

УДК: 633.8:581.8:57.033

СТРУКТУРА ЛИСТОВОЙ ПЛАСТИНКИ НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *ECHINACEA* МОЕНШ В УСЛОВИЯХ ИНТРОДУКЦИИ НА ЮЖНОМ БЕРЕГУ КРЫМА

Денис Константинович Солдатов¹, Илья Владимирович Булавин^{1,2},
Дарья Ивановна Калмыкова¹, Лидия Алексеевна Логвиненко¹,
Оксана Михайловна Шевчук^{1,2}

¹Никитский ботанический сад – Национальный научный центр,
298648, Республика Крым, г. Ялта, пгт Никита, спуск Никитский, 52
E-mail: den.alone.ru@mail.ru

²Севастопольский государственный университет,
299053, Республика Крым, г. Севастополь, ул. Университетская, 33
E-mail: oksana_shevchuk1970@mail.ru, cellbiolnbs@yandex.ru

Дана характеристика структуры листа пяти видов рода *Echinacea* Moench: (*E. angustifolia* DC. (интродукционный номер 9295), *E. pallida* (Nutt.) Nutt. (14709), *E. paradoxa* (Norton) Britton (6607), *E. purpurea* (L.) Moench (5807, 15309), *E. tenesseensis* (Beadle) Small (6106)) в связи с засухоустойчивостью в условиях ЮБК. На уровне световой микроскопии показана дорзовенральность листового аппарата и установлена вариабельность количественных анатомических признаков у исследуемых растений. На основе данных, полученных при анализе поперечных срезов листьев, проведена кластеризация, позволив выделить три группы: 1) *E. angustifolia*, 2) *E. purpurea* и *E. tenesseensis*, 3) *E. pallida* и *E. paradoxa*. Дополнительная оценка в баллах (от 1 до 6), где максимальное значение соответствует признаку, в наибольшей степени отражающему ксероморфизм, позволила выстроить ряд засухоустойчивых растений следующим образом: *E. tenesseensis* > *E. purpurea* (15309) > *E. purpurea* (5807) > *E. pallida* > *E. paradoxa* > *E. angustifolia*. Установлено, что наиболее приспособленными являются: *E. tenesseensis*, *E. purpurea* (15309 и 5807).

Для подтверждения анатомических особенностей на основе генетической близости между растениями проведена RAPD-ПЦР с праймерами ОРА1-10, которые давали воспроизводимые полосы и генерировали 209 ампликонов с длиной от 203,9 до 1000 и более пн. По результатам ПЦР-реакции построена дендрограмма. Согласно полученным данным выделены следующие кластеры: 1) *E. paradoxa*, 2) *E. purpurea* (5807 и 15309) с *E. tenesseensis*, 3) *E. angustifolia* с *E. pallida*. Формирование кластера 2 подтвердило генетическую близость *E. purpurea* (5807 и 15309) с *E. tenesseensis* и данные анатомического анализа.

Ключевые слова: эхинацея; лист; световая микроскопия; засухоустойчивость; генетическое сходство; RAPD-ПЦР

Введение

Одной из приоритетных задач отечественного здравоохранения является расширение ассортимента лекарственных средств за счет внедрения в медицинскую практику препаратов растительного происхождения. Для комплексного лечения и профилактики иммунодефицитных состояний в настоящее время широко используются виды рода *Echinacea* Moench (Kumar, 2011; Беляева, Бутенкова, 2018). Кроме того, для некоторых видов, в разной степени, также показана и противовоспалительная активность (Birt et al., 2008;). Высокая вероятность засухи на ЮБК в весенне-летний период может оказывать негативное влияние на ценность эхинацеи как лекарственного сырья, изменяя фитохимический состав или снижая урожайность (Киселева, 2012).

Изучение экологии видов, включая проведение анатомических исследований, лежит в основе их акклиматизации и интродукции, а также является теоретической основой повышения их продуктивности. Растение, попадая в новые условия, испытывает действие комплекса факторов, результатом чего является появление приспособительных

реакций, позволяющих адаптироваться к сложившимся условиям среды. Листья, являясь латеральными органами, выполняющими функции транспирации и фотосинтеза, характеризуются значительной пластичностью. Их строение во многом обуславливается водным режимом и освещенностью. Поэтому изучение внутривидовой изменчивости растений, культивируемых в новых природно-климатических условиях, является важным направлением биоэкологических исследований (Беяева, Бутенкова, 2018).

Исследование анатомо-морфологической изменчивости в комплексе с генетическим анализом позволяет выделять в разной степени обособленные группы (Князева, Хантемирова, 2020). Поэтому, целью данной работы было исследование структуры листовой пластинки представителей рода *Echinacea*, определение наиболее приспособленных видов/вида к условиям Южного берега Крыма и выявление генетической близости между различными растениями для подтверждения анатомических особенностей.

Объекты и методы исследования

Объектом исследования были пять видов *Echinacea* Moench: *E. angustifolia* DC., интродукционный номер 9295 (делектус, Германия, 1995 г.); *E. pallida* (Nutt.) Nutt., интродукционный номер 14709 (делектус, Германия, 2009 г.); *E. paradoxa* (Norton) Britton M., интродукционный номер 6607 (делектус, Австрия, 2007 г.); *E. purpurea* (L.) Moench, интродукционный номер 5807 (делектус, Польша, 2007 г.); *E. purpurea* (L.) Moench, интродукционный номер 15309 (делектус, Польша, 2009 г.), *E. tennesseensis* (Beadle) Small, интродукционный номер 6106 (делектус, Словакия, 2009 г.), культивируемые в Никитском ботаническом саду на коллекционных участках.

Исследование анатомии проводили на фиксированном материале. Листовые пластинки растений *ex situ* отрезали, делали высечки из центральной части и переносили их в пенициллиновые флаконы с раствором, состоящем из формалина (38%), ледяной уксусной кислоты, спирта этилового (96%) и воды (ФУС) в соотношении 1:0,5:5:3,5, с добавлением одной капли Твин-20. Обезвоживание материала осуществляли в спиртах восходящей концентрации (80%, 90%, 96%, 100%), в качестве промежуточной жидкости использовали толуол. Ткани пропитывали парафином при комнатной температуре и в термостате Digital Incubator 10L (Domel, Словения) (38, 58°C). Срезы толщиной 12–15 мкм изготавливали на полуавтоматическом ротационном микротоме Ротмик 2А (Орион Медик, Россия), наклеивали на предметные стекла, предварительно обработанные раствором белка куриного яйца, смешанного с глицерином в соотношении 1:1. Стекла со срезами сушили при помощи нагревательного столика Микростат-30/80 (Техном, Россия). Парафин удаляли толуолом. Стекла со срезами последовательно помещали в спирт, дистиллированную воду и окрашивали метиленовой синью. Для заключения использовали раствор сахарозы (60%) (Барыкина и др., 2004). Микропрепараты исследовали с применением светового микроскопа CX41 (Olympus, Япония), оснащённого цифровой камерой SC50 (Olympus, Германия) и программным обеспечением CellSens Imaging Software v 1.17. Анатомические исследования проводили на 10 разных образцах. Количество клеток – 30. Коэффициент палисадности определяли по формуле: ((высота слоя столбчатого мезофилла) / (высота слоя столбчатого мезофилла + высота слоя губчатого мезофилла))*100.

