

## 2 Биотехнология

### 2.6 Биотехнология древесных растений

характеристик. Максимальная комплексная продуктивность была выявлена для *Syringa oblata* Lindl. – 2,090 кг сирингина/т сырья. Эти виды вводились в культуру *in vitro*. В качестве первичных эксплантов для введения в культуру использовали молодые побеги с пазушными почками, полученные выгонкой в лабораторных условиях (срезка веток с материнских растений коллекции проводилась в период с января по март). В качестве стерилизующих агентов использовались: хозяйственное мыло, 0,4 %-й раствор фунгицида «Ридомил – Голд» (экспозиция - 7 мин.), 0,06%-й раствор «Хлороцида» (Бел Асептика) (экспозиция 30 мин.). Для введения в культуру *in vitro* использовали модифицированную питательную среду Murashige & Skoog с полуторным содержанием макросолей, добавлением 1 мг/л 2-ip; источник углерода – сахароза (20 г/л), уплотнитель –агар (Sigma) (7 мг/л) Экспланты культивировали при стандартных условиях выращивания *in vitro*: температура 24±1°C, 16/8-часовой фотопериод, интенсивность освещения 3-4 клк. В процессе работы выявлено, что на этапе введения в культуру наблюдается выраженная видоспецифичность различных видов сирени. Наилучшие показатели морфогенетического потенциала проявили виды *S. villosa* Vahl. (сирень волосистая) и *S. vulgaris* L. (сирень обыкновенная), самый низкий – *S. Reticulata* subsp. *pekinensis* (Rupr.) P.S.Green&M.C.Chang (сирень пекинская). Проводится подбор сред для культивирования и депонирования редких и эндемичных видов растений рода *Syringa*, в том числе лекарственных. Семена и меристемы некоторых редких видов растений передаются в криобанк Института физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН на долгосрочное хранение. Исходя из актуальных задач сохранения коллекции, была разработана эффективная маркерная RAPD+ISSR система для рода *Syringa* на внутриродовом уровне и применена для дифференциации и сертификации видов и сортов сирени в коллекции ЦБС, а также подтверждения или выяснения родословной сортов и филогенетических связей между ними. септические и ДНК-коллекции для долгосрочного хранения сформированы преимущественно из редких, эндемичных и уникальных по биосинтетическим характеристикам видов растений рода Сирень с проведением предварительной молекулярно-генетической паспортизации. Собранные в коллекциях образцы в дальнейшем могут быть использованы для сохранения генофонда в генетических банках при обеспечении их эффективного средне- и долгосрочного хранения (в том числе в криобанке), а также для озеленения микроклональными растениями, плантационного выращивания, получения возобновляемого лекарственного сырья. Данные о растениях регистрируются в информационно-поисковой системе Hortus Botanicus Centralis – Info.

#### Генерация активных форм кислорода в корнях микроклонов

*Forsythia×intermedia* при их выведении *ex vitro*: регистрация, анализ влияния антиоксидантов и роль в укоренении

Уснич С.Л., Мацкевич В.С., Пржевальская Д.А., Черныш М.А., Горский И.А., Шашко А.Ю., Колбанов Д.В., Демидчик В.В.\*

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

\*Email: dzemidchik@bsu.by

Микроклональное размножение *in vitro* является одним из основных биотехнологических приемов, используемых при массовом воспроизведении декоративных древесных растений. Высокая смертность молодых клонов на этапе выведения в условия *ex vitro* является глобальной проблемой данной методики. При



