

ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНЕРАЦИИ АФК ПРИ ВЫВЕДЕНИИ МИКРОКЛОНОВ ДРЕВЕСНЫХ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯ *EX VITRO*

**Уснич С.Л., Накова С.К., Колбанов Д.В., Мацкевич В.С., Пржевальская Д.А.,
Черныш М.А., Лазерко Н.В., Демидчик В.В.**

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

Микроклональное размножения в условиях *in vitro* является одной из важнейших методик современной биотехнологии растений. Для промышленного производства многих видов декоративных древесных растений данная методика является доминирующей. Стадией, лимитирующей эффективность микроклонального размножения растений, является перевод микроклонов из условий *in vitro* в условия *ex vitro*, приводящий к гибели большей части растений. Не ясны физиологические основы данной гибели и не выработаны меры, устраняющие данное явление. Согласно выдвигаемой нами и некоторыми другими научными группами гипотезе причиной гибели растений при выводе в условия *ex vitro* является раневой и осмотический стресс, приводящие к генерации АФК и развитию окислительного стресса. Последний является индуцирующим фактором для некроза и запрограммированной клеточной гибели. Целью настоящей работы было исследование механизмов генерации АФК при переносе растений в условиях *ex vitro* у древесных растений и анализ воздействия на этот процесс низкомолекулярных антиоксидантов.

Объектами исследования являлись корни 10-дневных проростков *Arabidopsis thaliana*, а также трехмесячных микроклонов *Forsythia intermedia* и *Betula pendula* var. *Carelica*, выращенных в условиях *in vitro*. Уровень генерации АФК анализировался с помощью флуоресцентного зонда дигидроэтидиум, избирательно взаимодействующего с супероксидом (фильтр FITC). Использовался флуоресцентный микроскоп Nikon Eclipse TS100F.

Использование дигидроэтидиума совместно с фильтром FITC позволило высокоточно измерить сигнал 2-гидроксиэтидина (продукта прямого взаимодействия с супероксид-радикалом) в корнях, что важно для избегания артефактов, связанных с формированием комплексов этидиума и ДНК (не детектируемого FITC). Максимальный уровень супероксид-зависимой флуоресценции 2-гидроксиэтидина отмечался через 60 мин после переноса растений в условия *ex vitro*, после чего интенсивность флуоресценции снижалась. Экспозиция в течение 60 мин была в дальнейшем выбрана в качестве рабочей. Было исследовано влияние ферментативных (СОД, КАТ) и низкомолекулярных (тиомочевина, ДМСО) антиоксидантов, а также блокаторов Ca^{2+} -проницаемых катионных каналов (гадолиний) и кремниевых минералов (диатомит) на генерацию АФК в клетках корня арабидопсиса, форзиции и березы. Максимальный ингибирующий эффект на генерацию супероксида был обнаружен при обработке раствором тиомочевины (1 мМ), которая согласно литературным данным является гасителем гидроксильного радикала (HO^{\bullet}). Значительное воздействие на синтез супероксида также оказывала обработка диатомитом (10%) - кремний-содержащей горной породой, используемой в декоративном питомниководстве. На основе полученных данных были разработаны и протестированы приемы прайминга тиомочевинной и диатомитом при производстве посадочного материала декоративных древесных растений, показавшие высокую эффективность как в отношении жизнеспособности микроклонов, так и стимуляции корнеобразования.