Тотальную ДНК выделяли из молодых неповрежденных листьев классическим способом с применением цетилтриметиламмоний бромидом (2×ЦТАБ) (Супрун и др., 2019) и 2% поливинилпирролидона (ПВП). Образцы растирали в ступках с буфером 2×ЦТАБ (2% ЦТАБ, 2% ПВП, 1,4 М NaCl, 100 мМ Трис-НСl, 20 мМ ЭДТА (рН 8.0), в соотношении 500 мкл буфера на 100 мг ткани, переносили в микропробирки типа Eppendorf объемом 0,2 мл, добавляли 2% β-меркаптоэтанол, быстро вортиксовали и

инкубировали 2 ч в твердотельном термостате TDB-120 (Biosan, Латвия), охлаждали до комнатной температуры, добавляли равный объем хлороформа, перемешивали 20 мин в термошейкере TS-100C (Biosan, Латвия) при 20°C и скорости вращения 250 об/мин, центрифугировали 10 мин при 5 тыс об/мин. Полученный супернатант отбирали, добавляли к нему 0,2 объема 5×ЦТАБ буфера (5% ЦТАБ, 350 мМ ЭДТА) и инкубировали 10 мин при 65°C. В охлажденные до 20°C пробирки с образцами вносили равный объем хлороформа, инкубировали 20 мин в термошейкере при 20°C, центрифугировали 10 мин при 5 тыс об/мин, отбирали супернатант. Процедуру повторяли дважды. После к супернатанту добавляли 1,5 объема буфера для преципитации (1% ЦТАБ, 50 мМ Трис-НСI, 10 мМ ЭДТА) и оставляли на 2 ч при комнатной температуре. Затем образцы центрифугировали 20 мин при 8 тыс об/мин, супернатант сливали, преципитат ДНК растворяли в 500 мкл солевого буфера (1 М NaCl, 10 мМ Трис-НСI, 1 мМ ЭДТА), нагревали до 65°C и оставляли на 5 мин при комнатной температуре. В пробирки с преципитатом добавляли 1 мл этилового спирта (96 %), слегка перемешивали и оставляли при температуре -20°C на 1 ч. После образцы центрифугировали 10 мин при 8 тыс об/мин, надосадочную жидкость сливали, а осадок промывали в 100 мкл 70% этилового спирта, высушивали и растворяли в 50 мкл стерильной дистиллированной воды типа 1 («Аквалаб-1» (Медиана Фильтр, РФ)). Количество и качество ДНК оценивали на спектрофотометре NanoPhotometer® NP80 (Implen, Германия) при длинах волн A₂₃₀, A₂₆₀ и A₂₈₀.

ПЦР проводили с применением набора БиоМастер HS-Тaq ПЦР (2×) (Биолабмикс, Российская Федерация) в соответствии с протоколом производителя (в перерасчете на 25 мкл), внося RAPD-праймеры (OPA1-10) и ДНК в концентрации 10-20 нг/мкл. Амплификацию проводили в термоциклере GeneExplorer™ GE-96S (Bioer, Китай). Условия реакции были следующими: начальная денатурация – 95°C – 5 мин, денатурация – 95°C – 30 с, отжиг – 36°C – 20 с, элонгация – 72°C – 1 мин, конечная элонгация – 72°C – 10 мин (30 циклов).

Амплифицированные фрагменты анализировали с помощью электрофореза в 1,7-1,8% агарозном геле с 0,5 × ТБЭ-буфером при 60-70 В в течение 1 ч с использованием универсального источника питания PowerPac™ (Bio-Rad, Сингапур). Агарозный гель визуализировали с применением системы геледокументации E-box (Vilber Lourmat, Франция). Полученные снимки геля анализировали в программе Image Lab™ версии 6.0 (Bio-Rad, США).

Статистический анализ выполняли в программном обеспечении Past v. 4.03 (Hammer et al., 2001). Выборки проверяли на нормальность распределения и, в зависимости от полученного результата, использовали либо t-критерий, либо U-тест при $p \leq 0,05$. Табличные данные представлены как $M \pm SE$. Для построения дендрограмм был использован метод невзвешенного парно-группового кластерного анализа с арифметическим усреднением (UPGMA). Для более точной статистической оценки вероятностного распределения был использован анализ бутстрэппинг с числом реплик, равным 1000. Процент повторов, при котором каждый узел поддерживается после многократной генерации выборок отображается на дендрограмме в соответствующем узле.

Результаты и обсуждение

Согласно полученным нами данным, у исследованных видов, культивируемых в условиях ЮБК, на поперечных срезах листовой пластинки в области центральной жилки дифференцировали эпидерму с кутикулой, несколько субэпидермальных слоев колленхимы в верхней и нижней частях, овальный проводящий закрытый коллатеральный пучок, состоящий из ксилемы и флоэмы, клетки паренхимы (рис. 1).

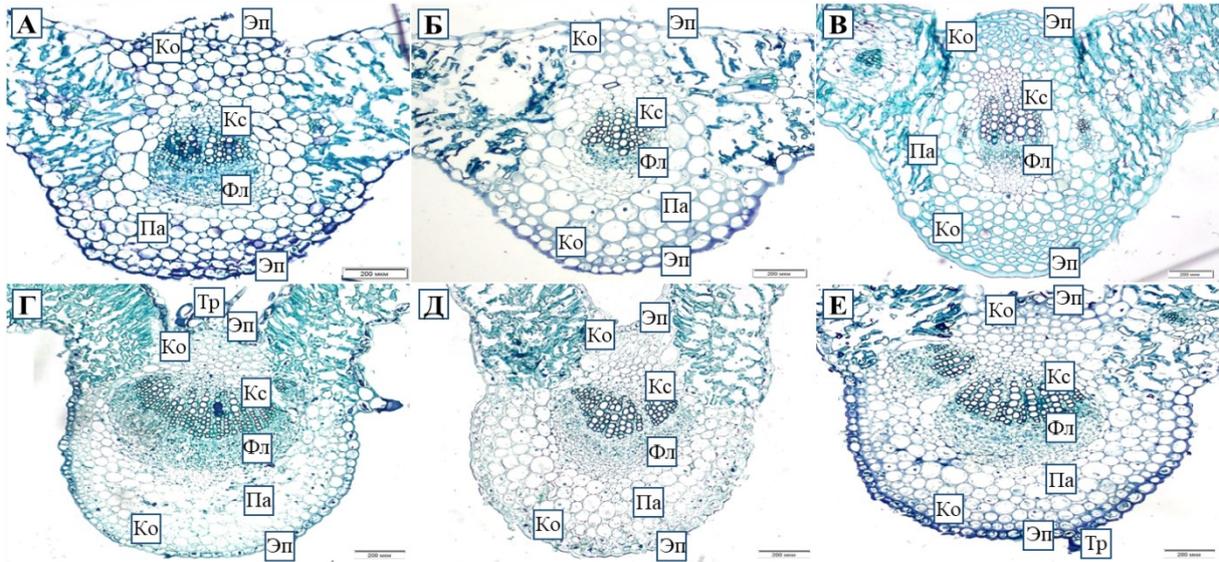


Рис. 1 Поперечный срез листа представителей рода *Echinacea* Moench в области центральной жилки:

