось, что из перечисленных выше 3 видов на территории Азербайджана встречается только *Artemisia vulgaris* (Polyakov, 1961; Asgerov, 2016).

Другой из указанных видов, *Artemisia verlotiorum*, вообще в Кавказском регионе впервые

зарегистрирован на Северном Кавказе, в окрестностях г. Батуми (Dubovik, Mosyakin, 1991), и затем на Южном Кавказе в Армении, в окрестностях г. Еревана (Gabrielian, Xirau, 1996).

В ходе полевых исследований, проведенных нами в различных районах республики в 2019–2023 гг., *A. verlotiorum* был обнаружен также и в Азербайджане, в 4 ботанико-географических районах — Большой Кавказ западный (Загатальский район), Малый Кавказ северный (Газахский район), Ленкоранская низменность (Ленкоранский и Астаринский районы) и Апшерон (п. Новханы и Кешля). Для Азербайджана *A. verlotiorum* в местных литературных и региональных флористических источниках до настоящего времени не указывался (Polyakov, 1961; гербарные фонды ВАК и LE), что дает нам основание считать *A. verlotiorum* новым видом для флоры Азербайджана. Можно допустить, что *A. verlotiorum* занесен в местную флору давно, но идентифицировался как имеющийся во флоре Азербайджана *A. vulgaris* и поэтому уже на стадии полевых исследований оставался без внимания. Однако редкая встречаемость и незначительные площади, занимаемые растением, все же указывают на его недавнее внедрение.

A. verlotiorum встречается от –24 м ниже ур. м. до 426 м над ур. м. в различных ценозах: культурные насаждения, прибрежная часть Каспийского моря, обочины арыков, заброшенные участки сведенного леса. Ниже приводим краткое описание местообитаний *A. verlotiorum* в различных районах.

Загатальский район (41°39'24.4" с.ш. 46°33'25.8" в.д.):

в окр. с. Парзиван на влажной почве, в 50 м от пахотного поля, численностью от 5 до 15 генеративных особей на 1 м², общая площадь группы 5 × 5 м. В ценозе зарегистрированы *Amaranthus retroflexus* L., *Polygonum aviculare* L., *Convolvulus arvensis* L., *Rumex crispus* L., *Mentha longifolia* (L.) Huds., *M. aquatica* L., *Sambucus ebulus* L., *Conium maculatum* L., *Trifolium repens* L., *Daucus carota* L., *Erigeron canadensis* L.;

Газахский район (41°05'57.76" с.ш. 45°23'26.04" в.д.):

в окр. с. Даг Касаманли на сухой почве опушки леса насчитывалось 5–7 генеративных особей на 1 м². В ценозе отмечены *Juglans regia* L.,

Corylus avellana L., *Prunus cerasifera* Ehrh., *Erigeron canadensis* L. и др.;

Астаринский район (38°27'30.8" с.ш. 48°52'41.6" в.д.):

на побережье Каспийского моря (г. Астара, городской бульвар), вблизи береговой волны на приморских песчаных местах среди бетонных волнорезов, где на протяжении 200 м встречается в виде небольших групп, включающих 6–12 генеративных особей. Из сопутствующих видов здесь отмечены *Solanum persicum* Willd. ex Roem. et Schult., *Erigeron canadensis* L., *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud., *Lythrum virgatum* L., *Atriplex prostrata* subsp. *calotheca* (Rafn) M.A. Gust. и др.;

Ленкоранский район (38°45'15.8" с.ш. 48°51'20.4" в.д.):

вдоль арыков в сорных группировках, в числе 6–8 прегенеративных особей на 1 м² около Ленкоранского областного научного центра;

Апшерон:

а) окр. пос. Новханы (40°34'26.1" с.ш. 49°45'59.1" в.д.; 40°34'27.7" с.ш. 49°57'6.0" в.д.), на пляже в зоне отдыха среди посадок культурных растений, таких как *Euonymus fortune* (Turcz.) Hand. Mazz., *Cupressus sempervirens* L., *Nerium oleander* L., *Rosa* sp., *Calendula officinalis* L., а также сорных — *Medicago caerulea* Less. et Ledeb., *Erigeron canadensis* L., *Chondrilla juncea* L., *Plantago major* L. и *Portulaca oleracea* L. нами были обнаружены прегенеративные особи *A. verlotiorum*;

