

Национальная академия наук Беларуси
Центральный ботанический сад
Белорусский республиканский фонд фундаментальных исследований

Российская академия наук
Институт физиологии растений имени К. А. Тимирязева
Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова



Russian Academy of Sciences



ИФРРАН



Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология

*Тезисы докладов XI Международной конференции,
которая знаменует полувековую историю по исследованию
культивируемых *in vitro* клеток высших растений
и 60-летие деятельности отдела биохимии и биотехнологии растений
государственного научного учреждения
«Центральный ботанический сад НАН Беларуси»*

(г. Минск, 23–27 сентября 2018 г.)

Минск
«Медисонт»
2018

УДК 58(4/5)(082)
ББК 28.5
Б63

XIth International conference
«The biology of plant cells *in vitro* and biotechnology»
(September 23–27, 2018, Minsk, Republic of Belarus)

Редакционная коллегия:

В. Н. Решетников, д-р биол. наук, академик НАН Беларуси;
В. В. Титок, д-р биол. наук, чл.-корр. НАН Беларуси;
А. М. Носов, д-р биол. наук, профессор;
А. В. Носов, д-р биол. наук

Рецензенты:

В. М. Юрин, д-р биол. наук, профессор;
Е. В. Спиридович, канд. биол. наук, доцент.

Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология = The biology of plant cells *in vitro* and biotechnology : тезисы докладов XI Международной конференции, которая знаменует полувековую историю по исследованию культивируемых *in vitro* клеток высших растений и 60-летие деятельности отдела биохимии и биотехнологии растений государственного научного учреждения «Центральный ботанический сад НАН Беларуси» (г. Минск, 23–27 сентября 2018 г.) / Национальная академия наук Беларуси; Центральный ботанический сад; Белорусский республиканский фонд фундаментальных исследований; Российская академия наук; Институт физиологии растений имени К. А. Тимирязева; Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова; редкол.: В. Н. Решетников [и др.]. — Минск : Медисонт, 2018. — 334 с.

ISBN 978-985-7199-23-5.

В материалы XI Международной конференции «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология» включены научные сообщения, посвященные молекулярно-биологическим, генетическим, биохимическим и генетическим особенностям культивируемых клеток растений. Рассматриваются вопросы регуляции морфогенеза клеток *in vitro*, формирования и содержания биотехнологических коллекций, микроклональное размножение, а также культура клеток растений в промышленной биотехнологии.

Сборник материалов предназначен для широкого круга специалистов в области физиологии и биохимии растений, биотехнологии растений, преподавателей и студентов соответствующего профиля.

УДК 58(4/5)(082)
ББК 28.5

ISBN 978-985-7199-23-5

© Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси, 2018
© Оформление. ООО «Медисонт», 2018

Дорогие коллеги и друзья!

Мы рады приветствовать Вас на XI Международной конференции «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология».

Настоящая конференция знаменует собой полувековую историю проведения конференций, посвященных изучению культур клеток высших растений, первая из которых состоялась в Москве в 1968 году. Стоит отметить, что первая аналогичная зарубежная конференция состоялась в Страсбурге лишь два года спустя — в 1970 году.

Вдохновителем и бессменным организатором большинства наших конференций была член-корреспондент АН СССР, академик ВАСХНИЛ Раиса Георгиевна Бутенко — выдающийся ученый и человек удивительной судьбы.

Р. Г. Бутенко была первым автором работ по культуре клеток высших растений — к настоящему времени важнейшей области клеточной биологии, физиологии растений и биотехнологии — не только в России, но и в мире. С самого начала своих исследований Раиса Георгиевна активно привлекала к сотрудничеству специалистов различных областей биологии и молодежь. Важнейшим инструментом развития исследований в области биологии клеток растений *in vitro* стали организуемые Р. Г. Бутенко конференции, проводимые на регулярной основе, — сначала всесоюзные, затем международные. С целью расширения работ по изучению культур клеток и привлечения к ним новых исследователей было решено каждую следующую конференцию организовывать в новом городе — и география наших конференций оказалась весьма обширной. Это Киев (1975 г.), Ереван (1979 г.), Кишинев (1983 г.), Новосибирск (1988 г.), Алматы (1993 г.), Москва (1997 г.), Саратов (2003 г.), Звенигород (2008 г.), Казань (2013 г.).

В этом году мы рады приветствовать Вас в столице Республики Беларусь — замечательном городе Минске. Надеемся, что во время конференции Вы сможете не только поделиться результатами своих исследований, обменяться мнениями и пообщаться с коллегами, но и узнать много нового об этом замечательном городе и его культуре.

В заключение хочется отметить, что хорошей традицией стало посвящение наших конференций памяти Раисы Георгиевны Бутенко. Не будем изменять этой традиции в этом году, при проведении XI Международной конференции «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология».

Успешной работы и новых впечатлений!

Оргкомитет

Каллусообразование *Hyoscyamus muticus* L. в культуре *in vitro*

Абделазиз В. М. А.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, ул. Кремлевская, 18, Казань, 420008,
Россия, тел.: +(843)233-78-26, факс: +(843)233-78-14, e-mail: Wallamohamed68@gmail.com

Белена египетская — вид, распространенный в Северо-Восточной Африке, Юго-Западной Азии, Иране, Индии на Аравийском полуострове. Культивируется в Египте, Сомали, России и странах Южной Европы. Белена египетская — многолетнее травянистое растение, содержащее алкалоиды. В образцах сырья из пустынных районов Южного Египта найдено 1–1,4 % суммы алкалоидов; образцы из более влажных мест Северного Египта содержали 0,45–0,5 % алкалоидов. Среди алкалоидов преобладает гиосциамин, что делает траву белены египетской ценным сырьем для получения атропина.

Цель исследования — влияние фитогормонов на каллусообразование корневых эксплантов белены египетской в культуре *in vitro*.

В качестве эксплантов для введения в культуру *in vitro* были взяты сегменты корней из проростков белены. Для индукции каллусогенеза использовали базовую питательную среду Мура-сиге-Скуга (МС), содержащую регуляторы роста: 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д) в концентрациях 1,0, 2,0 и 3,0 мг/л и 2,4-Д в сочетании с нафтилуксусной кислотой (НУК): 0,5 мг/л 2,4-Д с 0,5 и 1,0 мг/л НУК, и 1,0 мг/л 2,4-Д с 0,5 и 1,0 мг/л НУК, и 2,0 мг/л 2,4-Д с 0,5 и 1,0 мг/л НУК. Контролем служила безгормональная питательная среда. Культивирование каллуса проводили при температуре воздуха 26 ± 2 °С, относительной влажности воздуха 70 %, освещенности 3000 Люкс и 16-часовом фотопериоде.

При изучении влияния гормонального состава питательной среды на процесс индукции каллусогенеза из корневых эксплантов установлено, что на среде МС, содержащей 2,4-Д в сочетании с НУК, наблюдали появление каллусной ткани через два месяца, тогда как сегменты корней, перенесенные на безгормональную среду, каллусообразования не имели.

В варианте с 0,5 мг/л 2,4-Д в сочетании с 1,0 мг/л НУК наблюдали максимальное формирование каллусной ткани. Масса сырого и сухого каллуса составила 4,20 мг/эксплант и 0,18 мг/эксплант соответственно.

Самое низкое каллусообразование было на среде МС, содержащей 3,0 мг/л 2,4-Д (в среднем 0,46 и 0,03 мг/эксплант сырого и сухого каллуса соответственно).

На среде МС, содержащей 2,0 мг/л 2,4-Д в сочетании с 0,5 и 1,0 мг/л НУК каллусообразования не наблюдалось.

Таким образом, использование достаточно низких концентраций 2,4-Д отдельно или в сочетании с НУК способствует индукции процессов каллусообразования корневых эксплантов *H. muticus in vitro*.

Induction of callus from *Hyoscyamus muticus* L. culture *in vitro*

Abdelazeez W. M. A.

Kazan (Privolzhsky) Federal University, 18 Kremlevskaya st., 420008, Kazan, Russian Federation,
tel.: +(843)233-78-26, fax: +(843)233-78-14, e-mail: Wallamohamed68@gmail.com

.....

Egyptian henbane — a species widespread in Northeast Africa, South-West Asia, Iran, India on the Arabian Peninsula. Cultivated in Egypt, Somalia, Russia and the countries of Southern Europe. Egyptian henbane is a perennial herb containing alkaloids. In samples of raw materials from the desert regions of Southern Egypt, found 1–1.4% of the amount of alkaloids; samples from the more humid places of Northern Egypt contained 0.45–0.5% of alkaloids. Among the alkaloids hyoscyamine prevails, which makes the herb bleached with Egyptian valuable raw materials for atropine.

Study aims to influence the effect of plant growth regulators on the callus formation of the root explants of *H. muticus* in culture *in vitro*.

Root segments taken from *in vitro* germinating seeds were used as explants for *in vitro* callus induction. For the induction of callusogenesis; basic nutrient medium of Murashige and Skoog (MS) was used, containing growth regulators: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in concentrations of 1.0, 2.0 and 3.0 mg/l and 2, 4-D in combination with naphthylacetic acid (NAA): 0.5 mg/l of 2,4-D with 0.5 and 1.0 mg/l of NAA and 1.0 mg/l of 2,4-D with 0.5 and 1.0 mg/l NAA, and 2.0 mg /l 2,4-D with 0.5 and 1.0 mg/l NAA. MS medium free of plant growth regulators were used as. The cultivation of callus was carried out at an air temperature of $26\pm 2^{\circ}\text{C}$, a relative air humidity of 70%, an illumination of 3000 Lux, and a 16-hour photoperiod.