А – *E. angustifolia*, Б – *E. pallida*, В – *E. paradoxa*, Г – *E. purpurea*, Д – *E. purpurea* (15309), Е – *E. tennesseensis*; Ко – колленхима, Кс – ксилема, Гр – трихом, Па – паренхима, Фл – флоэма, Эп – эпидерма (световая микроскопия, окрашивание метиленовой синью)

Fig. 1 *Echinacea* species midrib cross-section: А – *E. angustifolia*, Б – *E. pallida*, В – *E. paradoxa*, Г – *E. purpurea*, Д – *E. purpurea* (15309), Е – *E. tennesseensis*; Ко – collenchyma, Кс – xylem, Гр – trichome, Па – parenchyma, Фл – phloem, Эп – epidermis (light microscopy, methylene blue staining)

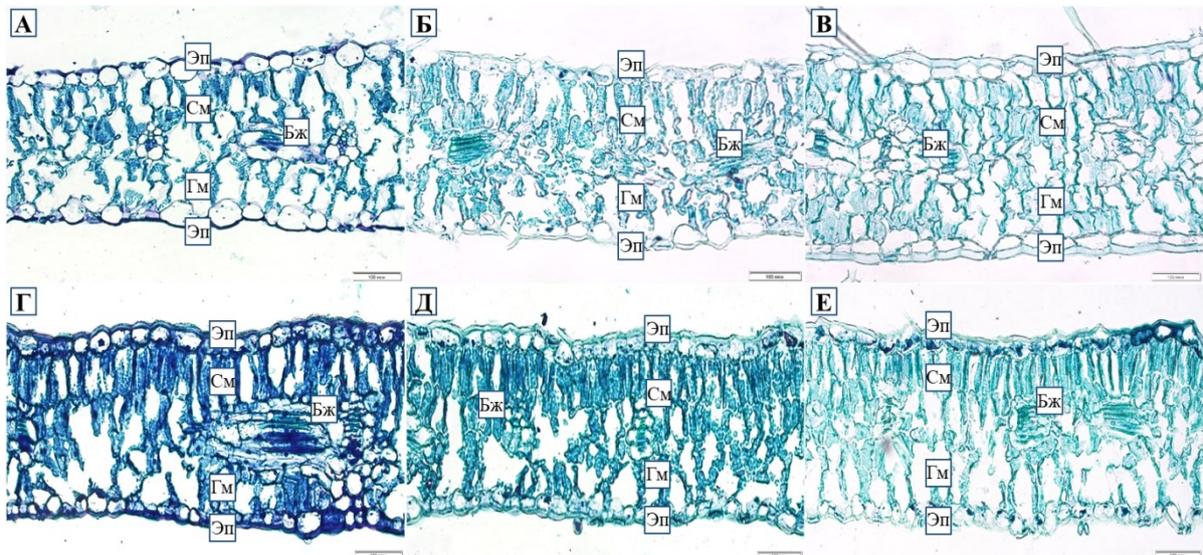


Рис. 2 Поперечный срез листа представителей рода *Echinacea* Moench в боковой части: А – *E. angustifolia*, Б – *E. pallida*, В – *E. paradoxa*, Г – *E. purpurea*, Д – *E. purpurea* (15309), Е – *E. tennesseensis*; Бж – боковая жилка, Гм – губчатый мезофилл, См – столбчатый мезофилл, Эп – эпидерма (световая микроскопия, окрашивание метиленовой синью)

Fig. 2 *Echinacea* species leaf lateral part cross-section: А – *E. angustifolia*, Б – *E. pallida*, В – *E. paradoxa*, Г – *E. purpurea*, Д – *E. purpurea* (15309), Е – *E. tennesseensis*; Бж – lateral vein, Гм – spongy mesophyll, См – palisade, Эп – epidermis (light microscopy, staining with methylene blue)

В боковой части листовой пластинки (рис. 2) на поперечном срезе выделяли однорядную верхнюю и нижнюю эпидерму, составленную клетками овально-

прямоугольной/прямоугольной формы, наружные тангентальные стенки которых были покрыты кутикулой. Столбчатый мезофилл состоял из одного-двух слоев клеток, вытянутых в радиальном направлении. Губчатый мезофилл – двух-трехслойный. Боковые жилки были представлены небольшими коллатеральными пучками, окруженными паренхимой. Фотосинтетические ткани упакованы относительно не плотно.

Согласно полученным нами количественным данным среди изучаемых видов и сорта – *E. paradoxa* обладает наибольшей толщиной кутикулы на адаксиальной и абаксиальной сторонах. Наименьшие значения по данному показателю у *E. angustifolia* (табл. 1).

Наибольшая толщина листа наблюдается у *E. paradoxa* в области центральной жилки и в боковой части, наименьшая – у *E. angustifolia* (область центральной жилки). Самые тонкие листовые пластинки в боковой части у *E. purpurea* (5807) и *E. tennesseensis*.

Сравнительно развитыми по высоте проводящими пучками обладали *E. purpurea* (5807, 15309), по ширине – *E. tennesseensis*, *E. purpurea* (5807). Наименьшие значения по данному параметру установлены у *E. angustifolia*.

Размеры клеток верхней и нижней эпидермы, столбчатого и губчатого мезофилла у видов варьировали. Тем не менее клетки *E. angustifolia* характеризовались большими линейными значениями, *E. tennesseensis* – меньшими.

Наиболее высокое значение коэффициента палисадности определено у *E. angustifolia* – 55%, в то время как у других представителей рода показатели варьировали от 42% до 49%.

На основе данных, полученных при исследовании поперечных срезов листовых пластинок, была построена дендограмма (рис. 3А), позволив выделить три кластера, исходя из структурной организации органов. Следует отметить *E. angustifolia* как растение, имеющее отличные количественные показатели. Также была проведена кластеризация (рис. 3Б) после присвоения баллов (от 1 до 6), где максимальное значение соответствует признаку, в наибольшей степени отражающему ксероморфизм. Формирование кластеров осталось подобным, за исключением взаимосвязи между *E. tennesseensis*, *E. purpurea* (15309) и *E. purpurea* (5807), степень которой незначительно изменилась. Тем не менее, это позволило выстроить ряд засухоустойчивых растений следующим образом: *E. tennesseensis* > *E. purpurea* (15309) > *E. purpurea* (5807) > *E. pallida* > *E. paradoxa* > *E. angustifolia*.