б) окр. пос. Кешля (40°23'69.3" с.ш. 49°53'65.9" в.д.):

на садово-огородном участке как сорный вид в виде небольшой колонии площадью 2 × 2 м, растение произрастает скученно, небольшими группами, что объясняется вегетативным типом размножения.

У изъятых из естественных условий (Загатальский район) и посаженной на опытном участке Института ботаники генеративной особи *A. verlotiorum* на второй год наблюдалось появление молодых побегов от корневищ материнской особи. Однако за 3-летний период наблюдения пересаженной особи не было отмечено цветение и плодоношение.

Проведенные нами мониторинговые исследования указывают на неравные адаптационные возможности *A. verlotiorum* в указанных выше районах республики, и жизненность растения, скорее всего, зависит от условий

произрастания – климатических особенностей, качества почвы, режима увлажнения и др.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую благодарность научному сотруднику Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН И.В. Татанову за сведения о гербарном материале по видам *Artemisia* Кавказа в Гербарии LE.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Asgerov A.M. 2016. The plant world of Azerbaijan. Baku. 444 p. (In Azer.).
- Brenan J.P.M. 1950. *Artemisia verlotiorum* Lamotte and its occurrence in Britain. – *Watsonia*. 1 (4): 209–223.
- [Dubovik, Mosyakin] Дубовик О.Н., Мосякин С.Л. 1991. *Artemisia verlotiorum* (Asteraceae) – новый адвентивный вид флоры Северного Кавказа. – *Бот. журн.* 76 (10): 1408–1411.
- Esler A.E. 1987. The naturalisation of plants in urban Auckland, New Zealand 3. Catalogue of naturalised species. – *N. Z. J. Bot.* 25: 539–558.
<https://doi.org/10.1080/0028825X.1987.10410085>
- Espinar A.L. 1997. Anthemideae. – In: *Flora fanerogámica Argentina*. Fasc. 46: Asteraceae, pt. 7. Córdoba, Argentina: Programa ProFlora (CONICET). 33 p.
- Gabrielian E., Xirau Vallès J. 1996. New data about the genus *Artemisia* L. (Asteraceae) in Armenia. – *Willdenowia*. 26: 245–250.
- Gurib-Fakim A. 1996. Volatile constituents of the leaf oil of *Artemisia verlotiorum* Lamotte and *Ambrosia tenuifolia* Sprengel (Syn.: *Artemisia psilostachya* auct. non L.). – *J. Essent. Oil Res.* 8: 559–561.
- Ling Y.R., Humphries C.J., Shultz L. 2006. *Artemisia*. – In: *Flora of China*. (Asteraceae). Beijing, St. Louis. Vol. 20–21. P. 694, 699.
- Martinotti E., Calderone V., Breschi M.C., Bandini P., Cioni P.L. 1997. Pharmacological action of aqueous crude extracts of *Artemisia verlotiorum* Lamotte (Compositae). – *Phytother. Res.* 11: 612–614.
- Mootoosamy A., Mahomoodally M.F. 2014. Ethnomedicinal application of native remedies used against diabetes and related complications in Mauritius. – *J. Ethnopharmacol.* 151: 413–444.
- Mosyakin S.L., Boiko G.V., Glukhova S.A. 2019. *Artemisia verlotiorum* (Asteraceae) in the continental part of Ukraine: now in Kyiv. – *Ukrainian Botanical Journal*. 76 (1): 3–8. <https://ukrbotj.co.ua/archive/76/1/3> (Accessed 12.10.2023)
- Pampanini R. 1923. Contributo alla conoscenza dell' *Artemisia verlotiorum* Lamotte. – *Bullettino della Società Botanica Italiana*. 1–2: 76–90.
- [Polyakov] Поляков П.П. 1961. Род *Artemisia* L. – *по-лынь*. – В кн.: *Флора Азербайджана*. Т. 8. Баку. С. 308–324.
- Sánchez Gullón E., Verloove F. 2013. New records of interesting vascular plants (mainly xenophytes) in the Iberian Peninsula. – *IV. Fol. Bot. Extremaurensis*. 7: 29–34.
- Suroowan S., Pynee K., Mahomoodally M. 2019. A comprehensive review of ethnopharmacologically important medicinal plant species from Mauritius. – *S. Afr. J. Bot.* 122: 189–213.
- Verlot J.B. 1876. *Artemisia umbrosa* Turcz. [Note extraite du Catalogue des graines du Jardin botanique de Grenoble, 1875, par M. J.-B. Verlot]. P. 73 in: [Anonymous]. Notes sur quelques espèces distribuées cette année [1876]. – *Bulletin de la Société Dauphinoise pour l'Échange des Plantes* [Première série de 1874 à 1889]. 3: 69–84.
- Webb C.J., Sykes W.R., Garnock-Jones P.J. 1988. *Flora of New Zealand*. Vol. 4. Christchurch: Botany Division, Department of Scientific and Industrial Research (DSIR), lxxviii + 1365 p.