By studying the effect of the hormonal composition of the nutrient medium on the process of callus induction from the root explants, it was established that MS medium containing 2,4-D in combination with NAA, callus tissue appeared in two months, while MS medium free of plant hormones did not induce any callus.

The maximum formation of callus tissue was observed on MS media supplemented with 0.5 mg/l of 2,4-D in combination with 1.0 mg /l of NAA. With maximum weight of the fresh and dry callus were 4.20 mg/explant and 0.18 mg/explant, respectively.

The lowest callus formation was observed on MS medium containing 3.0 mg /l of 2,4-D (an average of 0.46 and 0.03 mg fresh and dry weight per explant, respectively). On MC medium containing 2.0 mg/l 2,4-D in combination with 0.5 and 1.0 mg /l NAA callus was not observed.

Thus, the use of sufficiently low concentrations of 2,4-D alone or in combination with NAA promotes the induction of callus processes of root explants of *H. muticus* *in vitro*.

Росторегулирующая активность кремнийсодержащих механокомпозитов на растительной основе в условиях *in vitro* у *Fragaria* × *ananassa* Duch.

Амброс Е. В.¹, Коцупий О. В.¹, Красников А. А.¹, Трофимова Е. Г.², Новикова Т. И.¹

¹ Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения РАН, ул. Золотолинская, 101, Новосибирск, 630090, Россия, факс: +7(383)330-19-86, тел.: +7(383)339-98-29, e-mail: ambros_ev@mail.ru

² Институт химии твердого тела и механохимии Сибирского отделения РАН, ул. Кутателадзе, 18, Новосибирск, 630128, Россия, факс: +7(383)332-28-47, тел.: +7(383)332-40-02

Развитие современных технологий размножения растений *in vitro* невозможно без поиска новых биологических соединений, обладающих ростостимулирующей активностью и в то же время безопасных для здоровья человека и окружающей среды. В настоящее время большое внимание уделяется возможностям применения «зеленой химии», ввиду экологической чистоты, преимуществ обработки и низкой себестоимости. Значительный интерес вызывают препараты содержащие кремний и антиоксиданты, полученные из возобновляемого растительного сырья (шелухи риса и т. д.) механо-химическими методами. Преимуществом механо-химической технологии переработки сырья является извлечение ценных соединений с наименьшей нагрузкой на окружающую среду без дополнительных затрат тепловой энергии и реагентов. Суть технологических операций сводится к механо-химической обработке исходного сырья, содержащего необходимые биологически активные соединения, в присутствии щелочного реагента и абразивного материала. Механокомпозиты такого типа имеют повышенную растворимость, сохраняют натуральный состав и поэтому наиболее эффективно усваиваются растениями.

Цель исследования — расширение спектра росторегулирующих веществ путем использования композитных препаратов на основе биогенного диоксида кремния и флавоноидов для размножения растений *in vitro* (на примере *Fragaria* × *ananassa* Duch.). Для оптимизации этапов собственно размножения и укоренения *F. ananassa in vitro* проанализировано действие композитов на основе: 1) шелухи риса и зеленого чая; 2) шелухи риса и шелухи гречихи. Впервые показано стимулирующее влияние механокомпозитов на процессы пазушного побегообразования на этапе собственно размножения *in vitro* при включении в состав базовой среды по прописи Гамборга-Эвелера, содержащей 6-бензиламинопурина (0,75 мг/л) в концентрации 5,0 мг/л. Выявлен стимулирующий эффект механокомпозитов на развитие побегов и корневой системы регенерантов на этапе укоренения *in vitro*. Культивирование регенерантов на средах, дополненных композитами, влияло на содержание основных фотосинтетических пигментов. Использование композитов в концентрациях 2,5 и 5,0 мг/л достоверно увеличивало содержание хлорофиллов *a* и *b*, изменяло их соотношение в сторону увеличения хлорофилла *b*, повышало соотношение суммы хлорофиллов к каротиноидам. Показано, что культивирование на средах с механокомпозитами вызвало изменения анатомической структуры листовых пластинок регенерантов, увеличивая плотность устьиц на единицу площади листа, размеры устьичных щелей, толщину эпидермы и мезофилла, а также изменяя структуру эпикуткулярного покрова. Выявленные различия в строении листовой пластинки являются проявлением увеличения адаптационных способностей регенерантов *in vitro* к условиям *ex vitro*. Полученные результаты могут быть использованы для разработки систем производства оздоровленного посадочного материала с помощью биотехнологических подходов и рекомендованы для коммерческого размножения земляники крупноплодной.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Новосибирской области в рамках научного проекта № 17-44-540339.

In vitro growth regulating activity of silica-based mechanocomposites from vegetable raw materials in *Fragaria × ananassa* Duch.

**Ambros E. V.¹, Kotsupy O. V.¹, Krasnikov A. A.¹, Trofimova E. G.²,
Novikova T. I.¹**

¹ Central Siberian Botanical Garden, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
101 Zolotodolinskaya st., 630090, Novosibirsk, Russian Federation,
fax: +(383)330-19-86, tel.: +(383)339-98-29, e-mail: ambros_ev@mail.ru

² Institute of Solid State Chemistry and Mechanochemistry Siberian Branch of the Russian Academy
of Sciences, 18 Kutateladze st., 630128, Novosibirsk, Russian Federation,
fax: +(383)332-28-47, tel.: (383) 332-40-02

The development of current technologies of *in vitro* plant reproduction is impossible without searching of new biological compounds with growth-stimulating activity and, at the same time, are safe for human health and the environment. At the present time, much attention is attracted to the possibilities of applying “green chemistry”, due to environmentally friendly features, processing advantages and low cost. Preparations containing silica and antioxidants obtained from renewable vegetable raw materials (rice husks, etc.) by mechanochemical methods are of great interest. The advantage of mechanochemical technology of raw materials processing is the extraction of valuable compounds with the least load on the environment, without additional costs of thermal energy and reagents. The essence of technological operations consists in mechanochemical treatment of raw material containing the necessary biologically active compounds in the presence of an alkaline reagent and an abrasive material. Mechanocomposites of this type have increased solubility, retain their natural composition and, therefore, are most effectively absorbed by plants.

The objective of the present study was to expand the spectrum of plant growth regulating substances using biogenic silica- and flavonoids — based mechanocomposites in *in vitro* plant propagation (for example, *Fragaria × ananassa* Duch.). To optimize *in vitro* multiplication and rooting stages the following types of mechanocomposites were applied: 1) mechanocomposite based on biogenic silica- and green-tea catechins; 2) mechanocomposite based on biogenic silica and buckwheat quercetin. For the first time, the stimulating effect of the mechanocomposites has been shown on the processes of axillary shoot formation during *in vitro* multiplication stage. The addition of mechanocomposites with the concentration of 5.0 mg/l to Gamborg-Evelage's medium supplemented with 6-benzylaminopurine (0.75 mg/l) was the best. The stimulating effect of mechanocomposites on the development of shoots and the root system of regenerants at *in vitro* rooting stage was revealed. The application of mechanocomposites (2.5 and 5.0 mg/l) were significantly increased the chlorophyll content, changed chlorophyll *a/b* ratio towards increasing chlorophyll *b* content, increased the ratio of total chlorophyll to carotenoids. It was shown that plantlet cultivation on media supplemented with the mechanocomposites resulted in the change of leaf blade anatomical structures, increasing the stomata density per unit leaf area, the size of stomatal slits, the thickness of the epidermis and mesophyll, and also changing the epicuticular waxes micromorphology of leaves. The differences in the leaf blade structure are a manifestation of increasing of *in vitro* plantlets adaptation capacity to *ex vitro* conditions.

The obtained results may be used for the development of production systems for a healthy planting material using biotechnological approaches and recommended for commercial strawberry micropropagation.

The present study was supported by the Russian Foundation for Basic Research and the Government of Novosibirsk Region as research project No. 17-44-540339.

Создание и изучение рабочей коллекции генотипов сахарного сорго (*Sorghum bicolor* L.) для производства биоэтанола

**Анапияев Б. Б.¹, Исакова К. М.², Тузелбаева Ш. С.¹, Ахметова А. Б.²,
Бейсенбек Е. Б.¹**

¹ Самбаев университет, ул. Самбаева, 22, Алматы, 050013, Казахстан,
тел.: +7(727)257-71-47, e-mail: bak_anapiyayev@mail.ru

² Казахский национальный аграрный университет, пр-т Абая, 8, Алматы, 050010, Казахстан,
тел.: +7(727)264-05-08, e-mail: konirsha_b@mail.ru

Использование современных биотехнологических методов позволяют создавать альтернативные виды топлива из возобновляемых источников сырья, использование которых являются экономически и экологически эффективными. В качестве перспективного энергоносителя широко используется биоэтанол — этиловый спирт (C₂H₅OH). Его получают путем брожения практически любого растительного сырья, содержащего крахмал или сахар.

Согласно отчету Международного энергетического агентства, лидером в области производства биотоплива стали США. На эту страну пришлось 45,4 % от всего произведенного в мире биогорючего. На третьем месте, сразу же за Бразилией — страны Евросоюза с долей в 16,6 %. Согласно оценкам экспертов, к 2030 г. выпуск биотоплива в мире составит 150 млн т при ежегодном приросте производства 7–9 %. При этом предпочтение будет иметь биоэтанол, так как себестоимость его производства снижается быстрее, чем биодизеля. Производство биоэтанола способно в значительной степени стимулировать сельскохозяйственное производство, экономику и улучшить состояние окружающей среды. Установлено, что биоэтанол, добавленный в бензин, способствует его полному сгоранию, что значительно снижает выбросы от передвижных источников эмиссии.