Проведен генетический анализ между пятью видами: *E. purpurea* (5807, 15309), *E. tennesseensis*, *E. angustifolia*, *E. pallida*, *E. paradoxa*. Исползованные в работе 10 праймеров ОРА давали воспроизводимые полосы (рис. 4) и генерировали 209 ампликонов (в среднем 20,9 на праймер) с длиной от 203,9 (ОРА 4) до 1000 (ОРА 8) и более пн (ОРА 1, 4, 5, 8, 6, 7, 10).

Количество полос в выбранных праймерах варьировало от 2 (ОРА 3) до 8 (ОРА 1, 5). Процент полиморфизма праймеров находился в диапазоне от 33,3 % (ОРА 2) до 75 % (ОРА 8) (табл. 2).

На основе продуктов амплификации праймеров, давших полиморфизм был проведен анализ генетической близости между рассматриваемыми видами *Echinacea*. Согласно полученным результатам *E. paradoxa* образует отдельный кластер (рис. 5).

Таблица 1

**Количественные анатомические показатели поперечных срезов листьев некоторых видов
рода *Echinacea* Moench**

Table 1

Leaf transverse sections' quantitative anatomical parameters of some *Echinacea* species

Параметр / Parameter	Ang	Pall	Par	Purp ¹	Purp ²	Tenn
Толщина листа в области центральной жилки / Leaf thickness in the midrib	681,85±55,45	1005,46±50,10	1098,14±53,65	953,69±45,69	865,32±33,59	895,45±55,06
Высота проводящего пучка / Conductive bundle height	198,09±10,76	255,06±7,84	288,60±12,08	315,72±23,93	304,60±68,58	259,67±17,12
Ширина проводящего пучка / Conductive bundle width	226,23±15,99	226,76±17,12	226,36±6,97	355,59±37,12	286,89±32,17	424,86±18,69
Количество элементов ксилемы / Number of xylem elements	44,8±1,85	56,8±3,06	40,4±3,81	89,8±9,22	58,6±4,94	95,0±19,57
Толщина листа в боковой части / Leaf thickness in lateral part	349,34±14,94	391,68±13,98	453,32±20,98	267,94±6,23	308,96±17,09	275,31±15,55
Толщина кутикулы над верхней эпидермой / Cuticle thickness above upper epidermis	8,38±1,14	10,45±1,57	19,21±1,98	8,26±0,78	10,04±1,03	10,03±0,73
Толщина кутикулы над нижней эпидермой / Cuticle thickness above lower epidermis	7,21±0,71	10,47±0,97	21,37±1,81	8,89±1,18	7,21±0,56	8,75±0,78
Высота клеток верхней эпидермы / Upper epidermis cell height	34,08±1,33	29,71±1,63	31,91±1,85	33,21±1,39	26,55±1,21	30,79±1,10
Ширина клеток верхней эпидермы / Upper epidermis cell width	62,97±5,68	42,32±2,37	51,18±1,79	42,39±1,77	41,56±3,11	40,45±1,82
Высота клеток нижней эпидермы / Lower epidermis cell height	42,26±1,98	31,99±1,17	36,92±1,76	29,30±1,10	29,87±1,31	25,53±1,44
Ширина клеток нижней эпидермы / Lower epidermis cell width	55,47±3,17	50,64±4,97	62,12±5,87	38,67±0,87	32,79±2,10	35,86±2,35
Количество слоев столбчатого мезофилла / Number of palisade layers	2,4±0,24	2,0±0	2,2±0,2	1,6±0,24	1,4±0,24	1,6±0,24
Высота слоев столбчатого мезофилла / Height of palisade layers	144,32±4,97	145,50±9,40	161,76±13,89	96,03±10,31	100,11±16,21	88,27±10,56
Высота клеток столбчатого мезофилла / Palisade cell height	73,25±1,95	75,50±3,26	74,82±3,01	59,86±2,09	73,68±2,03	55,11±1,35
Ширина клеток столбчатого мезофилла / Palisade cell width	21,44±0,97	21,30±1,21	20,78±1,08	15,09±0,66	16,09±0,83	14,24±0,65
Количество слоев губчатого мезофилла / Number of spongy mesophyll layers	2,4±0,24	3,6±0,24	3,0±0	3,0±0	3,0±0,32	3,4±0,4
Высота слоев губчатого мезофилла / Height of spongy mesophyll layers	117,61±11,36	158,29±11,14	190,87±15,23	102,01±13,99	131,33±10,49	123,16±14,29
Высота клеток губчатого мезофилла / Height of spongy mesophyll cells	43,23±3,06	41,94±2,52	42,36±3,07	28,18±2,04	27,29±1,83	27,21±1,62
Ширина клеток губчатого мезофилла / Spongy mesophyll cell width	24,90±2,40	25,05±1,36	23,51±1,42	22,73±1,39	20,82±2,01	20,69±0,99
Коэффициент палисадности / Palisade/spongy mesophyll tissue ratio	55,43±3,05	47,97±2,86	45,90±2,74	48,91±5,84	42,57±4,87	41,92±4,40

*Сокращения: Ang – *E. angustifolia*, Pall – *E. pallida*, Par – *E. paradoxa*, Purp¹ – *E. purpurea* (5807), Purp² – *E. purpurea* (15309), Tenn – *E. tennesseensis*.

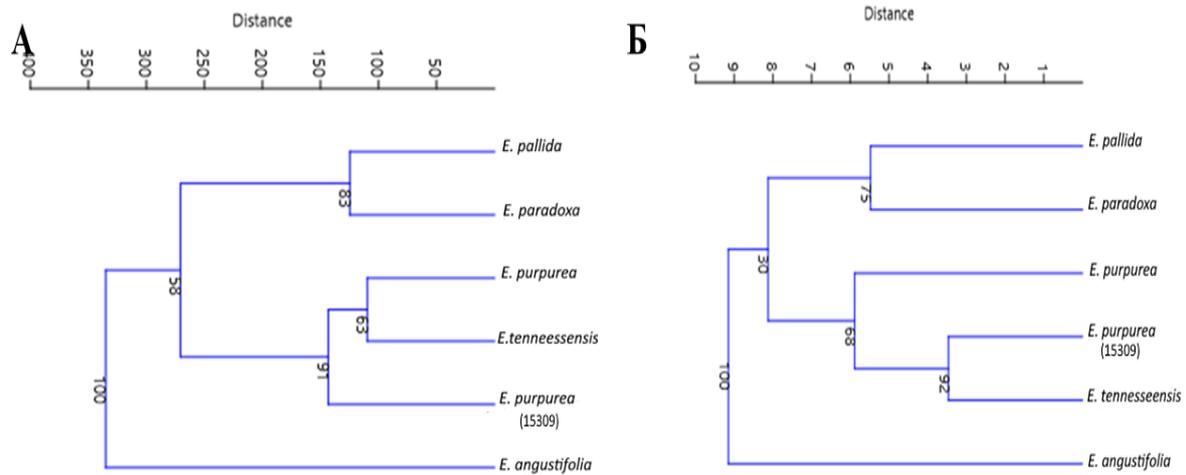


Рис. 3 Дендрогаммы, построенные на основе данных анатомического анализа
 Fig. 3 Dendrograms constructed on the basis of anatomical analysis data