ARTEMISIA VERLOTIORUM (ASTERACEAE), A NEW SPECIES TO THE FLORA OF AZERBAIJAN

N. P. Mehdiyeva^{a, #}, K. K. Asadova^a, Nigar Mursal^a

^a*Institute of Botany of the Ministry of Science and Education of the Republic of Azerbaijan
Badamdar Hwy., 40, Baku, AZ 1004, Azerbaijan*

[#]*e-mail: naiba_m@mail.ru*

For the first time, a new invasive species *Artemisia verlotiorum* Lamotte has been identified in the flora of Azerbaijan (western Greater Caucasus, Lankaran Lowland, Absheron and northern Lesser Caucasus). Information is provided regarding discovered populations of the species, their number, occupied area, as well as a brief description of the phytocenoses in the places where they occur.

Keywords: *Artemisia verlotiorum*, invasive species, distribution, Azerbaijan, Greater Caucasus western, Lesser Caucasus northern, Lankaran Lowland, Absheron

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors express their deep gratitude to I.V. Tatanov, a researcher at the V.L. Komarov Botanical Institute of the Russian Academy of Sciences, for information on herbarium material of *Artemisia* species of the Caucasus in the Herbarium LE.

REFERENCES

- Asgerov A.M. 2016. The plant world of Azerbaijan. Baku. 444 p. (In Azer.).
- Brenan J.P.M. 1950. *Artemisia verlotiorum* Lamotte and its occurrence in Britain. — *Watsonia*. 1 (4): 209–223.
- Dubovik O.N., Mosyakin S.L. 1991. *Artemisia verlotiorum* (Asteraceae) — a new adventitious species of the flora of the North Caucasus. — *Bot. Zhurn.* 76 (10): 1408–1411 (In Russ.).
- Esler A.E. 1987. The naturalisation of plants in urban Auckland, New Zealand 3. Catalogue of naturalised species. — *N. Z. J. Bot.* 25: 539–558.
<https://doi.org/10.1080/0028825X.1987.10410085>
- Espinar A.L. 1997. Anthemideae. — In: *Flora fanerogámica Argentina*. Fasc. 46: Asteraceae, pt. 7. Córdoba, Argentina: Programa ProFlora (CONICET). 33 p.
- Gabrielian E., Xirau Vallès J. 1996. New data about the genus *Artemisia* L. (Asteraceae) in Armenia. — *Willdenowia*. 26: 245–250.
- Gurib-Fakim A. 1996. Volatile constituents of the leaf oil of *Artemisia verlotiorum* Lamotte and *Ambrosia tenuifolia* Sprengel (Syn.: *Artemisia psilostachya* auct. non L.). — *J. Essent. Oil Res.* 8: 559–561.
- Ling Y.R., Humphries C.J., Shultz L. 2006. *Artemisia*. — In: *Flora of China*. (Asteraceae). Beijing, St. Louis. Vol. 20–21. P. 694, 699.
- Martinotti E., Calderone V., Breschi M.C., Bandini P., Cioni P.L. 1997. Pharmacological action of aqueous crude extracts of *Artemisia verlotiorum* Lamotte (Compositae). — *Phytother. Res.* 11: 612–614.