В последние годы особое внимание уделяется получению биоэтанола из растительного сырья, способного расти в неблагоприятных природно-климатических условиях. В этом плане наиболее перспективным для Казахстана является использование сахарного сорго (*Sorghum bicolor* L.). В настоящей работе рассмотрена перспективность использования нового вида сырья, а именно сорго, для производства высококачественного биоэтанола. Сорго — однолетнее растение, относящееся к роду *Sorghum Moench*, обладающее большим видовым и сортовым разнообразием. Род *Sorghum Saccharatum* характеризуется высоким ростом (выше 175–200 см), повышенной кустистостью, сочной и сладкой сердцевинной стебля. Культура отличается высокой засухо- и солеустойчивостью, может произрастать в условиях, малоприспособленных для выращивания других культур.

Нами создана рабочая коллекция сахарного сорго Казахстанской селекции, сорта сорго из России и наиболее перспективные сорта и гибриды из Северной Америки. Растения были выращены в аридных условиях Юго-Востока Казахстана. Были изучены важные параметры, такие как урожайность, масса зерна, всхожесть семян, высота растений, размер соцветия и другие параметры. Для культивирования соматических клеток сахарного сорго *in vitro* были использованы незрелые зародыши различных генотипов. Для культивирования использовали модифицированные нами питательные среды Мурасиге-Скуга и Гамборга В5.

В работе обсуждаются результаты исследования параметров урожайности сахарного сорго в аридных условиях Юго-Востока Казахстана и факторы, влияющие на частоту формирования соматических каллусов сахарного сорго *in vitro*.

Creation and study of a working collection of sugar sorghum genotypes (*Sorghum bicolor* L.) for the bioethanol production

Anapiyayev B. B.¹, Iskakova K. M.², Tyzelbayeva S. S.¹, Ahmetova A. B.², Beisenbek Y. B.¹

¹ Satbayev University, 22 Satpaev st., 050013, Almaty, Republic of Kazakhstan, tel.: +7(727)257-71-47, e-mail: bak_anapiyayev@mail.ru

² Kazakh National Agrarian University, 8 Abai ave., Medeu district, 050010, Almaty, Republic of Kazakhstan, tel.: +7(727)264-05-08, e-mail: konirsha_b@mail.ru

.....

The use of modern biotechnological methods makes it possible to create alternative sorts of fuel from renewable sources of raw materials, use of which is economically and ecologically effective. Bioethanol, ethyl alcohol (C₂H₅OH), is widely used as a promising energy carrier. It can be obtained by fermentation of almost any plant material containing starch or sugar.

According to the report of the International Energy Agency, the United States became the leader in the field of biofuel production. This country possesses for 45.4% of all biofuel produced in the world. At the third place, immediately behind Brazil one can find the EU countries with a share of 16.6%. According to experts, by 2030 biofuel production in the world will reach 150 million tons with annual production growth of 7–9%. At the same time, the preference will be given to the bioethanol, since the cost price of its production decreases faster than biodiesel cost price. The production of bioethanol can greatly stimulate agricultural production and economics of the country. It can improve the state of the environment. It is established that bioethanol added to gasoline contributes to its full combustion that significantly reduces pollutions produced by mobile emission sources.

In recent years, special attention is paid to the production of bioethanol from plant raw materials that can grow in adverse natural and climatic conditions. In this regard the use of sugar sorghum (*Sorghum bicolor* L.) is the most perspective for Kazakhstan. In this article the prospects of using a new type of raw material, namely sorghum, for the production of high-quality bioethanol were considered. Sorghum is an annual plant belonging to the genus *Sorghum Moench* possessing a large species and cultivar variety. The genus *Sorghum Saccharatum* is characterized by increased height (175–200 cm), increased tillering capacity, juicy and sweet core of the stem. It is characterized by high drought and salt resistance; it is capable to grow in conditions that are not suitable for cultivation of other crops.

We have created a working collection of sugar sorghum containing breeding samples from Kazakhstan and Russia and also the most perspective cultivars and hybrids from North America. Plants were grown in arid conditions of the South-East of Kazakhstan. There were studied such important traits as yield, grain weight, seed germination, plant height, inflorescence size and other etc. The immature embryos of different genotypes were taken for the cultivation of sugar sorghum somatic cells *in vitro*. For this the modified nutrient mediums of Murasige-Skoog and Gamborg B5 were used.

In the present article the results of research on yield parameters of sugar sorghum in arid conditions of the South-East of Kazakhstan and factors influencing the frequency of formation of somatic calluses of sugar sorghum *in vitro* are discussed.

Использование гаплоидной биотехнологии на основе культуры изолированных микроспор *in vitro* в селекции на скороспелость *Triticum aestivum* L.

Анапияев Б. Б.¹, Искакова К. М.², Ахметова А. Б.², Бейсенбек Е. Б.¹

¹ Самбаев университет, ул. Самбаева, 22, Алматы, 050013, Казахстан, e-mail: bak_anapiyayev@mail.ru

² Казахский национальный аграрный университет, пр-т Абая, 8, Алматы, 050010, Казахстан, тел.: +7(727)264-05-08, e-mail: konirsha_b@mail.ru

Пшеница (*Triticum aestivum* L.) является стратегически важной зерновой культурой, которая обеспечивает продовольственную безопасность государства. Казахстан входит в десятку крупных импортеров зерна пшеницы. Поэтому созданию новых высокопродуктивных сортов уделяется особое внимание.

Общеизвестно, что сроки созревания зерна являются решающими для начала уборки урожая. Более поздние сроки созревания зерна в сложных агроклиматических условиях Казахстана с резко континентальным климатом вынуждают фермеров начинать уборку в сезон дождей и заморозков, что, несомненно, приводит к ухудшению качества зерна, недобору и снижению сохранности урожая. Поэтому создание высокопродуктивных сортов с ускоренным сроком созревания является очень актуальным для стран с рискованным земледелием и с резкоконтинентальным климатом.

Регуляция процессов развития и созревания зерна является одним из фундаментальных вопросов физиологии, биохимии, эмбриологии, генетики и селекции растений. В настоящее время учеными интенсивно изучаются гены, влияющие на процесс деления клеток, и разрабатываются различные методы для ускорения сроков развития и созревания зерна. Также очень актуальным является изучение процессов морфогенеза и регенерации растений в культуре микроспор *in vitro* зерновых злаков. В настоящее время также интенсивно изучаются процессы развития микроспор пшеницы *in vitro*, процессы эмбриогенеза, органогенеза и проблемы регуляции процессов морфогенеза и регенерации растений. Гаплоиды являются также уникальным объектом для клеточной селекции и генетической инженерии. Экономическая эффективность использования гаплоидов является возможностью ускоренного создания генетически стабильных гомозиготных линий из перспективных гибридов и ценных генетических материалов в том числе и ценных мутантов. Обычно для генетической стабилизации перспективных гибридов и ценных форм при использовании традиционных методов селекции требуется 6–8 лет. Использование гаплоидной биотехнологии позволяет создать генетически стабилизированные, гомозиготные константные дигаплоидные линии всего за 1–2 года. Также очень важным является то, что у полученных дигаплоидных линий проявляются и рецессивные гены, многие из которых могут нести ценные признаки. Обычно, при использовании традиционных методов селекции, доминантные и рецессивные гены расщепляются по закону Менделя (3:1) и поэтому не проявляются. При использовании гаплоидной биотехнологии для генетической стабилизации доминантные и рецессивные гены распределяются и закрепляются в пропорции 1:1. Это является очень важным преимуществом гаплоидной биотехнологии, поскольку позволяет экспрессироваться рецессивным генам наравне с доминантными генами.

Нами были созданы мутантные формы пшеницы с различными сроками созревания, для генетической стабилизации отобранных образцов пшеницы с ускоренным сроком созревания были использованы методы гаплоидной биотехнологии на основе культуры изолированных микроспор *in vitro*.

Applying the haploid biotechnology based on the culture of isolated microspores *in vitro* in breeding for early maturation of *Triticum aestivum* L.

Anapiyayev B. B.¹, Iskakova K. M.², Ahmetova A. B.², Beisenbek Y. B.¹

¹ Satbayev University, 22 Satpaev st., 050013, Almaty, Republic of Kazakhstan, tel.: +7(727)257-71-47, e-mail: bak_anapiyayev@mail.ru

² Kazakh National Agrarian University, 8 Abai ave., Medeu district, 050010, Almaty, Republic of Kazakhstan, tel.: +7(727)264-05-08, e-mail: konirsha_b@mail.ru

.....

In this article there are discussed results of the use of methods of mutational breeding and haploid biotechnology based on the culture of isolated microspores *in vitro* for the creation of wheat forms of *Triticum aestivum* L with accelerated maturation periods.

Wheat (*Triticum aestivum* L.) is a strategic important cereal that provides food security to the state. Kazakhstan is one of the top ten importers of wheat grain. Therefore, the creation of new highly productive cultivars is given a special attention.

It is well-known that the terms of grain ripening are decisive for the harvest beginning. Later terms of grain ripening in severe agro-climatic conditions of Kazakhstan with sharply continental climate force farmers to start harvesting during the rainy and freezing season, that undoubtedly leads to deterioration of grain quality, shortage and loss of yield conservation. That is why creation of high productive cultivars with an accelerated maturation period is very important for countries with high-risk agriculture and a continental climate.

Regulation of grain development and maturation is one of the fundamental task of physiology, biochemistry, embryology, genetics and plant breeding. Nowadays, scientists intensively study the genes that affect the process of cell division and develop various methods to accelerate the grain development and maturation. It is also very important to study the processes of morphogenesis and plant regeneration in culture of microspores *in vitro* of cereals. At the present time, the processes of development of wheat microspores *in vitro*, embryogenesis, organogenesis and regulation of morphogenesis and plant regeneration are also intensively studied. Haploids are also unique objects for cell selection and genetic engineering. The economic efficiency of using haploids is the possibility of accelerated creation of genetic stable homozygous lines from the perspective hybrids and valuable genetic materials including valuable mutants. Usually for genetic stabilization of perspective hybrids and valuable forms at using traditional methods of breeding researchers spend 6–8 years. Applying the haploid biotechnology allow to create genetically stabilized homozygous constant doubled haploid lines in just 1–2 years. It is also very important that recessive genes are also expressed in the obtained doubled haploid lines, many of which can carry valuable traits.