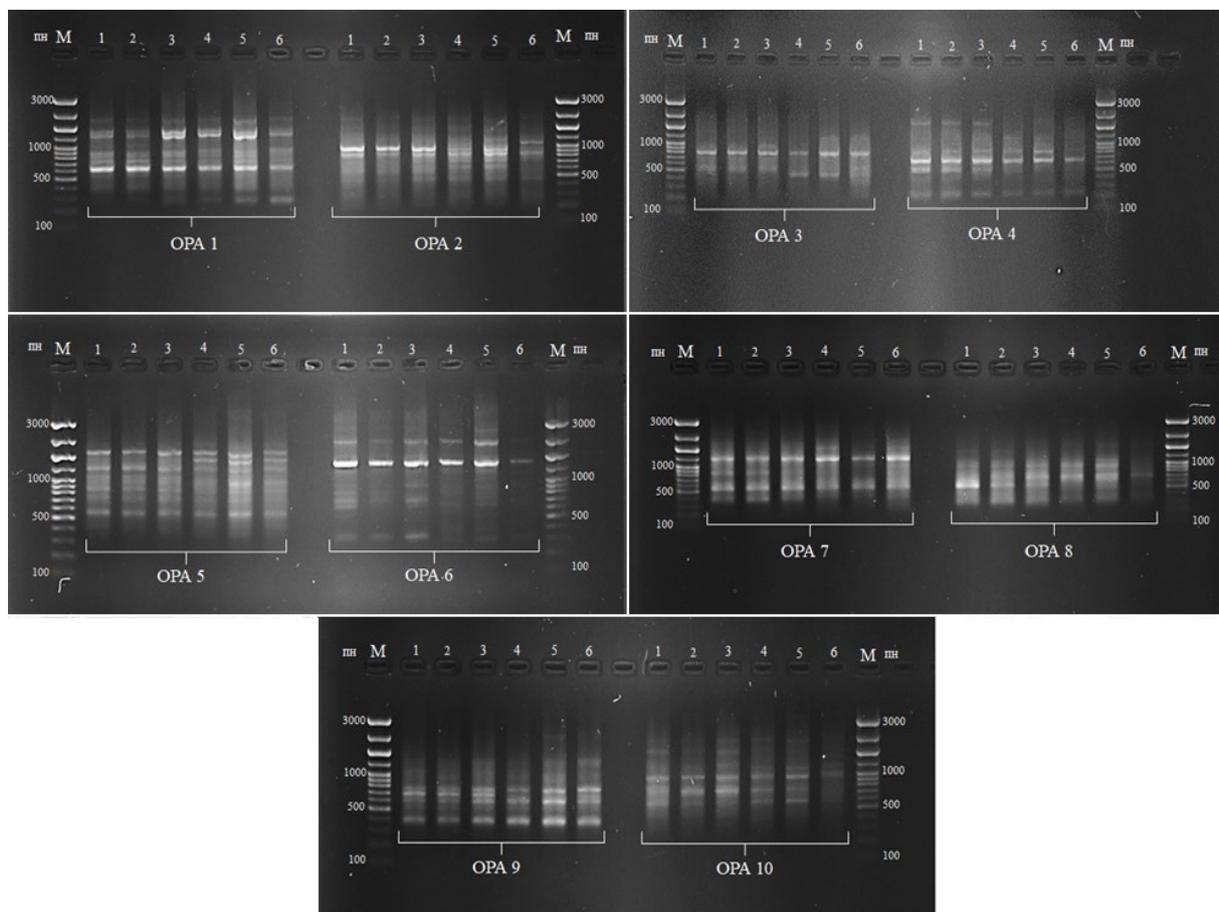


Рис. 4 Электрофореграммы продуктов амплификации с праймерами OPA 1-10 и ДНК, выделенной из листьев: 1 – *E. purpurea*; 2 – *E. purpurea* (15309); 3 – *E. tennesseensis*; 4 – *E. angustifolia*; 5 – *E. pallida*; 6 – *E. paradoxa*; М – маркер; пн – пары нуклеотидов

Fig. 4 Electrophoregrams of amplification products with primers OPA 1-10 and DNAs isolated from leaves; 1 – *E. purpurea*; 2 – *E. purpurea* (15309); 3 – *E. tennesseensis*; 4 – *E. angustifolia*; 5 – *E. pallida*; 6 – *E. paradoxa*; M – marker; пн – base pairs

Характеристика праймеров ОРА

Таблица 2

Characterization of OPA-primers

Table 2

Праймер / Primer	Количество полос / Number of bands	Полиморфные / Polymorphic	Полиморфизм (%) / Polymorphism (%)
ОРА-1	7	3	42,86
ОРА-2	3	1	33,3
ОРА-3	2	1	50
ОРА-4	5	3	60
ОРА-5	8	5	62,5
ОРА-6	7	6	85,7
ОРА-7	4	2	50
ОРА-8	4	3	75
ОРА-9	5	2	40
ОРА-10	6	4	66,67

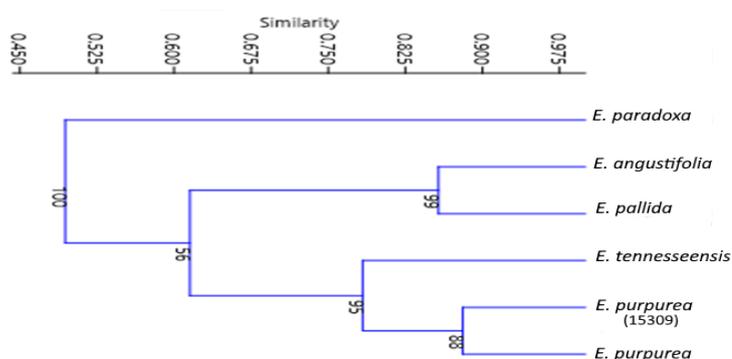


Рис. 5 Дендрограмма генетической близости, построенная на основе результатов RAPD-ПЦР
Fig. 5 Dendrogram of genetic similarity, based on RAPD-PCR results

Коэффициенты генетической близости представителей рода *Echinacea* Moench

Таблица 3

Table 3

Genetic similarity coefficients of the *Echinacea* species

Растение / Plant	<i>E. purpurea</i>	<i>E. purpurea</i> (15309)	<i>E. tennesseensis</i>	<i>E. angustifolia</i>	<i>E. pallida</i>	<i>E. paradoxa</i>
<i>E. purpurea</i>	1	0,88	0,8	0,59	0,58	0,39
<i>E. purpurea</i> (15309)	0,88	1	0,77	0,62	0,61	0,4
<i>E.</i> <i>tennessensis</i>	0,8	0,77	1	0,67	0,62	0,48
<i>E.</i> <i>angustifolia</i>	0,59	0,62	0,67	1	0,86	0,58
<i>E. pallida</i>	0,58	0,61	0,62	0,86	1	0,62
<i>E. paradoxa</i>	0,39	0,4	0,48	0,58	0,62	1

В тоже время другие эхинацеи образовали два других кластера: *E. purpurea* (5807, 15309) с *E. tennesseensis* и *E. angustifolia* с *E. pallida*. Коэффициенты генетической близости между видами показаны в табл. 3.

