

влияния условий засухи на изменение уровня экспрессии стресс-ассоциированных белков у *Malus domestica* сорта Golden Delicious, приостановив полив растений до 8 дней, отбор листьев осуществляли на 0, 4-й и 8-й день. По результатам эксперимента было отмечено три активно экспрессируемых гена в условиях приостановки полива в течение 8 дней со значениями в диапазоне от 2,2 до 5,5. В проведенном нами эксперименте в качестве объекта исследования были выбраны подвой яблони сорта ММ-106, условия потери влаги моделировали путем размещения корневой системы растения на фильтровальной бумаге в течение 24 часов. По результатам проведенного нами эксперимента можно выделить 5 активно экспрессируемых генов в течение 24 часов в условиях потери влаги подвоем ММ-106, значения уровня экспрессии которых находятся в диапазоне от 3,74 до 12,04.

Таким образом, по приведенным результатам можно сделать вывод о наличии большего количества генов, кодирующих SAP, со значительным уровнем экспрессии в эксперименте, проводимом на подвое яблони ММ-106 в условиях потери влаги на протяжении 24 часов.

Заключение

По результатам исследования можно сделать вывод об участии ряда стресс-ассоциированных белков в реакции ответа яблони на воздействие засухи, поскольку было установлено изменение уровня экспрессии всех исследуемых генов, кроме *MdSAP18*. Данный ген в заданных условиях не был экспрессирован. Кроме того, среди 14 исследуемых генов можно отметить 5 – *MdSAP4*, *MdSAP6*, *MdSAP12*, *MdSAP19*, *MdSAP21* – уровень экспрессии которых резко возрастает к 4-му часу воздействия и достигает максимума. Максимальное значение экспрессии составило 12,04 для гена *MdSAP6*. Так же для большинства исследуемых генов характерно наличие общей тенденции: резкое или постепенное увеличение уровня экспрессии в первые часы воздействия с последующим его снижением. Такое увеличение уровня экспрессии к 4-му часу согласуется с предположением о высокой скорости накопления транскрипта на ранней стадии реализации ответа на воздействие стрессового фактора с последующим его снижением к 24-му часу. При оценке влияния степени идентичности исследуемых нуклеотидных последовательностей на сходство их профилей экспрессии было установлено отсутствие прямой зависимости между характером экспрессии генов, кодирующих стресс-ассоциированные белки, и степенью идентичности их нуклеотидных последовательностей в условиях действия засухи на подвой яблони ММ-106.

ЛИТЕРАТУРА

1. Jaakola L [et al.]. Isolation of high quality RNA from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruit // Molecular biotechnology. – 2001. – Vol. 19, № 2. – P. 201–203.
2. Кузмицкая П., Урбанович О., Кильчевский А. Идентификация генов, кодирующих стресс-ассоциированные белки, содержащие домены A20/AN1, в геноме яблони *in silico* и анализ их филогенетических связей // Доклады Национальной академии наук Беларуси. – 2018. – Vol. 62. – P. 455–462.
3. Bustin SA [et al.]. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. – 2009.
4. Rao X [et al.]. An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis // Biostatistics, bioinformatics and biomathematics. – 2013. – Vol. 3, № 3. – P. 71.
5. Dong Q [et al.]. Genome-wide analysis and cloning of the apple stress-associated protein gene family reveals MdSAP15, which confers tolerance to drought and osmotic stresses in transgenic *Arabidopsis* // International journal of molecular sciences. – 2018. – Vol. 19, № 9. – P. 2478.