Usually, using traditional breeding methods, the dominant and recessive genes are split according to the Mendelian law (3:1) and therefore recessive genes are not expressed. When using haploid biotechnology for genetic stabilization, dominant and recessive genes are distributed and fixed in a 1:1 ratio. This is a very important advantage of haploid biotechnology because it allows the recessive genes to be expressed along with dominant genes.

We have created mutant forms of wheat with different maturation periods, for genetic stabilization of selected samples of wheat with an accelerated maturation period were used the methods of haploid biotechnology based on the culture of isolated microspores *in vitro*.

Использование регуляторов роста при размножении винограда методом *in vitro*

Батукаев А. А.^{1,2}, Батукаев М. С.^{1,2}, Палаева Д. О.¹

¹ Чеченский государственный университет, ул. Шерипова, 32, Грозный, 364907, Россия, тел.: +7(8722)29-00-04

² Чеченский научно-исследовательский институт сельского хозяйства, ул. Ленина, 1, п. Гикало, Грозненский район, 366021, Россия, e-mail: batukaevmalik@mail.ru

Современное виноградарство России должно основываться на производстве сертифицированного посадочного материала. Производство посадочного материала высшей категории в Российской Федерации отсутствует.

Основная цель исследований заключалась в совершенствовании технологий клонального микроразмножения с использованием регуляторов роста. Задача состоит в получении здорового посадочного материала винограда и введение системы сертификации посадочного материала по образцу европейских стран.

Объектом исследования были сложные устойчивые сорта винограда. В качестве исходного материала были взяты интенсивно растущие зеленые побеги винограда, которые были разрезаны на одноглазковые черенки, и далее проводилось выделение меристем в ламинарных коробках. В эксперимент были включены следующие разновидности: 'Августин', 'Молдова', 'Восторг', 'Мускат Итальянский', 'Ранний Магарача', 'Подарок Магарача', 'Виорика'.

Одноглазковые черенки перед вычленением меристемы стерилизовали в 2%-м растворе гипохлорита натрия. Простерилизованные органы помещали в стерильную чашку Петри. Перед вычленением с верхушки глазка удаляли покровные чешуи, последовательно обнажая верхушечную меристему с примордиальными листочками.

Изолировали меристемы от 200 до 400 микрон со специальной иглой для приготовления и сразу же помещали на поверхность агаровой среды в чашки Петри. Выделение растительного материала проводили на первой стадии в чашках Петри, затем в пробирках 40×120 мм, содержащих 20 мл питательной среды.

Проведенные наблюдения показали, что на первом этапе выращивания (2 недели) часть меристем (40–60 % в зависимости от сорта), начали некротизировать. Оставшиеся меристемы через месяц после посадки развились в микропобеги размерами 2–2,5 мм. Эти микропобеги повторно пересаживали на такую же по составу питательную среду. Пересадку производили в биологические пробирки.

Степень приживаемости апикальных меристем на этапе введения в культуру *in vitro* у группы столовых сортов ('Августин', 'Восторг', 'Мускат Итальянский', 'Ранний Магарача') находится в среднем на уровне 50 %, а у технических сортов ('Подарок Магарача', 'Виорика', 'Ркацителли') — 40–45 %. Гибель апикальных меристем в процессе культивирования, по-видимому, наступает за счет повреждения апикальных структур в процессе вычленения.

Прижившиеся апикальные меристемы, через месяц после посадки были пересажены на питательную среду с содержанием тех же компонентов. Пересадку производили в биологические пробирки размером 40×120 мм, в течение 45–55 дней образовались регенеранты размерами 6–10 см. Далее эти микрорастения были расчеренкованы и получены микроклоны.

Резюмируя полученные результаты, следует отметить, что 40 % приживаемость апикальных меристем дает возможность дальнейшего их культивирования и размножения, при котором возможно получение безвирусного посадочного материала.

Use of growth regulators in grapes grinding by *in vitro* method

Batukaev A. A.^{1,2}, Batukaev M. S.^{1,2}, Palaeva D. O.¹

¹ Chechen State University, 32 Cheripova st., 364907, Grozny, Russian Federation, tel.: +7(8722)29-00-04

² Chechen Research Institute of Agriculture, 1 Lenina st., 366021, Guikalo, Grozny region, Russian Federation, Chechen Republic, e-mail: batukaevmalik@mail.ru

.....

Modern viticulture of Russia should be based on the production of certified planting stock. The production of planting material of the highest categories in the Russian Federation is absent. The main goal of the research was to improve the technology of clonal micropropagation using growth regulators. The task was to obtain a healthy planting stock of grapes and to introduce a certification system for planting material according to the pattern of European countries. The object of research were complex-resistant varieties of grapes. As an initial material, intensively growing green shoots of grapes were taken, which were cut into single-eyed cuttings and further carried out the isolation of meristems in laminar boxes. The following varieties were included in the experiment: 'Augustin', 'Moldova', 'Delight', 'Muscat Italian', 'Early Magaracha', 'Gift of Magarach', 'Viorika', etc.

One-slice cuttings before sterilization of the meristem were sterilized in a 2% solution of sodium hypochlorite. The sterilized organs were placed in a sterile Petri dish. Isolated meristems from 200 to 400 microns with a special preparation needle and immediately placed on the surface of the agar medium in Petri dishes. Cultivation of plant material was carried out in the first stage in Petri dishes, then in 40 x 120 mm test tubes containing 20 ml of nutrient medium.

It was developed the method of obtaining virus-free plants is based on the fact that the content of viruses in the diseased plant decreases towards the shoot tip. The apical meristem is usually free from viruses. The conducted observations showed during the first stage of cultivation (2 weeks) a part of meristems was necrotic. The remaining meristems a month later after landing have evolved into micropiles of 2–2.5 mm. These micropiles were re-transplanted into the same nutrient medium. The transplant was made into biological test tubes. The degree of survival of apical meristems at the stage of introduction into culture *in vitro* in the group of table varieties ('Augustin', 'Delight', 'Muscat Italian', 'Early Magaracha') is on the average at 50%, and in technical varieties ('Gift of Magarach', 'Viorica', 'Rkatsiteli') — 40–45%. The surviving apical meristems, a month after planting, were transplanted into a nutrient medium containing the same components. The transplantation was carried out in biological test tubes measuring 40x120 mm, during 45–55 days, regenerants with a size of 6–10 cm were formed. Then these microplants were stripped and microclones were obtained. Thus, it should be noted that 40% of the survival rate of the apical meristems allows their further cultivation and propagation, in which the production of virus-free planting material.

Особенности морфогенеза в культуре *in vitro* пыльников ярового ячменя при использовании питательных сред с различными гелеобразующими компонентами

Белинская Е. В.

Институт растениеводства им. В. Я. Юрьева НААН Украины, пр-т Московский, 142, Харьков, 61060, Украина, факс: +380(057)779-84-17, тел.: +380(057)392-13-43, e-mail: bilynskaov@gmail.com

Культивирование *in vitro* пыльников или изолированных микроспор является основой современных гаплоидных биотехнологий, позволяющих не только существенно ускорить создание гомозиготных линий для селекции и генетических исследований, но и повысить надежность отбора ценных генотипов, в том числе с использованием молекулярно-генетических маркеров.

Результаты многочисленных экспериментов по изучению начальных этапов морфогенеза, индуцируемого в данных экспериментальных системах, свидетельствуют о том, что под воздействием комплекса факторов различной природы из гаплоидных микроспор происходит образование многоклеточных структур, из которых формируются каллус и/или эмбриониды с последующей регенерацией из них растений. Поскольку наиболее быстрым путем получения регенерантов является эмбрионидогенез, цель многих исследований заключается главным образом в определении экспериментальных воздействий, способствующих массовому образованию эмбрионидов.

Нами впервые установлено положительное влияние на эмбрионидогенез и регенерацию растений в культуре пыльников *in vitro* ярового ячменя замены в составе питательной среды агар-агара химически модифицированными крахмалами (Белинская, Дульнев, 2007), кукурузными крахмалами с повышенным содержанием амилозы, полученными из зерна линий-носителей рецессивных мутаций *ae* и *su₂*, и зерновыми крахмалами гороха нормального и высокоамилозного типов (патенты Украины 34859, 42192, 103426).

В ходе наблюдений были выявлены особенности морфогенеза в культуре пыльников ячменя в зависимости от природы гелеобразователя, которая определяла его оптимальную концентрацию в среде для получения геля с приемлемыми для инокуляции эксплантов структурно-механическими характеристиками и интенсивность ростовых процессов. Наименее плотными были гели, образованные агар-агаром и крахмалами с повышенным содержанием амилозы. Гели из химически модифицированных крахмалов были более плотными и имели меньшую водоудерживающую способность. Все крахмалы, в отличие от не утилизируемого культурой агар-агара, обладали трофическими свойствами, что способствовало обеспечению развивающихся эмбрионидов продуктами термического и ферментативного гидролиза, особенно при длительном культивировании.