Известно, что при почвенной засухе растения ксерофитного и мезофитного типа усиливают рост корневой системы в более глубокие, более влажные слои почвы, тем самым замедляя рост надземной части растения, в частности листьев (Генкель, 1988). Листовая пластинка, отражая состояние водного потенциала, утончается (Козюкина, 1980). У растений с признаками ксероморфности также отмечается скручивание листа/его краев, гипостоматичность, наличие опушенности, развитого слоя кутикулы, уменьшение размеров клеток, проводящих элементов, развитие механических тканей и преобладание столбчатой паренхимы над губчатой (Беляева, Бутенкова, 2018).

Род *Echinaceae* распространен и является эндемичным для центральных штатов Америки. Популяции сосредоточены в пределах Арканзаса, Канзаса, Небраски, Оклахомы, Миннесоты, Миссури, Северной и Южной Дакоты, Техаса, включая отдельные коллекции в Колорадо, Джорджии, Иллинойсе, Айове, Кентуки, Луизиане, Массачусетсе, Монтана, Нью-Мексико, Северной и Южной Каролине, Теннесси и Вирджинии. Наибольшее количество представителей произрастает в Арканзасе, Канзасе, Миссури и Оклахоме (Keller, 2014) – на увлажненных, недостаточно увлажненных и аридных территориях (Magugu et al., 2018; Hendrickson, Moffet, 2020). *E. tennesseensis* является узкоэндемичным видом, приуроченным к "Кедровым полянам" (Cedar glades) – горизонтальным отложениям известняка среднего Теннесси вблизи г. Лебанон (Snyder et al., 1994; Bowen, 2011). *E. purpurea* произрастает в разреженных лесах, прериях, на полянах, по берегам рек, водоемов, в зарослях кустарников. *E. pallida* распространена в каменистых прериях, на высокотравных лугах, открытых залесенных склонах, полянах на высоте 500–1500 м над у. м. (Беляева, Бутенкова, 2018). *E. angustifolia* – широко распространенный вид скалистых открытых территорий (Still et al., 2005). *E. paradoxa* произрастает в прериях Канады, Миссури и Техаса. Ее разновидность – *E. paradoxa* (Norton) Britton var. *neglecta* McGregor является эндемиком, встречающимся в районе гор Арбакл на юге центральной части Оклахомы. Также *E. paradoxa* (Norton) Britton var. *paradoxa* – это единственный вид с желтыми лепестками, который является эндемиком гор Озарк в штатах Миссури и Арканзас (McGregor, 1968). Таким образом, представители рода *Echinacea* Moench имеют широкий адаптационный потенциал и приспособлены как к прохладному климату, так и к летней жаре, и засушливым периодам (Kindscher, 2016).

В условиях Южного берега Крыма исследуемые растения проходят все фазы развития, образуют полноценные семена, обладают значительным потенциалом хозяйственных признаков для целей лекарственного и декоративного растениеводства. Установлено, что по комплексу морфолого-биологических и хозяйственно ценных признаков наиболее перспективными являются *E. purpurea* и *E. tennesseensis* (Логвиненко, Шевчук, 2019; Логвиненко и др., 2021). Согласно нашим анатомическим исследованиям, данные виды обладают наибольшим количеством ксероморфных признаков, что подтверждает их потенциал для культивирования в условиях ЮБК. Для сравнительного структурного анализа представителей рода *Echinaceae* в литературе существует ограниченное количество исследований. Так, например, в работе Н.В. Keller (2014) приведены данные морфологического анализа и анатомии соцветий, стебля и черешка 6 видов эхинацеи и 5 ее разновидностей с целью систематической идентификации. Т.Н. Беляева и А.Н. Бутенкова выявили 10 характеристик, имеющих достоверные отличия средних значений при сравнении листьев *E. purpurea* и *E. pallida*: размеры устьиц нижней эпидермы, толщина мезофилла листа, его слоев и пластинки листа, свободной от проводящих пучков, площадь поперечного сечения проводящих пучков и их составляющих. Учитывая полученные данные, *E. purpurea* была отнесена к ксеромезофитам (Анищенко, Шишлова, 2009; Беляева, Бутенкова, 2018), а *E. pallida* – ксерофит, приспособленный к атмосферной и почвенной засухе (Беляева, Бутенкова,

2018), что объясняет нахождение этих двух растений в разных кластерах, согласно данным, полученным в наших исследованиях. Тем не менее, проведенный S. Heidari (2019, 2021) с соавторами морфолого-физиологический анализ двух видов эхинацей показал, что *E. purpurea* была более устойчива к дефициту влаги, чем *E. angustifolia*, что позволяет считать первую подходящим видом для засушливых и полузасушливых регионов. Отсутствие информации о других растениях, возможно, связано с наибольшим использованием в медицинских целях только трех видов *E. purpurea*, *E. angustifolia*, *E. pallida*. Также отмечено большое значение в исследованиях морфологических и анатомических особенностей корней *E. pallida* и *E. angustifolia* в связи с их коммерческим использованием, в то время как у *E. purpurea* применяются листья, стебли и соцветия (Mistriková, Vaverkova, 2007).

В ботанике широко используются маркеры, которые помогают идентифицировать растения. Особое внимание уделяется ДНК-маркерам, которые часто предпочтительнее классических методов идентификации. Для *Echinacea*, как и для многих других представителей семейства *Asteraceae*, характерно высокое внутривидовое разнообразие по морфологическим и биохимическим характеристикам (Куркин и др., 2009). Согласно наиболее широко распространенной таксономической классификации R. McGregor у рода *Echinacea* выделено 9 видов и 2 разновидности. *E. pallida*, *E. angustifolia* и *E. purpurea*, ранее считавшиеся разновидностями, были определены исследователем как отдельные виды на основе морфологических критериев, экспериментов по культивированию и гибридизации, а также цитологического анализа (Mistriková, Vaverkova, 2007). Дендрограммы, сформированные на основе анатомических и генетических исследований в нашей работе подтверждают данную точку зрения. При морфологическом анализе происходит формирование 3 кластеров, в то время как при генетическом – *E. pallida*, *E. angustifolia* находятся в одном кластере, но образуют отдельные ветви. Таксономический статус *E. tennesseensis* обсуждался долгое время, поскольку растение идентифицировали как *E. pallida* var. *angustifolia*. J.M. Baskin, сравнивая генетику, морфологию, анатомию, число хромосом, химию корней и географическое распространение показал, что это отдельный вид (Drew, Clebsch, 1995). В наших исследованиях показано, что коэффициент генетического сходства между *E. pallida* и *E. tennesseensis* составлял 0,62 и является подтверждением достаточной отдаленности видов. Исследование генетических взаимосвязей между коммерчески ценными видами рода *Echinacea* на основе RAPD-анализа выявляло наиболее тесную взаимосвязь между кластерами *E. angustifolia* и *E. pallida* (Karpeyn et al., 2002), что также совпадает с результатами наших исследований. Формирование различных паттернов после амплификации ДНК, выделенной из корней *E. purpurea*, *E. angustifolia* var. *angustifolia* и *E. pallida*, и RAPD-праймеров, также позволяет идентифицировать сырье, что было показано в работе H.T. Wolf (1999) с соавторами. В более поздних исследованиях также продемонстрирована возможность различать сырье с помощью RAPD-ПЦР и праймеров OPA1-6,15 в случае высокого контроля данного анализа (Maltas et al., 2015).