- Mootoosamy A., Mahomoodally M.F. 2014. Ethnomedicinal application of native remedies used against diabetes and related complications in Mauritius. — *J. Ethnopharmacol.* 151: 413–444.
- Mosyakin S.L., Boiko G.V., Glukhova S.A. 2019. *Artemisia verlotiorum* (Asteraceae) in the continental part of Ukraine: now in Kyiv. — *Ukrainian Botanical Journal*. 76 (1): 3–8. <https://ukrbotj.co.ua/archive/76/1/3> (Accessed 12.10.2023).
- Pampanini R. 1923. Contributo alla conoscenza dell' *Artemisia verlotiorum* Lamotte. — *Bullettino della Società Botanica Italiana*. 1–2: 76–90.
- Polyakov P.P. 1961. Genus *Artemisia* L. — wormwood. — In: *Flora of Azerbaijan*. Vol. 8. Baku. P. 308–324 (In Russ.).
- Sánchez Gullón E., Verloove F. 2013. New records of interesting vascular plants (mainly xerophytes) in the Iberian Peninsula. — *IV. Fol. Bot. Extremaurensis*. 7: 29–34.
- Suroowan S., Pynee K., Mahomoodally M. 2019. A comprehensive review of ethnopharmacologically important medicinal plant species from Mauritius. — *S. Afr. J. Bot.* 122: 189–213.
- Verlot J.B. 1876. *Artemisia umbrosa* Turcz. [Note extraite du Catalogue des graines du Jardin botanique de Grenoble, 1875, par M. J.-B. Verlot]. P. 73 in: [Anonymous]. Notes sur quelques espèces distribuées cette année [1876]. — *Bulletin de la Société Dauphinoise pour l'Échange des Plantes* [Première série de 1874 à 1889]. 3: 69–84.
- Webb C.J., Sykes W.R., Garnock-Jones P.J. 1988. *Flora of New Zealand*. Vol. 4. Christchurch: Botany Division, Department of Scientific and Industrial Research (DSIR), lxxviii + 1365 p.

**III ВСЕРОССИЙСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ С МЕЖДУНАРОДНЫМ
УЧАСТИЕМ “СИСТЕМАТИЧЕСКИЕ И ФЛОРИСТИЧЕСКИЕ
ИССЛЕДОВАНИЯ СЕВЕРНОЙ ЕВРАЗИИ”
(К 95-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ ПРОФЕССОРА
А. Г. ЕЛЕНЕВСКОГО) (МОСКВА, 19–21 октября 2023 г.)**

© 2024 г. В. П. Викторov^{1,*}, В. Н. Годин^{1,**}, Н. М. Ключникова¹, Н. Г. Куранова¹,
С. К. Пятунина¹

¹Московский педагогический государственный университет
ул. Кибальчича, 6, корп. 3, Москва, 129164, Россия

*e-mail: botanika@mpgu.su

**e-mail: vn.godin@mpgu.su

Поступила в редакцию 08.11.2023 г.

После доработки 10.11.2023 г.

Принята к публикации 05.12.2023 г.

DOI: 10.31857/S0006813624010095, EDN: EUSWTE

В период с 19 по 21 октября 2023 г. на базе кафедры ботаники Московского педагогического государственного университета (МПГУ) состоялась III Всероссийская конференция с международным участием “Систематические и флористические исследования Северной Евразии”, посвященная 95-летию со дня рождения проф. Андрея Георгиевича Еленевского — широко известного в России ботаника, внесшего огромный вклад в развитие отечественной систематики и флористики (Viktorov et al., 2014, 2018).