Было установлено, что основной причиной снижения морфогенетического потенциала культуры пыльников на агаровой среде является быстрое превращение глобулярных структур в активно растущий неморфогенный каллус. На средах с крахмалами имело место существенное снижение темпов клеточной пролиферации, особенно при использовании химически модифицированных крахмалов, и образование с высокой частотой эмбрионидов или эмбрионного каллуса. На индукционных средах, содержавших агар-агар и высокоамилозные крахмалы, происходило прорастание эмбрионидов, в то время как для получения растений из эмбрионидов, образовавшихся на средах с химически модифицированными крахмалами, необходима была их пересадка на регенерационную агаровую среду. Важным преимуществом крахмалсодержащих сред по сравнению с агаровыми было значительное снижение доли растений-регенерантов с признаками гипергидрации и более низкая стоимость. У модельного генотипа, линии ДГ00-126, при сочетании усовершенствованного способа предобработки (патент Украины 113261) и культивирования пыльников на среде с химически модифицированным крахмалом Д5 а-М частота регенерации зеленых растений достигла 100 % от числа культивируемых пыльников.

Peculiarities of morphogenesis in spring barley anther culture *in vitro* on the media with different solidifying agents

Belinskaya E. V.

Plant Production Institute n. a. V. Ya. Yuriev of the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, 142 Moskovskiyi ave., 61060, Kharkiv, Ukraine, fax: +38(572)779-84-17, tel.: +380(057)392-13-43, e-mail: bilynskaov@gmail.com

.....

Culture *in vitro* of anthers or isolated microspores is a basis of contemporary haploid biotechnologies, which not only allow acceleration of homozygous line production for breeding and genetic investigations but also increase reliability of valuable genotype selection, including combination with molecular marker application. The latter is possible due to a great advantage of DH-populations as unique material for molecular genetic research. This advantage lies in the specific mode of segregation — 1:1 for all loci — and in identity of genotypic and phenotypic classes.

Results of numerous investigations dealt with initial stages of morphogenesis induced in these experimental systems showed that multicellular structures derived from microspores were formed under the influence of different factors. This process was followed by callus and/or somatic embryo (embryoid) formation and resulted in plant regeneration. In addition, the efficiency of haploid production strongly depended on the mode of morphogenesis. As embryoidogenesis is known to be the fastest way of plant regeneration, the most investigations were aimed to determine the experimental treatments promoting mass embryoid production.

We were the first who demonstrated positive effects of such substitutes for agar as chemically modified starches produced at the Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry of NASU (Belinskaya, Dulnyev, 2007), natural corn starches with a high amylose content obtained from seeds of lines which were the *ae* and *su₂* recessive mutation carries and high amylose and normal pea starches (patens 31859, 42192, 103426) on somatic embryogenesis in spring barley anther culture *in vitro*.

Peculiarities of morphogenesis depending on chemical nature of gelling agents were revealed during our observations. It was shown that the origin of starches determined both their optimal concentrations for production of media with appropriate for explant inoculation structural and mechanical capacities and the intensity of growth processes. It is notably that media solidified by addition of agar or natural starches with high amylose contents had lower densities. At the same time, media supplemented with chemically modified starches had the highest densities and the lowest water holding abilities. All starches regardless their origin, unlike agar which was not utilized by culture, had trophic capacities and supplied developing embryoids with products of thermal and enzymatic hydrolysis, especially during long term cultivation.

It was shown that the fast transformation of globular structures into intensive growing nonmorphogenic calli was the main cause of a morphogenic potential decrease in anther culture on agar solidified medium. There were no significant differences in the dynamic of induction processes between agar and starch solidified media. However, the cell proliferation rate was sufficiently lowered on the starch solidified media, especially when chemically modified starches were used, and both embryo and embryogenic callus formed at high frequencies. Germination of differentiated embryos occurred on the agar solidified media or on the media containing high amylose starches, while in order to obtain plant regeneration from embryos produced on chemically modified starch solidified media, they should be transferred onto agar regenerative media. The important advantage of the starch solidified media in comparison to the agar containing media lies in a significant decrease in hyperhydrated plant frequency, which resulted in a drastic increase in the plantlet survival rate. In addition, starch containing media are cheaper than agar solidified medium. The frequency of green plant regeneration in anther culture *in vitro* in spring barley line DH00-126 used as a model genotype exceeded 100% related to the total number of cultivated anthers, when a combination of improved cold pretreatment (patent 113261) and medium supplemented with chemically modified starch D5 a-M was applied.

Использование транзientной экспрессии генов для визуализации локализации белков в растительной клетке

Берестовой М. А.^{1,2}, Тюрин А. А.¹, Сидорчук Ю. В.³, Фоменков А. А.¹, Носов А. В.¹, Голденкова-Павлова И. В.¹

¹ Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, ул. Ботаническая, 35, Москва, 127276, Россия, тел.: +7(495)977-94-00

² Российский государственный аграрный университет — Московская сельскохозяйственная академия им. К. А. Тимирязева, ул. Тимирязевская, 49, Москва 127550, Россия, тел.: +7(499)977-14-55

³ Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, пр-т акад. Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090, Россия, тел.: +7(383)363-49-80, e-mail: m.berestovoy1181@gmail.com

.....

Транзientная экспрессия генов показала свою эффективность для оценки внутриклеточной локализации белковых продуктов целевых генов, исследований путей передачи сигналов внутри клетки и белок-белковых взаимодействий, а также при изучении функциональных свойств регуляторных последовательностей у растений. Две основные стратегии транзientной экспрессии наиболее популярны у исследователей — трансфекция протопластов и агроинфильтрация. Каждая из них наряду с преимуществами имеет свои ограничения и недостатки. Это обуславливает необходимость разработки и апробации новых подходов для транзientной экспрессии генов в растительной клетке. В данной работе мы исследовали локализацию белков в растительной клетке на примере $\Delta 9$ -ацил-липидной десатуразы, кодируемой геном *desC* цианобактерий. Для визуализации белковых продуктов целевого гена нами использован гибридный ген *desC-egfp*, включающий последовательность гена *egfp*, белковым продуктом которого является зеленый флуоресцентный белок. В экспрессионные вектора введены последовательности, обеспечивающие локализацию белковых продуктов целевого гена в различные компартменты клетки (в хлоропласты и эндоплазматический ретикулум (ЭПР)). Исследования локализации целевых белков проводилась на растениях *Nicotiana benthamiana*. Трансформацию листьев *Nicotiana benthamiana* проводили с помощью *Agrobacterium tumefaciens*, штамм GV3101. Из агроинфицированных листьев взяты участки с максимальным уровнем флуоресценции eGFP с последующей оценкой локализации гибридного белка методом лазерной конфокальной микроскопии. Однако, использование этого метода для оценки локализации гибридного белка, как в хлоропластах, так и ЭПР оказалось затруднительно. Вероятно, это обусловлено сложными очертаниями клеток и пространственной структурой самих растительных компартментов. Чтобы преодолеть эти трудности, из участков агроинфицированных листьев с максимальной флуоресценцией выделены протопласты и исследованы с помощью флуоресцентной микроскопии. В результате нам удалось определить локализацию слитого белка DesC-EGFP в соответствующих компартментах клетки для каждой сигнальной последовательности. Мы продемонстрировали, что получение протопластов из инфицированной листовой ткани после транзientной экспрессии позволяет легко визуализировать локализацию целевых белковых продуктов в растительной клетке.

Исследования выполнены при финансовой поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 14-04-01616_а.

Transient gene expression for visualization of protein localization in plant cell

**Berestovoy M. A.^{1,2}, Tyurin A. A.¹, Sidorchuk Yu. V.³, Fomenkov A. A.¹,
Nosov A. V.¹, Goldenkova-Pavlova I. V.¹**

¹ K. A. Timiryazev Institute of Plant Physiology Russian Academy of Sciences, 35 Botanicheskaya st. 127276, Moscow, Russian Federation, tel.: +7(495)977-94-00

² Russian State Agrarian University — Moscow Timiryazev Agricultural Academy, 49 Timiryazevskaya st., 127550, Moscow, Russian Federation, tel.: +7(499)977-14-55

³ Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, 10 Academician Lavrentiev ave., 630090, Novosibirsk, Russian Federation, tel.: +7(383)363-49-80, e-mail: m.berestovoy1181@gmail.com

.....

Transient expression of genes has been shown to be useful in evaluating the intracellular localization of protein products of target genes, studying signaling pathways within the cell and protein-protein interactions, and also in exploring the functional properties of regulatory sequences in plants. Two main strategies of transient expression are most popular among researchers: protoplast transfection and agroinfiltration. Each of them, along with the advantages has its limitations. This entire demonstrate the need for the development and testing of new approaches for the transient expression of genes in the plant cell. In this paper, we studied protein localization in the plant cell using for an example $\Delta 9$ -acyl-lipid desaturase encoded by the *desC* gene of cyanobacteria. For visualization of protein products of the target gene, we used a hybrid *desC-egfp* gene, which includes the sequence of the *egfp* gene, the protein product of which is the green fluorescent protein. In the expression vectors, we introduced sequences that ensure the localization of the protein products of the target gene to various cell compartments (into chloroplasts and endoplasmic reticulum (ER)). Investigation of localization of the target proteins was carried out in leaves of *Nicotiana benthamiana*, transformed by agroinfiltration using *Agrobacterium tumefaciens*, strain GV3101. Regions with the maximum level of fluorescence of eGFP were taken from agroinfiltrated leaves, with the subsequent estimation of localization of the hybrid protein by the method of laser confocal microscopy. However, this method to assess the localization of the fusion protein, both in chloroplasts and ER has proved difficult, probably due to the intricate outlines of cells and the spatial structure of the plant compartments themselves. To overcome these difficulties were isolated protoplasts from the areas of agroinfiltrated leaves with maximum fluorescence and investigated by fluorescence microscopy. As a result, we were able to determine the localization of the DesC-EGFP fusion protein in the appropriate cell compartments. We demonstrated that the extraction of protoplasts from infiltrated leaf tissue after the transient expression simplifies visualization of the target protein localization in the plant cell.