ОСОБЕННОСТИ РИЗОГЕНЕЗА РАСТЕНИЙ-РЕГЕНЕРАНТОВ PRUNUS SERRULATA COPTA SHIROFUGEN В УСЛОВИЯХ IN VITRO И EX VITRO FEATURES OF RHIZOGENESIS OF REGENERANTS PRUNUS SERRULATA v. SHIROFUGEN IN CULTURE IN VITRO AND EX VITRO

Т. А. Красинская^{1,2}, Н. О. Лукьяненко¹
T. A. Krasinskaya^{1,2}, N. O. Lukyanenko¹

¹Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ,
г. Минск, Республика Беларусь

²РУП «Институт плодоводства», г. Минск, Республика Беларусь
krasinskaya@tut.by
lukyanenko_1967@mail.ru

¹Belarusian State University, ISEI BSU
Minsk, Republic of Belarus

²RUE “Institute for Fruit Growing”

Целью работы было определение активности ризогенеза растений-регенерантов *Prunus serrulata* сорта Shirofugen в условиях *ex vitro* и в условиях *in vitro* при добавлении в питательную среду сорбентов (активированного угля и коммерческого препарата «Полифам»).

Добавление сорбентов в питательную среду MS способствует повышению доли укорененных растений до 100,0% (при использовании активированного угля) и активному росту корней (средняя длина корней – 4,1 см при использовании коммерческого препарата «Полифам», состоящего из гидролизованного лизина, и активированного угля. Образование каллуса не отмечается у растений на питательной среде с активированным углем.

Растения, укорененные в условиях *ex vitro*, быстрее адаптируются к новым условиям, переживая физиологический стресс, на этапе укоренения, а не на этапе адаптации, как это наблюдается у растений, укореняемых в условиях *in vitro*.

The aim of the work was to determine the rhysogenesis activity of regenerants of *Prunus serrulata* v. Shirofugen under *ex vitro* and *in vitro* conditions using sorbents (activated carbon and the commercial substance «Polypham») in the nutrient mediums.

The addition of sorbents to the MS culture medium contributes to an increase in the rate of rooted plants to 100.0% (with activated carbon) and active root growth (the average root length is 4.1 cm when using activated carbon and «Polypham» consisting of hydrolyzed lysine. The callus on the plants is not observed on the nutrient medium with activated carbon.

Plants after *ex vitro* rhysogenesis adaptate more quickly to the new conditions, experiencing physiological stress, at the rooting stage and not at the adaptation stage, as is observed in plants which have *in vitro* rhysogenesis.

Ключевые слова: ризогенез *in vitro*, *Prunus serrulata* “Shirofugen”, ризогенез *ex vitro*.

Key words: *in vitro* rhysogenesis, *Prunus serrulata* “Shirofugen”, *ex vitro* rhysogenesis.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2021-1-271-274>

Успех этапа ризогенеза обуславливается многими факторами: генотипом формы/сорта, минеральным и гормональным составом питательной среды, количеством пассажей, предшествующих этапу укоренения, физическими условиями культивирования (температура, фотопериод) [1–5]. Качество образовавшихся корней оказывает влияние на приживаемость растений-регенерантов к нестерильным условиям произрастания: при 100% укоренении в условиях *in vitro* можно наблюдать 100% гибель растений на этапе адаптации.

Ризогенез *Prunus serrulata* на примере сорта Kwansan, позволил отметить, что максимальная доля укорененных растений-регенерантов (85,0%) наблюдалась на среде ½ минеральном составе Мурасиге-Скуга (MS), дополненной индолилмасляной кислоты (ИМК) в концентрации 1 мг/л и активированным углем 0,3 г/л. Фотопериод культивирования составил 14 часов/12 часов [1]. Предыдущие наши исследования, изучающие активность ризогенеза у межвидовых гибридов косточковых отметили максимальные значения доли укоренения на средах с 0,4 мг/л ИМК [2]. Более высокие концентрации данного ауксина вызывали образование рыхлых, утолщенных корней и каллуса у основания побега. В исследованиях Li Yan Min с коллегами 100% укоренение растений-регенерантов *Prunus serrulata* было получено на питательной среде MS с комплексом ауксинов (0,05 мг/л ИМК и 0,05 мг/л нафтилуксусной кислоты (НУК), дополненную 20 г/л сахарозы [3].