## 2 Биотехнология

### 2.6 Биотехнология древесных растений

перенося растений из условий *in vitro*, в которых корневая система сформирована в компактном объеме в гелевой среде, а устьичная система недоразвита из-за высокой влажности внутри герметичных культивационных сосудов, в условия *ex vitro* (почвенный субстрат, открытый атмосферный газообмен и т.д.) наблюдается потеря жизнеспособности и гибель части растений. Потери растений на этой стадии могут составлять до 90-95%. Решение данной проблемы возможно только при глубоком понимании механизмов, лежащих в основе механического повреждения и развитии технологий, повышающих стрессоустойчивость растений на стадии выведения *ex vitro*. Ослабленные растения также поражаются патогенами, что дополнительно снижает выход жизнеспособных саженцев. Все виды стрессовых воздействий, наблюдающихся при выведении растений в условия *ex vitro*, вызывают окислительной стресс в результате активации НАДФН-оксидаз, пероксидаз класса III, повреждения работы электрон-транспортных цепей в органеллах и некоторых других механизмов. Оксилительный стресс, проявляющийся в дисбалансе между произведенными и детоксицированными активными формами кислорода (АФК), является основным повреждающим фактором при механическом повреждении и резком изменении осмоляльности. Механизмы генерации АФК при переносе растений в условиях *ex vitro* у древесных растений на сегодняшний день практически не изучены. Целью настоящего исследования являлось установление закономерностей развития окислительного стресса при механическом повреждении в ходе переноса в нестерильные условия клонов модельных декоративных растений форзиции (*Forsythia ×intermedia*), полученных методом вегетативного клонирования в условиях *in vitro*. Измерение динамики генерации АФК у микроклонов форзиции, подверженных воздействию механического и осмотического стрессов, производилось при помощи стандартной эпифлуоресцентной микроскопии, среды анализа изображений ImageJ в комбинации с флуоресцентным зондом для  $O_2^-$  -дигидроэтидиум (ДГЭ, Sigma, США). Для выявления качественного состава формирующихся АФК использовались супероксиддисмутаза (600 ед.), каталаза (1000 ед.), тиомочевина (1 мМ), диметилсульфоксид (0,3%); для анализа вовлечения системы стрессовой  $Ca^{2+}$ -сигнализации применялись блокаторы  $Ca^{2+}$ -проницаемых катионных каналов  $Gd^{3+}$  (0,3 мМ  $GdCl_3$ ) и  $La^{3+}$  (0,3 мМ  $LaCl_3$ ). Флуоресцентный сигнал ДГЭ, отражающий генерацию АФК, в клетках корня форзиции значительно увеличивался при механическом и осмотическом стрессе, достигая максимума через 60 мин. Обработки блокаторами катионных каналов ( $Gd^{3+}$  и  $La^{3+}$ ) снижали интенсивность флуоресценции ДГЭ на 15%, ферментативными антиоксидантами до 30%. Максимальное ингибирующее действие имела обработка тиомочевиной (40%), которая не чувствительна к  $O_2^-$ , но активно устраняет гидроксильные радикалы ( $HO^{\cdot}$ ) и некоторые другие наиболее реакционно-способные АФК. Эффект осмотического стресса был исследован при использовании изоосмотических условий. Было показано, что генерация АФК при этом не отличается от вызванной совместным механическим и осмотическим воздействием. Это указывает на то, что основной причиной генерации АФК и последующего окислительного стресса является механическое повреждение при извлечении растений из гелевой среды и переносе в новые условия. Отдельно были проведены опыты по анализу укореняемости растений при обработке тиомочевиной перед высадкой в почвенный субстрат (результаты регистрировались через 30 сут после высадки). Было показано, что обработка тиомочевиной увеличивает выживаемость, стимулирует набор



## 2 Биотехнология

### 2.6 Биотехнология древесных растений

---

биомассы и рост корневой системы адаптирующихся к условиям *ex vitro* растений. Соответственно, защита от окислительного повреждения, вероятно, является эффективным орудием для улучшения укоренения микроклонов древесных растений при их выведении в условия *ex vitro*. Таким образом, полученные в работе результаты позволяют сделать следующие выводы: 1) механический стресс вызывает генерацию АФК, среди которых доминируют формы, устранимые тиомочевиной, такие как гидроксильные радикалы; 2) осмотический стресс при выведении в условия *ex vitro* не играет существенной роли для индукции генерации АФК; 3) обработка молодых растений тиомочевиной значительно увеличивает жизнеспособность молодых древесных растений при переводе их из условий *in vitro* в почвенные субстраты и открытый атмосферный газообмен.