This study was supported by the Russian Foundation for Basic Research (grant No. 14-04-01616_a)

Изменения в экспрессии генов в ходе индукции и длительного поддержания эмбриогенного состояния в каллусах пшеницы

Бишимбаева Н. К.^{*,1,7}, Митра А.², Каиров У.³, Накисбеков Н. О.⁴, Молкенов А.³, Ли Ч.⁵, Хуанг К.⁵, Бегзат А. Н.^{1,6}, Капасулы Т.¹, Амирбеков А. С.⁴, Смагул А. О.⁴, Рахимбаев И. Р.¹

¹ Институт биологии и биотехнологии растений (ИББР) КН МОН РК, Алматы, Казахстан

² Департамент фитопатологии, Университет Небраска-Линкольн, Небраска, США

³ Лаборатория биоинформатики и вычислительной системной биологии, Назарбаев Университет, Астана, Казахстан

⁴ Казахский Национальный Медицинский Университет имени С. Д. Асфендиярова, Алматы

⁵ Пекинский геномный институт, Шэньжень, Китай

⁶ Казахский Национальный Университет имени аль-Фараби, Алматы, Казахстан

⁷ Казахский национальный аграрный университет (КазНАУ), МСХ РК, Алматы, Казахстан

* e-mail: gen_jan@mail.ru

Сегодня наиболее современным подходом оценки относительной экспрессии генов в клетках, тканях, органах или живых организмов в разных условиях является профилирование полного транскриптома. Данное исследование было направлено на выяснение вопросов о том, какие гены активируются или ингибируются (RNAseq) и какие регуляторные элементы среди некодирующих малых РНК (small RNAseq) задействованы в процессе индукции эмбриогенного потенциала и длительного сохранения индуцированного состояния при многократном субкультивировании в разработанных нами модельных тканевых системах. В задачи данного исследования входило сравнительное изучение транскриптома RNAseq и профиля малых РНК (small RNAseq) неморфогенных глобулярных каллусов пшеницы и глобулярных каллусов, перепрограммирующихся на путь эмбриодогенеза и регенерации растений под действием стрессовых факторов и фитогормонов (7 дней инкубирования).

В результате транскриптомного анализа идентифицированы ключевые гены, вовлеченные в ранние этапы индукции длительно сохраняемого эмбриогенного потенциала в разработанных нами модельных системах пшеницы. Выявлено 974 гена с повышенной экспрессией, относящихся к категориям протеолиза белка и клеточных белков, участвующих в катаболизме, из них было распознано 419. Выявлено 834 гена с пониженной экспрессией из категорий факторов ответа на сигналы, из которых было распознано 403 гена.

Впервые, в результате изучения некодирующих РНК, показано, что в индуцированных к эмбриодогенезу каллусах пшеницы идет повышение экспрессии 1438 microRNA и 34963 siRNA, и снижение экспрессии 436 microRNA и 23046 siRNA, по сравнению с глобулярными неморфогенными каллусами. Это соответствует современному представлению о функциях некодирующих РНК, считающихся основными элементами регуляции экспрессии генов.

В целом, транскриптомный анализ разработанной нами модельной системы культивируемых тканей пшеницы выявил гены и регуляторные элементы, связанные с драматическими фенотипическими различиями в нашей системе. Это позволит нам далее раскрыть молекулярное взаимодействие, ведущее к наблюдаемым нами фенотипическим состояниям. Важно также отметить, что в наших анализах выявлено много генов, которые отсутствуют в базе данных. Возможно, это гены специфические только для пшеницы. Следующий шаг — изучить эти гены, чтобы более детально выяснить их роль. Мы также сравним контрольный геном пшеницы с нераспознанными последовательностями генов.

Поскольку феномен соматического эмбриогенеза является крайней реакцией на стресс, способствующей выживанию и размножению живых систем, эти исследования, в итоге, позволят нам выявить гены, ответственные за обеспечение высокой продуктивности в стрессовых условиях. Это, в свою очередь, позволит создать более качественную пшеницу, которая может выращиваться эффективно и безопасно в экологических условиях Казахстана.

Эта работа выполнена в рамках программы фундаментальных исследований № 0149 ПЦФ Министерства образования и науки РК (2015–2017 гг.).

Alterations in gene expression during the induction and long-term maintenance of embryogenic state in wheat calli

Bishimbayeva N. K.^{*,1,7}, Mitra A.², Kairov U.³, Nakisbekov N. O.⁴, Molkenov A.³, Li Ch.⁵, Huang K.⁵, Begzat A. N.^{1,6}, Kapasuly T.¹, Amirbekov A. S.⁴, Smagul A. O.⁴, Rakhimbayev I. R.¹

¹ Institute of Plant Biology and Biotechnology (IPBB), SC MES RK, Almaty, Republic of Kazakhstan

² Plant Pathology Department of University of Nebraska- Lincoln, Nebraska, USA

³ Laboratory of bioinformatics and computational system of biology, Center for Life Sciences, National Laboratory Astana, Nazarbayev University, Astana, Republic of Kazakhstan

⁴ Asfendiarov Kazakh National Medical University, Almaty, Republic of Kazakhstan

⁵ Beijing Genomics Institute (BGI), Shenzhen, China

⁶ Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Republic of Kazakhstan

⁷ Kazakh National Agrarian University (KazNAU), MA RK, Almaty, Republic of Kazakhstan

* e-mail: gen_jan@mail.ru

Today, the most modern approach to assessing the relative expression of genes in cells, tissues, organs or living organisms under different conditions is the entire transcriptome profiling. This study is aimed to reveal: which genes are up- and down regulated (RNAseq) and what regulatory elements among non-coding RNAs (small RNAseq) are involved in the process of the induction of long-term embryogenic potential and maintenance of the induced state during multiple subcultivation of wheat callus tissues in model systems elaborated in our laboratory.

The objectives of this study include a comparative study of the transcriptome (RNAseq) and the small RNA profile of the original non-morphogenic globular calli of wheat and globular calli reprogramming on the path of long-term embryodogenesis under the effect of stress factors and phytohormones (7 days of incubation).

As a result of transcriptomic RNAseq analysis, key genes involved in early stages of induction of long-term embryogenic potential have been identified. 974 genes with up-regulated expression have been established belonging to the categories of the protein proteolysis and cellular proteins involved in catabolism, 419 of them were recognized. 834 genes with down-regulated expression have been revealed belonging to the categories of response factors for signals, 403 of them were recognized.

For the first time, in the result of the study of non-coding RNAs (small RNAseq), it was shown the increase in the expression of 1438 microRNA and 34963 siRNAs in wheat calli induced to long-term embryogenic potential, and the decrease in the expression of 436 microRNA and 23046 siRNA compared to globular non-embryogenic calli. This corresponds to the modern concept of the functions of non-coding RNAs, which are considered to be the main element of the process of regulation of gene expression.

Overall, transcriptome analyses of our novel model wheat system revealed genes and regulatory elements associated with dramatic phenotypic differences in our system. These genes will allow us to further dissect the molecular interplay leading to our observed phenotypic states.

It is also interesting to note that our analyses identified many genes that are not in the database. It is possible that these are wheat specific genes and these genes will provide a direct wheat target. Our next step is to study these genes to understand their roles in more detail. We will also check wheat reference genome for unrecognized gene sequences.

As phenomenon of somatic embryogenesis is appeared to be an extreme reaction to stress leading to the surviving and propagation of living systems these studies will eventually allow us to reveal genes responsible for the maintenance of high productivity in stress conditions. This, in turn, will allow to produce better wheat crop that can be grown efficiently and in an environmentally friendly manner in Kazakhstan.

This work performed in the framework of fundamental research program No. 0149, Target Program Funding, Ministry of Education and Science RK (2015–2017).

Создание скороспелых продуктивных форм мягкой яровой пшеницы с использованием клеточной технологии

**Бишимбаева Н. К.^{1,8,*}, Баймагамбетова К.², Нурпеисов И. А.²,
Чудинов В. А.⁴, Середа Г. А.³, Бекенова Л. В.⁵, Гасс О. С.⁶,
Карабаев М. К.⁷, Урозалиев Р. А.², Рахимбаев И. Р.¹**

¹ *Институт биологии растений и биотехнологии (ИББР), КН МОН РК, Алматы, Казахстан*

² *Казахский научно-исследовательский институт сельского хозяйства и растениеводства, Алмалыбак, Казахстан*

³ *Карагандинский научно-исследовательский институт селекции и растениеводства, Казахстан*

⁴ *Карабалыкская сельскохозяйственная экспериментальная станция, Костанайская область, Казахстан*

⁵ *Павлодарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства, Казахстан*

⁶ *Северо-Казахстанская экспериментальная станция, Северо-Казахстанская область, Казахстан*

⁷ *Международный центр улучшения пшеницы и кукурузы, СИММИТ-САС офис в Алматы*

⁸ *Казахский национальный аграрный университет (КазНАУ), МСХ РК, Алматы, Казахстан*

* e-mail: gen_jan@mail.ru

Основными областями выращивания яровой пшеницы являются северные регионы Казахстана, характеризующиеся поздней весной, ранней осенью и коротким летом. Потери урожая большинства коммерческих сортов под осенним дождем и морозами приносят огромные экономические потери. Поэтому весьма актуальной задачей является создание скороспелых линий и сортов основной сельскохозяйственной культуры — яровой пшеницы.

Нами разработана клеточная биотехнология создания скороспелых форм яровой пшеницы с комплексом ценных хозяйственно-биологических признаков. Данная технология была протестирована на 28 коммерчески важных сортах пшеницы нового поколения, которые районированы в Северном и Центральном Казахстане. 398 растений R0 были регенерированы из многократно культивируемых каллусов 28 сортов пшеницы. Из них 110 растений 18 сортов дали семенное R1 поколения. 47 линий из 110 линий R1 поколения (37%) отобраны как имеющие сокращенные сроки созревания — на 3–6 дней, по сравнению с исходными сортами.