Выводы

Основываясь на полученных анатомических показателях поперечных срезов листьев некоторых видов рода *Echinacea* и их кластеризации установлено, что среди интродуцированных в Никитском ботаническом саду растений, *E. tennesseensis* (делектус, Словакия, 2009 г.), *E. purpurea* (делектус, Польша, 2009 г.), *E. purpurea* (делектус, Польша, 2007 г.) являются наиболее засухоустойчивыми. Данное распределение также подтверждается и генетическим анализом с использованием RAPD-праймеров. Совместное применение анатомических и генетических исследований

позволяет не только сгруппировать растения по определенным признакам, но и в определенной степени объяснить данные взаимосвязи.

Благодарности

Работа выполнена в рамках ГЗ №1023041300067-1-4.1.1 (FNNS 2024-0004) ФГБУН «НБС-ННЦ».

Литература / References

Анищенко Л.В., Шишлова Ж.Н. Интродукция эхинацеи пурпурной [*Echinacea purpurea* (L.) Moench в ботаническом саду ЮФУ // Вестник Воронежского государственного университета. 2009. Вып. 2. С. 89–94.

[Anischenko L.V., Shishlova Z.N. Introduction of purple coneflower [*Echinacea purpurea* (L.) Moench in the Botanical Garden OF SFU. *Proceedings of Voronezh State University*. 2009. 2:89–94.]

Барыкина Р.П., Веселова Т.Д., Девятков А.Г., Джалилова Х.Х., Ильина Г.М., Чубатова Н.В. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы. М.: Изд-во МГУ, 2004. 312 с.

[Barykina R.P., Veselova T.D., Devyatov A.G., Dzhaililova Kh.Kh., Ilyina G.M., Chubatova N.V. Handbook of botanical microtechnology. Fundamentals and methods. M.: MSU Publisher, 2004. 312 p.]

Беляева Т.Н., Бутенкова А.Н. Сравнительный анализ анатомии листовых пластинок *Echinacea purpurea* и *E. pallida* // *Biosystems Diversity*. 2018. Т. 26. №2. С. 77–84. DOI:10.15421/011812

[Belaeva T.N., Butenkova A.N. Comparative analysis of the leaf anatomy of *Echinacea purpurea* and *E. pallida* // *Biosystems Diversity*. 2018. 26 (2):77–84. DOI:10.15421/011812]

Генкель П.А. Физиология жаро- и засухоустойчивости растений. М.: Наука. 1988. 280 с.

[Genkel P.A. Physiology of heat and drought resistance of plants. M.: Science. 1988. 280 p.]

Киселева Г.К. Анатомо-морфологическая оценка адаптивного потенциала сортов плодовых культур и винограда // Современные методологические аспекты организации селекционного процесса в садоводстве и виноградарстве / ред. Г.В. Еремин. Краснодар: СКЗНИИСиВ. 2012. С. 199–205.

[Kiseleva G.K. Anatomico-morphological assessment of adaptive potential of fruit and grape varieties // Modern methodological aspects of organization of selection process in horticulture and viticulture / E.V. Eremin (Ed.). Krasnodar: NCFSCHVW, 2012. P. 199–205.]

Князева С.Г., Хантемирова Е.В. Сравнительный анализ генетической и морфолого-анатомической изменчивости можжевельника обыкновенного (*Juniperus communis* L.) // *Генетика*. 2020. Т. 56. № 1. С. 55–66. DOI: 10.31857/S0016675820010075

[Knyazeva S.G., Hantemirova E.V. Comparative analysis of genetic and morpho-anatomical variability of common juniper (*Juniperus communis* L.) // *Genetics*. 2020. 56 (1):55–66. DOI: 10.31857/S0016675820010075]

Козюкина Ж.Т. Устойчивость растений к отрицательным факторам среды: Уч. пособ. по спецкурсу «Устойчивость растений». Днепропетровск: ДГУ, 1980. 104 с.

[Kozyukina Zh.T. Plant resistance to negative environmental factors: Textbook to the special course "Plant sustainability". Dnepropetrovsk: DSU. 1980. 104 p.]

Куркин В.А., Чепурнова А.С., Рыжов В.М., Тарасенко Л.В., Суворова Г.Н., Авдеева Е.В. Анатомическое и морфологическое изучение травы эхинацеи пурпурной с помощью цифровой микроскопии // *Медицинский альманах*. 2009. Вып. №2 (7). С. 204–206.

[Kurkin V.A., Chepurnova A.S., Ryzhov V.M., Tarasenko L.V., Suvorova G.N., Avdeeva E.V. Anatomical and morphological study of the herb *Echinacea purpurea* using digital microscopy // *Medical Almanac*. 2009. 2 (7):204–206.]

Логвиненко Л.А., Шевчук О.М., Коростылев А.А. Морфологические и биологические особенности видов рода *Echinaceae* Moench при интродукции на Южный берег Крыма // *Бюллетень Государственного Никитского Ботанического Сада*. 2021. Вып.140. С. 103–110. DOI:10.36305/0513-1634-2021-140-103-110

[Logvinenko L.A., Shevchuk O.M., Korostylev A.A. Morphological and biological features of species of the genus *Echinaceae* Moench during introduction to the Southern coast of the Crimea. *Bulletin of the State Nikitsky Botanical Gardens*. 2021. 140:103–110. DOI:10.36305/0513-1634-2021-140-103-110]

Логвиненко Л.А., Шевчук О.М. Особенности роста и развития видов рода *Echinaceae* Moench в условиях Южного берега Крыма // *Биология растений и садоводство: теория, инновации*. 2019. Вып. 151. С. 55–65. DOI:10.36305/2019-2-151-55-65

[Logvinenko L.A., Shevchuk O.M. Features of growth and development of species of the genus *Echinacea* Moench under the conditions of the Southern Coast of the Crimea // *Plant Biology and Horticulture: theory, innovation*. 2019. 151:55–65. DOI:10.36305/2019-2-151-55–65]

Супрун И.И., Малярковская В.И., Степанов И.В., Самарина Л.С. IRAP-анализ для оценки генетической стабильности эндемичных и исчезающих видов флоры Западного Кавказа в коллекции *in vitro* // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2019. Т. 23, № 1. С. 8–14.