Возможность ризогенеза в условиях *ex vitro* *P. serrulata* на примере формы «Kwansan» показали исследования М. Duta [4]. Самый высокий показатель доли укорененных и адаптированных растений (84,0 %) отмечался на субстрате, состоящим из смеси торфяного субстрата и перлита в соотношении 1:1, и при использовании стимулятора корнеобразования Radistim. Растения-регенеранты культивировали 30 дней.

Применение ризогенеза в условиях *ex vitro* приводит к сокращению длительности клонального микроразмножения в следствии совмещения этапа ризогенеза и этапа адаптации. Это дает положительный экономический эффект – снижение себестоимости посадочного материала. Положительные результаты ризогенеза *ex vitro* отмечены у многих плодовых и ягодных культур (голубика высокорослая, жимолость, клоновые подвои косточковых культур) [5].

Таким образом, целью работы было определение активности ризогенеза растений-регенерантов *Prunus serrulata* сорта Shirofugen в условиях *ex vitro* и в условиях *in vitro* при добавлении в питательную среду сорбентов (активированного угля и коммерческого препарата «Полифам»).

Объекты исследований – *Prunus serrulata* сорт Shirofugen.

Сорт Shirofugen – декоративная красивоцветущая форма вишни, идеально подходит для городских территорий, так как устойчиво к загрязнению, растет на хорошо дренируемых почв. Невысокая скорость роста (до 6 × 6 метров на протяжении 20 лет) делает ее привлекательной и для частных усадеб. Молодая листва данной формы имеет ярко-бронзовую окраску, которая осенью меняется к желтому и желтовато-бронзовому. Цветки имеют бело-розовую декоративную окраску. Однако данная форма обладает низкой морозостойкостью - до -20° С, что ограничивает использование в декоративном садоводстве.

Кроме того, данная форма является древесным индикатором для определения сокопереносимых вирусов косточковых культур: некротической кольцевой пятнистости косточковых культур (PNRSV), иволистности, скручивания листьев сливы, отмирание сливы и отмирание абрикоса.

Ризогенез в условиях *in vitro*. Культивирование в стерильных условиях проводили на модифицированной питательной среде Мурасиге Скуга с добавлением 0,7 мг/л ИМК. Сорбенты добавляли непосредственно в пробирку для культивирования. Объем питательной среды в пробирке – 10 мл, в который добавляли активированный уголь 125 мг (12,5 г/л) и препарат «Полифам», представляющий собой лигнин гидролизный – 460 мг (46 г/л). В качестве контроля использовали питательную среду с ИМК, без сорбентов. Длительность этапа ризогенеза в условиях *in vitro* – 6 недель.

Ризогенез в условиях *ex vitro*. Для ризогенеза в условиях *ex vitro* использовали субстрат, состоящий из нижнего слоя мха *sp. Sphagnum* и верхнего слоя – торфяного субстрата «Двина». Высота растений-регенерантов, которые использовали для изучения ризогенеза *ex vitro*, варьировала от 2 до 3 см. Длительность этапа ризогенеза в условиях *ex vitro* – 8 недель.

Фотопериод 18/6 часов.

Статистическую обработку данных проводили в программе Statistica 10.0, используя ANOVA (однофакторный анализ).

Статистический анализ данных позволил достоверно отметить влияние наличия сорбентов в питательной среде и способа укоренения на активность образования корней у растений-регенерантов сорта Shirofugen и на активность ростовых процессов надземной части растений. Добавление сорбентов в питательную среду вероятно стимулировало закладку корневых зачатков и рост стебля, в следствии чего доля укорененных растений увеличивалась до 70,0 и 100 % при использовании в качестве сорбента «Полифан» и активированного угля соответственно и средняя длина стебля достигала 2,4 см (таблица 1).