Экологическое исследование отобранных линий R2 поколения в условиях Северного и Центрального Казахстана позволило подтвердить выраженность признаков ускоренного созревания (на 1–8 дней) и отобрать для каждого региона перспективные скороспелые формы (25,0–47,7% от количества испытанных линий) с высокими показателями продуктивности и признаками засухоустойчивости.

17 скороспелых линий (70,8%, на 3–8 дней раньше стандарта) были отобраны из 24 линий пшеницы R4 поколения в Павлодарской области, в Костанайской области — 15 скороспелых линий (44,1%, на 2–4 дня раньше стандарта) из 34 линий R4 поколения. Важно, что почти все отобранные скороспелые линии имеют либо повышенную продуктивность, либо продуктивность на уровне стандарта, что трудно или невозможно достичь методами традиционной селекции. Также эти линии сохраняют показатели качества зерна на уровне, характерном для сильных пшениц.

Следует отметить, что полученный выход скороспелых форм намного выше, чем выход трансгенных форм с введенными полезными генами, полученных методами генетической трансформации (0,1–2,0%). Таким образом, можно заключить, что клеточная технология длительной регенерации растений, разработанная в нашей лаборатории, является эффективным биотехнологическим инструментом для создания скороспелых продуктивных форм мягкой яровой пшеницы.

Работа выполнена в рамках проекта ГФ № 1911 (2012–2014 гг.) и программы ПЦФ № 0149 (2015–2017 гг.) Министерства образования и науки Республики Казахстан.

Creation of early maturing productive forms of soft spring wheat using the cell technology

**Bishimbayeva N. K.^{1,8}, Baymagambetova K.², Nurpeisov I. A.²,
Chudinov V. A.⁴, Sereda G. A.³, Bekenova L. V.⁵, Gass O. S.⁶,
Karabayev M. K.⁷, Urozaliyev R. A.², Rakhimbayev I. R.¹**

¹ Institute of Plant Biology and Biotechnology (IPBB), SC MES RK, Almaty, Republic of Kazakhstan

² Kazakh Research Institute of Agriculture and Crop Production, Almalyk, Republic of Kazakhstan

³ Karaganda Research Institute of Breeding and Crop Production, Republic of Kazakhstan

⁴ Karabalyk Agricultural Experimental Station, Kostanai region, Republic of Kazakhstan

⁵ Pavlodar Research Institute of Agriculture, Republic of Kazakhstan

⁶ North-Kazakhstan experimental station, North Kazakhstan region, Republic of Kazakhstan

⁷ International Maize and Wheat Improvement Center, CIMMYT-CAC office in Almaty

⁸ Kazakh National Agrarian University (KazNAU), MA RK, Almaty, Republic of Kazakhstan

*e-mail: gen_jan@mail.ru

The main areas of spring wheat cultivation are the northern regions of Kazakhstan, characterized by late spring, early autumn and short summer. Crop destruction of most commercial cultivars under the autumn rain and frosts brings huge economic losses. Therefore, the creation of early maturing lines and cultivars of main agricultural crop — spring wheat, is a very actual task.

We have developed the cell biotechnology of the creation of early maturing forms of spring wheat with the complex of valuable economicbiological traits. This method was tested on 28 commercially important wheat varieties of new generation which are cultivated in Northern and Central Kazakhstan. 398 R0 plants were regenerated from longterm cultivated calli of 28 wheat varieties. From these 110 plants of 18 varieties brought up R1 seed generation. 47 lines (37 %) from those 110 lines of R1 we selected that had accelerated term of maturation on 36 days compared to initial varieties.

Ecological trial of selected lines in R2 generation at North and Central Kazakhstan conditions allowed to prove the expression of the precocity trait (accelerated development on 18 days) and to select the early maturing forms (2547.7 % from the number of lines tested) with high productivity and drought resistance traits which were most prospective for each region.

17 precocious lines (70.8 %, 3–8 days earlier, than standard) were selected from 24 wheat lines of R4 generation in Pavlodar region, in Kustanay region — 15 precocious lines (44.1 %, 2–4 days earlier) were chosen from 34 lines of R4 generation. Important, that almost all selected early maturing lines have either an increase of productivity or have similar level comparing with standard, which is difficult or impossible to distinguish by the methods of classic breeding. Also these lines maintain their grain quality characteristics typical for strong wheat.

It should be noted that the obtained output of early maturing forms is much higher than output of transgenic forms with introduced useful genes obtained by genetic transformation (0.1–2.0 %). Therefore, we can conclude that developed cell technology is an effective alternative biotechnological method for the creating of early maturing productive forms of soft spring wheat.

This work performed under the project No. 1911 of GF1 program (2012–2014) and the program No. 0149 of Target Program Funding (2015–2017), Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan.

Влияние концентрации аммонийного азота на ризогенез микропобегов винограда

Бободжанова Х. И.¹, Кухарчик Н. В.², Хаитов А. Ё.¹

¹ Таджикский национальный университет, пр-т Рудаки 17, Душанбе, 734025, Таджикистан, факс: +992(37)221-48-84, тел.: +992(907)95-67-77, e-mail: bobojankh_7@bk.ru

² Институт плодоводства, ул. Ковалева 2, аг. Самохваловичи, 223013, Беларусь, тел./факс: +375(17)50-66-009, e-mail: nkykhartchyk@gmail.com

Представлены данные по оценке влияния периода покоя *in vitro* при низких положительных температурах, а также концентрации аммонийного азота на ризогенез микропобегов винограда. Объектами исследования выбраны сорта винограда 'Ризамат' и 'Победа'.

Для ризогенеза использовали микропобеги длиной 1–2 см, прошедшие период покоя при пониженной положительной температуре. Оценено влияние концентрации NH_4NO_3 (1/4 стандартной MS и без NH_4NO_3) на эффективность ризогенеза. Морфологические характеристики микропобегов фиксировали на 15, 30 и 45 сутки. Статистическую обработку проводили, используя ANOVA, многофакторный дисперсионный анализ, критерий Дункана при $p = 0,05$ для сравнения средних величин в программе *Statistica 6,0*.

Установлено влияние концентрации NH_4NO_3 на эффективность ризогенеза микропобегов винограда сортов 'Ризамат' и 'Победа'. У сорта 'Ризамат' процент ризогенеза во всех вариантах опыта высокий и варьирует в пределах от 65 до 100. В питательной среде с концентрацией $\frac{1}{4}$ NH_4NO_3 ризогенез выше, чем в среде безаммонийного азота, и достигает 90–100%. Микропобеги винограда сорта 'Ризамат' уже на 15-й день развития укоренялись на 90%, а на 30 день этот показатель составил 100%.

Микропобеги сорта 'Победа', напротив, лучше укоренялись на среде без аммонийного азота (100% укоренения к 30-му дню пассажа).

Морфологические показатели развития растений-регенерантов на питательных средах с разной концентрацией аммонийного азота отличаются у исследованных сортов винограда. Установлено достоверное влияние концентрации аммонийного азота на количество и длину корней.

Морфологические характеристики растений-регенерантов статистически достоверно отличались на 45-й день культивирования на среде с концентрацией $\frac{1}{4}$ аммонийного азота для сорта 'Ризамат' по всем показателям. Лучшие морфологические показатели отмечены для сорта 'Победа' на 45-й день культивирования в среде без NH_4NO_3 , однако достоверное влияние выявлено только на количество листьев и длину корней.

Так, например, количество корней значительно отличается при разных концентрациях аммонийного азота для сорта 'Ризамат' к 30-му дню развития и составляет на питательной среде без NH_4NO_3 $2,5 \pm 0,49$ и на среде с $\frac{1}{4}$ NH_4NO_3 — $4,05 \pm 0,44$, длина корней составляет $4,47 \pm 0,29$ см на 45-й день развития у растений сорта 'Ризамат'. В этом же варианте опыта отмечается максимальное количество листьев и длина побега.

Для сорта 'Победа' большинство морфологических показателей лучше на среде без аммонийного азота.

Таким образом, в серии экспериментов отмечено влияние концентрации аммонийного азота на эффективность ризогенеза, количество и длину корней микропобегов винограда сортов 'Ризамат' и 'Победа'.

Influence of ammonium nitrogen concentration on rhizogenesis of micro shoots of grapes

Bobodzhanova Kh. I.¹, Kukharchik N. V.², Khaitov A. E.¹

¹ Tajik National University, 17 Rudaki ave., 734025, Dushanbe, Tajikistan,
fax: +(992 37)221-48-84, tel.: +(992)907-95-67-77, e-mail: bobojankh_7@bk.ru

² Institute for Fruit Growing, 2 Kovalev st., 223013, Samokhvalovichy, Minsk region, Republic of Belarus,
tel./fax: +375(17)50-66-009, e-mail: nkykhartchyk@gmail.com

.....

The data on the evaluation of the effect of the rest period *in vitro* at low positive temperatures, as well as the concentration of ammonium nitrogen on the rhizogenesis of micro shoots of grapes is presented. The objects of study chosen: grapes 'Risamat' and 'Pobeda'.

For rhizogenesis, micropiles of 1–2 cm length were used, which passed the rest period at a low positive temperature. The effect of NH_4NO_3 concentration (1/4 standard MS and without NH_4NO_3) on the efficacy of rhizogenesis was estimated. Morphological characteristics of micro shoots of grapes were fixed on the 15th, 30th and 45th days. Statistical processing was carried out using ANOVA, multivariate analysis of variance, Duncan's criterion for $p = 0.05$ for comparison of mean values in the program Statistica 6.0.