[Suprun I.I., Malyarovskaya V.I., Stepanov I.V., Samarina L.S. IRAP-analysis for evaluating the genetic stability of endemic and endangered species of the Western Caucasus flora in the collection *in vitro*. *Vavilov Journal of Genetic and Breeding*. 2019. 23 (1):8–14. DOI: 10.18699/VJ19.455]

Birt D.F., Widrlechner M.P., La Lone C.A., Wu L., Bae J., Solco A.K.S., Kraus G.A., Murphy P.A., Wurtele E.S., Leng Q., Hebert S.C., Maury W.J., Price J.P. *Echinacea* in infection // *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2008. Vol. 87 (2). P. 488–492. DOI:10.1093/ajcn/87.2.488S

Bowen B. Natural areas protection at its best protecting the Tennessee purple coneflower (*Echinacea tennesseensis*) // *Natural Areas Journal*. 2011. Vol. 31 (4). P. 326–330. DOI:10.3375/043.031.0402

Drew M.B., Clebsch E.E.C. Studies on the endangered *Echinacea tennesseensis* (Asteraceae): Plant community and demographic analysis // *Castanea*. 1995. Vol. 60 (1). P. 60–69.

Hammer Ø., Harper D. A. T., Ryan P. D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis // *Palaeontologia Electronica*. 2001. Vol. 4 (1). P. 1–9.

Hendrickson J.R., Moffet C. Forage Systems for the temperate subhumid and semiarid areas // *Forages: The Science of Grassland Agriculture, Volume II, Seventh Edition* / K.J. Moore, M. Collins, C.J. Nelson, D.D. Redfearn (Eds.). Hoboken: John Wiley & Sons Ltd. Published. 2020. P. 387–405. DOI: 10.1002/9781119436669.ch2

Heidari S., Fotouhi Ghazvini R., Kafi M., Zavareh M. Effect of drought stress on some morphological and physiological characteristics of *Echinacea* spp. // *Acta Horticulturae*. 2021. Vol. 1315. P. 445–451. DOI 10.17660/ActaHortic.2021.1315.66

Heidari S., Fotouhi Ghazvini R., Zavareh M., Kafi M. Flowering, physiological and biochemical responses of two *Echinacea* species to drought stress // *Agriculturae Conspectus Scientificus*. 2019. Vol. 84 (3). P. 263–270.

Kapteyn J., Goldsbrough P.B., Simon J.E. Genetic relationships and diversity of commercially relevant *Echinacea* species // Theoretical and Applied Genetics. 2002. Vol.105. P. 369–376. DOI: 10.1007/s00122-002-0960-y

Keller H.W. The genus *Echinacea* (Asteraceae): floral, stem, and petiole morphology // Journal of the Botanical Research Institute of Texas. 2014. Vol. 8 (1). P. 87–126.

Kindscher K. The biology and ecology of *Echinacea* species // *Echinacea: Herbal Medicine with a Wild History* 1st ed. / K. Kindscher (Ed.). 2016. Cham: Springer. P. 47–54. DOI:10.1007/978-3-319-18156-1_5

Kumar R.M. Pharmacological importance of *Echinacea purpurea* // International Journal of Pharma and Bio Sciences. 2011. Vol. 2 (4). P. 304–314.

Magugu J.W., Feng S., Huang Q., Zhang Y., West G.H. Analysis of future climate scenarios and their impact on agriculture in eastern Arkansas, United States // Journal of Water and Land Development. 2018. Vol. 37. P. 97–112.

Maltas E., Dageri A., Vural H.C., Yildiz S. Investigation on biochemical and molecular analysis of *Echinacea* genotypes // Plant. 2015. Vol. 3 (1). P. 1–7. DOI: 10.11648/j.plant.20150301.11

McGregor R. The taxonomy of the genus *Echinacea* (Compositae) // University of Cansas Science Bulletin. 1968. Vol. 48 (4). P. 113–142.

Mistriková I., Vaverkova S. Morphology and anatomy of *Echinacea purpurea*, *E. angustifolia*, *E. pallida* and *Parthenium integrifolium* // Biologia, Bratislava. 2007. Vol. 62 (1). P. 2–5.

Snyder K.M., Baskin J.M., Baskin C.C. Comparative ecology of the narrow endemic *Echinacea tennesseensis* and two geographically widespread congeners: relative competitive ability and growth characteristics // International Journal of Plant Sciences. 1994. Vol. 155 (1). P. 57–65.

Still D.W., Kim D. H., Aoyama N. Genetic variation in *Echinacea angustifolia* along a climatic gradient // Annals of Botany. 2005. Vol. 96 (3). P. 467–477.

Wolf H.-T., Zündorf I., Winckler T., Bauer R., Dingermann T. Characterization of *Echinacea* species and detection of possible adulterations by RAPD analysis // Planta Medica. 1999. Vol. 65 (08). P. 773–774. DOI:10.1055/s-2006-960866.

Статья поступила 01.09.2024 г.

Soldatov D.K., Bulavin I.V., Kalmykova D.I., Logvinenko L.A., Shevchuk O.M. Leaf structure of some *Echinacea* species introduced in the Southern Coast of Crimea // Plant Biology and Horticulture: theory, innovation. 2024; № 3 (172). P. 66-78.

Leaf anatomical characterization of five *Echinacea* species: *E. angustifolia* DC. (introduction number 9295), *E. pallida* (Nutt.) Nutt. (14709), *E. paradoxa* (Norton) Britton (6607), *E. purpurea* (L.) Moench (5807, 15309), *E. tennesseensis* (Beadle) Small (6106) are given in the frame of drought resistance in the conditions of the Southern Coast of Crimea. With light microscopy, the dorsoventrality of the leaf apparatus was shown and the quantitative parameters' variability on the cross-sections was established in the studied plants. Based on the data obtained from the leaf blade cross-sections, clustering was carried out and three plant groups were distinguished: 1) *E. angustifolia*, 2) *E. purpurea* and *E. tennesseensis*, 3) *E. pallida* and *E. paradoxa*. An additional assessment in points (from one to six), where the maximum value corresponded to the trait that best-reflects xeromorphism, made it possible to arrange several drought-resistant plants as follows: *E. tennesseensis* > *E. purpurea* (15309) > *E. purpurea* (5807) > *E. pallida* > *E. paradoxa* > *E. angustifolia*. It has been established that the most adapted were *E. tennesseensis* and *E. purpurea* (15309, 5807).

To confirm the anatomical features based on the genetic similarity between plants, RAPD-PCR was carried out with primers OPA1-10, which gave reproducible bands and generated 209 amplicons with a length from 203.9 to 1000 bp or more. A dendrogram was constructed on the amplification data. According to the results obtained, the following clustering was observed: 1) *E. paradoxa*, 2) *E. purpurea* (5807, 15309) with *E. tennesseensis*, and 3) *E. angustifolia* with *E. pallida*. The formation of cluster 2 confirmed the genetic similarity of *E. purpurea* (5807, 15309) and *E. tennesseensis* and anatomical analysis data.

Key words: coneflower; leaf; light microscopy; drought resistance; genetic similarity; RAPD-PCR