Таблица 1 – Доля растений-регенерантов, укорененных в условиях *in vitro* и *ex vitro*, и рост их надземной части

Состав питательных сред	Доля укорененных растений-регенерантов, %	Средняя длина стебля, см
0,7 мг/л ИМК (контроль)	53,6± 0,00 d*	1,8 ± 0,14 c
0,7 мг/л ИМК /«Полифан»	70,0 ± 0,00 c	2,4 ± 0,04 b
0,7 мг/л ИМК/активированный уголь	100,0± 0,00 a	2,4± 0,20 b
<i>ex vitro</i> ризогенез	90,0±1,27 b	4,3 ± 0,00 a

Отмечена возможность ризогенеза в условиях *ex vitro* сорта Shirofugen при использовании субстрата, состоящего из слоя мха *sp. Sphagnum* и торфяного субстрата. По сравнению с контролем при укоренении в нестерильных условиях доля укорененных растений была выше в 1,7 раз и составила 90,0 %, длина стебля – выше в 2,4 раза (4,3 см). Растения, укорененные в условиях *ex vitro*, характеризовались активным ростом по сравнению с растениями, укорененными в условиях *in vitro* (таблица 1).

Хочется отметить, что у растений при ризогенезе в условиях *ex vitro* одновременно проходят адаптационные процессы к абиотическим и биотическим факторам в традиционных условиях произрастания и процесс корнеобразования. Это ускоряет процесс получения растительного материала в процессе клонального микроразмножения и одновременно удешевляет культуральные работы.

При анализе развития корневой системы растений-регенерантов на различных средах отмечается позитивное влияние сорбентов («Полифан» и активированного угля) на ростовые процессы корней: средняя длина корней была в 3,4 раза выше, чем на контрольной среде (без применения сорбентов), и составила 4,1 см (таблица 2).

Таблица 2 – Морфологическое развитие корневой системы на этапе ризогенеза в условиях *in vitro* в зависимости от вида используемого сорбента в питательной среде

Состав питательных сред	Среднее количество корней, шт.	Средняя длина корней, см	Доля каллусообразования, %	Доля растений с боковыми корнями, %
0,7 мг/л ИМК (контроль)	4,3± 0,24 a	1,21± 0,04 c	6,7± 6,67 ab	86,7± 6,67 b
0,7 мг/л ИМК /«Полифан»	4,0±0,20 ab	4,1±0,00 b	14,3 ± 0,00 a	80,9± 9,53 b
0,7 мг/л ИМК/ активированный уголь	3,3 ± 0,18 b	4,1± 0,15 b	0,0 b	88,0± 0,47 b
<i>ex vitro</i> ризогенез	не определяли	4,8±0,13 a	0,0 b	100 a

Активность закладки корневых зачатков достоверно определялась видом сорбента в питательной среде: на среде с активированным углем среднее количество корней составило 3,3 шт. на одно растение, в то время как на средах без сорбентов и с активированным углем данный показатель составил 4,3 и 4,0 шт. соответственно (таблица 2).

Качество корней первостепенно определяет в дальнейшем способность растений адаптироваться к самостоятельному получению питательных веществ из почвенного раствора. Поэтому наличие придаточных и боковых корней является преимуществом для адаптации к условиям *ex vitro*. На всех изучаемых питательных средах доля растений с боковыми корнями достоверно не отличалась друг от друга и варьировалась с 80,9 до 88,0 %. У всех растений-регенерантов, у которых ризогенез проводили в условиях *ex vitro*, отмечалась хорошо развитая корневая система (таблица 2).

Корни, образованные в культуре *in vitro*, анатомически отличаются от корней *ex vitro*. Они содержат меньшее количество крахмальных зерен, низкое содержание лигнина и относительно низкое содержание васкулярных тканей. Поверхность корней, образовавшихся в культуре *in vitro*, и их апексы густо покрыты волосками. На этой стадии вероятно образование многочисленных каллусных клеток между волосками. В процессе адаптации *in vitro* корни теряют свои волоски, останавливается их рост. Такие корни способны поглощать питательные вещества из почвы, быстро расти, и из них развиваются новые корни. Эти новые корни имеют широкую зону всасывания, огромное количество волосков, а каллусные клетки между волосками отсутствуют.