Диапазон научно-исследовательской и учебно-методической деятельности А.Г. Еленевского многогранен и отражен в более чем 200 публикациях разного уровня. Это крупные монографии, учебники и коллективные “Флоры” и “Определители” для отдельных регионов России, созданные под его руководством, теоретические статьи, заметки о редких и критических видах растений, учебно-методические пособия, работы, посвященные памяти выдающихся ботаников, рецензии на книги, словари и др. А.Г. Еленевского интересовали проблемы систематики и филогении, географии растений, флористики и флорогенеза, внутривидовой изменчивости и концепции вида и видообразования и др. Особая заслуга Андрея Георгиевича состоит в написании вузовских и школьных учебников. Под его руководством подготовлены

и защищены 18 кандидатских и 4 докторские диссертации.

В работе конференции приняли участие около 100 ученых из Москвы и 18 регионов России, а также иностранные специалисты из четырех стран. Материалы конференции опубликованы на русском языке (Systematic..., 2023).

Открыла совещание директор Института биологии и химии МПГУ С.К. Пятунина. Она поделилась своими воспоминаниями об Андрее Георгиевиче, отметила его огромный вклад в становление таксономического направления на кафедре ботаники МПГУ и пожелала успешной работы участникам конференции.

На первом пленарном заседании с докладом о научной школе А.Г. Еленевского “Региональные флоры и биологическое разнообразие таксонов” выступил В.П. Викторov (МПГУ, Москва). Он отметил основные вехи в творческой деятельности А.Г. Еленевского, поделился воспоминаниями о совместной работе как в лабораторных, так и в полевых условиях. Доклад А.П. Серегина (МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва) был посвящен результатам 20-летнего мониторинга изменения флоры национального парка “Мещера” (Владимирская область). С докладом об опережающих темпах роста биологических инвазий выступила Ю.К. Виноградова

(ГБС им. Н.В. Цицина РАН, Москва). Е.В. Черняева (МПГУ, Москва) посвятила свой доклад составу экзометаболитов и строению железистых трихом растений в функциональном и прикладном аспектах. О таксономическом составе коллекции типовых образцов гербария Томского государственного университета выступила **И.И. Гуреева** (ТГУ, Томск). **И.М. Калинин** (МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва) посвятила свой доклад истории преподавания ботаники в Московском университете в первое его пятидесятилетие. О структуре экзокарпия в роде *Polygonum* L. s.str. выступили **А.Г. Девятков** и **О.В. Юрцева** (МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва). **С.В. Федорова** (КФУ, Казань) показала, как можно использовать книжную серию “Наследие ботаников в Казанском университете” для патриотического воспитания студентов. **И.В. Беляева** (Royal Botanic Gardens Kew, Richmond, United Kingdom) поделилась результатами международного проекта “Загадка дерева жизни” как примера реализации проектной деятельности школьников и сотрудничества с научно-исследовательскими центрами. **Н.Г. Уланова** (МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва) в своем докладе продемонстрировала основные тренды динамики биологического разнообразия после природных и антропогенных “катастроф” в ельниках европейской части России. Пленарный доклад **А.А. Нотова** (ТвГУ, Тверь) был посвящен различиям в структурно-функциональной организации модульных животных, высших грибов и растений.

На заседании секции “**Систематика и морфология высших растений**” приняли участие 30 исследователей из Москвы, Санкт-Петербурга, Новосибирска, Абакана, Нижнего Новгорода и представлено 14 докладов, посвященных различным аспектам систематики и применению биоморфологических признаков в таксономии. В докладе **Т.А. Остроумовой** и **Е.А. Захаровой** (МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва) отражены результаты исследования структуры кристаллов в плодах некоторых видов клady *Caseae* и клady *Rhamnidoptereae* (*Apiaceae*). Гомология и аналогия соцветий на примере представителей семейств *Brassicaceae* и *Ranunculaceae* были рассмотрены в докладе **В.Е. Харченко** (ЛГАУ им. К.Е. Ворошилова, Луганск). Возможности и значение генетического анализа растений в экспертной деятельности отражены в докладе