Следует отметить, что эти корни не могут обеспечить растение всей необходимой водой, но в период акклиматизации водная потребность покрывается за счет создаваемой в первые дни адаптации влажности. Таким образом, наличие каллуса у основания, витрифицированных, утолщенных корней осложняет процесс адаптации растений-регенерантов к нестерильным условиям. На питательной среде, содержащей активированный уголь, образование каллуса не отмечалось. На питательной среде с коммерческим препаратом «Полифам» доля растений с каллусом составила 14,3%, что является достаточно невысоким показателем.

Таким образом, добавление сорбентов в питательную среду MS способствует повышению доли укорененных растений до 100,0 % (при использовании активированного угля) и активному росту корней (средняя длина корней – 4,1 см при использовании коммерческого препарата «Полифам», состоящего из гидролизованного лизина, и активированного угля. Образование каллуса не отмечается у растений на питательной среде с активированным углем.

Растения, укорененные в условиях *ex vitro*, быстрее адаптируются к новым условиям, переживая физиологический стресс, на этапе укоренения, а не на этапе адаптации, как это наблюдается у растений, укореняемых в условиях *in vitro*. Применение двухслойного субстрата, состоящего из нижнего слоя мха *sp.* *Sphagnum* и верхнего слоя – торфяного субстрата «Двина» позволило получить 90,0% укорененных растений-регенерантов формы *Shirofugen*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дуца М. *Prunus serrulata* var. 'Kanzan' microshoots behavior during *in vitro* rooting and acclimatization phases / М. Дуца // Current Trends in Natural Sciences. 2012;1:1:85–89.

2. Красинская, Т. А. Ризогенез подвоев рода *Cerasus* Mill. в условиях *in vitro* / Т.А. Красинская // Веснік Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук. – 2006;5:98–101.

3. Li Yan Min. Study on explants and tissue culture of *Prunus serrulata* Royal burgundy / Li Yan Min [et. al.] // Journal of Henan Agricultural Sciences. 2012;127–130.

4. Дуца М. *In vitro* perfected propagation biotechnology of *Prunus serrulata* species / Дуца М, Опря МІ, Конциоіу МЕ. Режим доступа: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.717.5589&rep=rep1&type=pdf>. – Дата доступа: 1.04.2021.

5. Красинская, Т. А. Ризогенез *ex vitro* растений рода *Cerasus* Mill. // Актуальні проблеми ботаніки, екології та біотехнології: матеріали міжнародної конференції молодих учених-ботаніків, Київ, 2006 / Національна академія наук України, Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, Національний аграрний університет. – Київ, 2006;148–149.

ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКВИВАЛЕНТНОЙ СМЕСИ ПРОТИОКОНАЗОЛА И ТЕБУКОНАЗОЛА НА ЖИВОТНЫХ

TOXICOLOGICAL EVALUATION OF AN EQUIVALENT MIXTURE OF PROTIOCONAZOLE AND TEBUCONAZOLE IN ANIMALS

И. Ф. Кутляхметов¹, М. А. Атрошко², Т. Н. Гомолко¹

I. Kutliahmetov¹, M. Atroshko², T. Gomolko¹

¹Научно-практический центр гигиены, г. Минск, Республика Беларусь

²Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ, Минск, Республика Беларусь

Ilia-run@mail.ru, atroshkomikhail@gmail.com

¹Scientific-practical center of hygiene, Minsk, Republic of Belarus

²Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus

В данной публикации приведены современные подходы к оценке токсикологических характеристик комбинированных препаратов сельскохозяйственного назначения.

This publication presents modern approaches to the assessment of toxicological characteristics of combined agricultural preparations.