М.В. Рябухиной (Экспертно-криминалистический центр МВД России, Москва) и **К.В. Крутовского** (ИОГен РАН, Москва). Большая часть докладов этой секции были посвящены структурной организации кустарниковых и полукустарниковых жизненных форм (**М.В. Костина**, **Н.С. Барабанщикова**, МПГУ, Москва), изучению листовой поверхности дерева на основе иерархического строения побеговых систем (**М.С. Телевинова**, **И.С. Антонова**, СПбГУ, Санкт-Петербург), морфологии *Scolochloa festucae* (**Е.А. Беляков**, ИБВВ им. А.Д. Папанина РАН, Борок), структуре ценопопуляций видов рода *Scutellaria* L. (**А.А. Гусева**, ЦСБС СО РАН, Новосибирск) и *Dracocephalum origanoides* (**Г.Р. Денисова**, **В.А. Черемушкина**, **А.Ю. Асташенков**, ЦСБС СО РАН, Новосибирск), особенностям архитектуры кроны *Quercus robur* L. в юго-восточной части ареала (**М.Н. Стаменов**, НГПУ им. К. Минина, Нижний Новгород), возрастным изменением в корнях растений рода *Iris* (**А.Г. Девятков**, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, **Н.Ю. Гудкова**, **Е.Ю. Бабаева**, **Ю.М. Минязева**, ВИЛАР, Москва) и т.д.

На заседании секции “**Флористика и флорогенетика**” было заслушано 7 докладов. Флористические доклады, выполненные в традиционном стиле, были посвящены дополнениям к флоре памятника природы регионального значения «Лесопарк “Затюменский”» (**О.Г. Воронова**, **Е.В. Патракеева**, ТюмГУ, Тюмень), разнообразию высших сосудистых растений центральной части хребта Хамар-Дабан (**Н.С. Гамова**, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва), конспекту весенней флоры сосудистых растений окрестностей озера Эльтон (**И.А. Савинов**, РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва), хорологическому анализу флоры амурского участка Транссибирской железнодорожной магистрали (**О.В. Котенко**, Амурский филиал Ботанического сада-института, Благовещенск), редким и новым видам флоры урочища Каменный холм и окрестностей (**Д.А. Курочкин**, **Н.Г. Куранова**, МПГУ, Москва) и др.

На заседании секции “**Гербарное дело**” было сделано 4 доклада. **Г.С. Антипина** и **В.И. Андросова** (ПГУ, Петрозаводск) выступили с докладом «Herbarium Flora Ingrica» — научный гербарий Петрозаводского университета. **Ю.И. Буланый** и **Е.А. Нющенко** (СНИГУ, Саратов) рассказали

о коллекторах и коллекции флоры Саратовской области в гербариях России. **М.В. Куликова** (ГБМ им. К.А. Тимирязева, Москва) сообщила об удивительных находках в гербарии Биологического музея. Гербарию Центрально-Лесного биосферного заповедника был посвящен доклад **Е.А. Шуйской** (Центрально-Лесной государственный заповедник, Тверская обл.) и **Г.Ю. Конечной** (БИН РАН им. В.Л. Комарова, Санкт-Петербург).

На заседании секции “**Геоботаника и фитоценология**” были представлены 7 докладов, посвященных сообществам однолетнесолянковых формаций в пустынной зоне северо-западного Прикаспия (**И.А. Горяев**, БИН РАН им. В.Л. Комарова, Санкт-Петербург), смене растительного покрова тугаев как индикатора процесса опустынивания низовьев Амударьи (**Н.К. Мамутов**, Каракалпакский гос. университет им. Бердаха, Нукус, Узбекистан, **У.Ж. Утениязова**, Нукусский гос. пед. ин-т им. Ажинияза, Нукус, Узбекистан), динамике видового состава напочвенного покрова в *Pineta sylvestris composita* (Nemoro-Boroherbosa) на территории Приокско-Террасного заповедника (**И.В. Припутина**, **Е.В. Зубкова**, **М.В. Андреева**, ИФХиБПП РАН, Пущино, **В.И. Грабовский**, ЦЭПЛ РАН, Москва), роли степного сурка (*Marmota bobak*) в поддержании флористического разнообразия остепненных лугов Брянского полесья (**А.В. Горнов**, **О.И. Евстигнеев**, **Е.А. Гаврилюк**, ЦЭПЛ РАН, Москва) и др.

На заседании секции “**Сохранение биоразнообразия**” были заслушаны 7 докладов. В большинстве докладов представлены результаты выявления особенностей биологии редких и охраняемых видов: оценка состояния наиболее редких охраняемых видов сосудистых растений Ставропольского края по категориям и критериям красного списка МСОП (**Л.Н. Арутюнова**, БИН РАН им. В.Л. Комарова, Санкт-Петербург), состояние реинтродукционных популяций *Trapa natans* (Трапасаеа) в реках Хопер и Волге на территории Саратовской области (**А.В. Богослов**, **А.С. Кашин**, **И.В. Шилова**, **А.С. Пархоменко**, **Л.В. Гребенюк**, **А.О. Кондратьева**, СГУ им. Н.Г. Чернышевского, Саратов), итоги интродукции видов семейства ландышевые Российского Дальнего Востока в Москве (**А.А. Ершова**, ГБС им. Н.В. Цицина РАН, Москва) и др.

На заседании секции “**Ботаническое образование**” участники конференции с большим интересом познакомились с докладами, посвященными образовательной деятельности. **Н.М. Ключникова** и **С.К. Пятунина** (МПГУ, Москва) рассказали об особенностях проведения промежуточной аттестации студентов по ботанике в МПГУ. **И.М. Пескова** и **К.Ю. Орищенко** (МПГУ, Москва) поделились трудностями при преподавании микологии в высшей и средней школе. В докладе **А.Ф. Мейсуровой**, **А.А. Нотова**, **Л.В. Зуевой**, **А.А. Колонтаевой**, **А.Р. Пигоревой**, **М.Е. Бычковой**, **И.И. Крыласова**, **В.Р. Беякова** (ТвГУ, Тверь) было рассказано о практике на Северном Кавказе как средстве более детального анализа охраняемого компонента флоры Тверской области. Зимнему саду в женской гимназии как основе эстетического воспитания был посвящен доклад **С.В. Федоровой** (КФУ, Казань).

На втором пленарном заседании с докладом о генетической дифференциации популяций *Colchicum bulbocodium* Ker Gawl. (Colchicaceae) европейской части России выступили **Т.А. Крицкая** и **А.С. Кашин** (СГУ им. Н.Г. Чернышевского, Саратов). **Н.Ю. Степанова**, **А.В. Федорова** и **И.А. Шанцер** (ГБС им. Н.В. Цицина РАН, Москва) привели данные по филогеографическому исследованию *Eversmannia subspinosa* по всему ее ареалу с использованием четырех пластидных маркеров.

На постерной сессии было проведено обсуждение представленных стендовых докладов.

Участниками отмечен высокий уровень организации и успешное проведение конференции и определены направления для дальнейших исследований. Учитывая вред чужеродных инвазионных видов для естественных биосистем, экономики и здоровья человека, необходимо усилить просветительскую деятельность среди населения всех категорий и возрастов и инициировать принятие на государственном уровне закона об ответственности за распространение чужеродных видов и расширение их ареалов. Проводить флористические исследования, имеющие высокую значимость для обоснования создания особо охраняемых природных территорий регионов. Вести работу по созданию региональных биологических флор с указанием основных таксономических, ареалогических,

биоморфологических, биологических и экологических характеристик видов. Считать гербарные коллекции, вне зависимости от их объема и местонахождения, национальным достоянием и основой для создания “Флоры России”; признать необходимость неотложных мер по выделению и расширению помещений гербариев, оснащению их современным оборудованием и штатами (необходимость оцифровки гербарных образцов, создания баз данных по гербарным коллекциям). Было отмечено снижение уровня ботанического образования в России и необходимость принятия реальных мер для решения проблемы: 1) совершенствование учебных планов вузов с включением специализированных учебных дисциплин по ботанике, в том числе номенклатуры растений; 2) организация курсов повышения квалификации, тренингов для научных работников, преподавателей вузов, аспирантов по современным проблемам ботаники; 3) обратить особое внимание на снижение уровня знаний школьников по ботанике и необходимость формирования у них целостного представления о растении как едином организме и его месте и роли в биосфере. С учетом интеграции исследований трех научных школ кафедры ботаники (профессоров И.Г. Серебрякова и

Т.И. Серебряковой, А.А. Уранова и А.Г. Еленевского) в будущем проводить регулярные (раз в 5 лет) объединенные научные конференции под названием “Научные школы кафедры ботаники МПГУ”. В 2024 году провести XI Всероссийскую конференцию с международным участием по экологической морфологии растений, посвященную памяти И.Г. и Т.И. Серебряковых.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [Systematic...] Систематические и флористические исследования Северной Евразии: материалы III Всероссийской конференции с международным участием (к 95-летию со дня рождения профессора А.Г. Еленевского). 2023. М. 411 с. <https://doi.org/10.31862/9785426312890>
- [Viktorov et al.] Викторов В.П., Годин В.Н., Пятунина С.К., Куранова Н.Г., Шустов М.В. 2014. Международная конференция “Систематические и флористические исследования Северной Евразии (к 85-летию со дня рождения проф. А.Г. Еленевского)”. — Бот. журн. 99 (7): 837–840.
- [Viktorov et al.] Викторов В.П., Годин В.Н., Ключникова Н.М., Куранова Н.Г., Курченко Е.И., Пятунина С.К. 2019. II Международная конференция “Систематические и флористические исследования Северной Евразии (к 90-летию со дня рождения проф. А.Г. Еленевского)”. — Бот. журн. 104 (2): 329–334. <https://doi.org/10.1134/S0006813619020108>

III ALL-RUSSIAN CONFERENCE WITH INTERNATIONAL PARTICIPATION “SYSTEMATIC AND FLORISTIC RESEARCH OF NORTHERN EURASIA” (ON 95-YEAR ANNIVERSARY OF PROFESSOR A.G. ELENEVSKY) (MOSCOW, OCTOBER 19–21, 2023)

V. P. Viktorov^{1, #}, V. N. Godin^{1, ##}, N. M. Klyuchnikova¹, N. G. Kuranova¹, S. K. Pyatunina¹

*Moscow Pedagogical State University
Kibalchicha str., 6, Bldg. 3, Moscow, 129164, Russia
#e-mail: botanika@mpgu.su
##e-mail: vn.godin@mpgu.su*

REFERENCES

- Sistematicheskie i floristicheskie issledovaniya Severnoy Evrazii: materialy III Vserossiyskoy konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem (k 90-letiyu so dnya rozhdeniya professora A.G. Elenevskogo). 2023. [Systematic and floristic research of Northern Eurasia (95-year anniversary of professor A.G. Elenevsky)]. Moscow. 411 p. (In Russ.). <https://doi.org/10.31862/9785426312890>
- Viktorov V.P., Godin V.N., Pyatunina S.K., Kuranova N.G., Shustov M.V. 2014. International conference “Systematics and floristic research of Northern Eurasia” (85-year anniversary of prof. A.G. Elenevsky). — Bot. Zhurn. 99 (7): 837–840 (In Russ.).
- Viktorov V.P., Godin V.N., Klyuchnikova N.M., Kuranova N.G., Kurchenko E.I., Pyatunina S.K. 2018. International conference “Systematics and floristic research of Northern Eurasia” (85-year anniversary of prof. A.G. Elenevsky). — Bot. Zhurn. 104 (2): 329–334 (In Russ.). <https://doi.org/10.1134/S0006813619020108>