The influence of NH_4NO_3 concentration on the efficiency of rhizogenesis of micro shoots of grapes of 'Risamat' and 'Pobeda' varieties is established. The percentage of rhizogenesis of 'Risamat' variety in all variants of the experiment is high and varies from 65 to 100. In a nutrient medium with a concentration of $\frac{1}{4}$ NH_4NO_3 , the rhizogenesis is higher than in a medium without ammonium nitrogen and reaches 90–100%. Micro shoots of the 'Risamat' grape variety were already rooted 90% on the 15th day of development, and on the 30th day this figure was 100%.

Micro shoots of the 'Pobeda' variety, on the contrary took a better root on a medium without ammonium nitrogen (100% rooting by the 30th day of the passage).

Morphological indices of development of regenerating plants on nutrient medium with different concentrations of ammonium nitrogen differ in the varieties studied. A significant effect of the concentration of ammonium nitrogen on the number and length of roots was established.

The morphological characteristics of the regenerating plants were statistically significantly different on the 45th day of culture on a medium with a concentration of $\frac{1}{4}$ ammonium nitrogen for the 'Risamat' variety in all respects. The best morphological indices were recorded for 'Pobeda' on the 45th day of cultivation in a medium without NH_4NO_3 , however only the number of leaves and the length of the roots were significantly affected.

Thus, for example, the number of roots differs significantly at different concentrations of ammonium nitrogen for the 'Risamat' variety by the 30th day of development and is 2.5 ± 0.49 in nutrient medium without NH_4NO_3 and 4.05 ± 0.44 on a medium with $\frac{1}{4}$ NH_4NO_3 , the length of the roots is 4.47 ± 0.29 cm on the 45th day of development in plants of the 'Risamat' variety. In this same experiment, the maximum number of leaves and the length of the shoot are noted.

For 'Pobeda' most morphological indicators are better in a medium without ammonium nitrogen.

Thus, in a series of experiments, the influence of the concentration of ammonium nitrogen on the efficiency of rhizogenesis, the number and length of the roots of microshoots of the Risamat and Pobeda varieties of grapes was noted.

Использование методов биотехнологии при создании коллекции оздоровленных сортов винограда в Таджикистане

Бободжанова Х. И.

Таджикский национальный университет, пр-т Рудаки 17, Душанбе, 734025, Таджикистан,
факс: +(992 37)221-48-84, тел.: +(992)907-95-67-77, e-mail: bobojankh_7@bk.ru

Работа посвящена выявлению оптимальных условий введения в культуру *in vitro*, микроразмножения, ризогенеза и адаптации растений-регенерантов к условиям *ex vitro*.

Предложен способ стерилизации эксплантов, способствующий получению большего количества жизнеспособных эксплантов, свободных от грибковой и бактериальной инфекции. Проведен сравнительный анализ эффективности введения в культуру *in vitro* коллекционных сортов винограда, показана высокая результативность инициации эксплантов исследованных сортов. Показано, что их регенерационная способность неодинакова, зависит от сорта и типа экспланта, а также от времени отбора материала. Коэффициенты микроразмножения также существенно различаются в зависимости от генотипа и культуральных методик. Показано, что обеспечение оптимальных условий роста и развития растений в культуре *in vitro* позволяет реализовать высокие коэффициенты размножения.

Показатели длины побега и количества листьев больше зависели от сорта, чем от питательной среды. Полученные растения-регенеранты имели хорошо развитую корневую систему, побеги и листовую массу. Получена достаточно высокая результативность ризогенеза в культуре *in vitro* в среднем по исследованным сортам. Не отмечено зависимости между эффективностью ризогенеза одревесневших черенков сортов винограда и эффективностью инициации культуры *in vitro*.

В серии опытов показано, что максимальная адаптация растений-регенерантов ранних сортов винограда отмечена на субстрате БИОНА 111 (91,6%). Отмечена положительная тенденция в развитии корней и побегов для исследованных сортов винограда.

Одним из перспективных результатов проведенных исследований является получение адаптированных растений из единичных черенков, собранных с различных регионов Таджикистана и создание новой оздоровленной *in vitro* коллекции сортов винограда на территории Центра биотехнологии. Основанием для оздоровления коллекции явился достаточно высокий уровень инфицирования вирусами насаждений винограда. Наличие вирусов отмечено на 9 сортах винограда из 35 и на 5 виноградниках из 6 обследованных. На сортах винограда диагностированы вирусы: GVA, GLRaV-2, GLRaV-3, GFLV, RRV и установлено отсутствие GLRaV-1, GFkV, SLRV, TBRV, ArMV.

Создана базовая коллекция (96 сортов), в том числе 36 местных сортов винограда. Коллекция оздоровленных сортов винограда *in vitro* (18 сортов, составляющая 4667 пробирочных растений), коллекция *ex vitro* (11 сортов, составляющая 216 растений в сосудах доращивания). В коллекции собраны сорта таджикских селекционеров, а также народной селекции.

Положено начало комплексной работе по сохранению коллекции сортов в культуре *in vitro* и микроразмножению традиционных таджикских сортов винограда, возвращению их в аграрное производство. Определены перспективы использования данной технологии в промышленных масштабах. Созданы предпосылки для организации в Республике Таджикистан банка местных сортов винограда, оздоровленных от вирусных патогенов в культуре *in vitro*, с перспективой последующего тиражирования сертифицированного по мировым стандартам посадочного материала.

Use of biotechnology methods in creating a collection of healthy grapes in Tajikistan

Bobodzhanova Kh. I.

Tajik National University, 17 Rudaki ave., 734025, Dushanbe, Tajikistan,
 fax: +(992 37)221-48-84, tel.: +(992)907-95-67-77, e-mail: bobojankh_7@bk.ru

The work is devoted to the identification of optimal conditions for introduction into culture *in vitro*, micropropagation, rhizogenesis and adaptation of regenerative plants to *ex vitro* conditions.

A method for sterilizing explants is proposed that facilitates the production of more viable explants free of fungal and bacterial infections. A comparative analysis of the efficiency of introduction of vintage grape varieties into the culture *in vitro* has been performed, and the high efficiency of initiation of explants of the studied varieties has been shown. It is shown that their regenerative capacity is not the same, depends on the type and type of explant, as well as on the time of material selection. The coefficients of micropropagation also vary significantly, depending on the genotype and culture techniques. It is shown that the provision of optimal conditions for the growth and development of plants in culture *in vitro* makes it possible to implement high multiplication factors.

The parameters of shoot length and number of leaves depended more on the variety than on the nutrient medium. The regenerated plants obtained have a well developed root system, shoots and a leaf mass. A sufficiently high productivity of rhizogenesis in culture *in vitro* was obtained on the average according to the studied varieties. There was no relationship between the efficacy of rhizogenesis of lignified cuttings of grape varieties and the efficiency of *in vitro* culture initiation.

In a series of experiments it was shown that the maximum adaptation of regenerative plants of early grape varieties was noted on the substratum BIONA 111 (91.6%). A positive trend in the development of roots and shoots for the studied varieties of grapes was noted.

One of the promising results of the studies is the production of adapted plants from single cuttings collected from various regions of Tajikistan and the creation of a new, *in vitro*, healthy collection of grape varieties on the territory of the Biotechnology Center. The reason for the recovery of the collection was a rather high level of infection with viruses of plantations of grapes. The presence of viruses was noted on 9 from 35 varieties of grapes and on 5 vineyards from 6 examined. Viruses were diagnosed on grape varieties: GVA, GLRaV-2, GLRaV-3, GFLV, RRV and the absence of GLRaV-1, GFkV, SLRV, TBRV, ArMV was established.

A basic collection was created (96 varieties), including 36 local varieties of grapes. The collection of improved grape varieties *in vitro* (18 varieties, comprising 4667 test plants), *ex vitro* collection (11 varieties, comprising 216 plants in growing vessels). The collection consists of varieties of Tajik breeders, as well as people's selection.

The complex work on preservation of a collection of varieties in culture *in vitro* and micropropagation of traditional Tajik sorts of grapes, returning them to agrarian production was initiated. The prospects of using this technology on an industrial scale have been determined. The preconditions for organizing a bank of local varieties of grapes, revived from viral pathogens in culture *in vitro*, with the prospect of subsequent replication of planting material certified according to world standards have been created in the Republic.

Особенности липидного метаболизма у *Chlorella vulgaris* при действии микроэлементов

Боднар О. И., Ковальская Г. Б., Грубинко В. В.

Тернопольский национальный педагогический университет им. В. Гнатюка, ТНПУ,
ул. М. Кривоноса, 2, Тернополь, 46027, Украина,
факс: +380(352)43-59-01, тел.: +380(352)43-59-01, e-mail: bodnar@chem-bio.com.ua

Среди биологически активных добавок для профилактики нарушений обмена веществ используют нативные высушенные водоросли и субстанции на их основе. Они могут быть эффективным источником селена и эссенциальных металлов. Например, *Chlorella vulgaris* включает микроэлементы в аквакультуре не только в пигменты и белки, но в значительном количестве и в липиды, стимулируя их образование в клетках водоросли (Луцив А. И. и др., 2015; Винярская Г. Б. и др., 2016; Лукашив О. Я. и др., 2017). Цель исследования — определение интенсивности биосинтеза липидов у хлореллы при действии ионов цинка и хрома (III) в присутствии натрия селенита. В эксперименте к культуре *Chlorella vulgaris* добавляли водные растворы Na_2SeO_3 из расчета на Se(IV) — 10,0 мг/дм³, $\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ из расчета на Zn^{2+} и Cr^{3+} — по 5,0 мг/дм³. У водорослей определяли активность фермента биосинтеза липидов глицерол-3-фосфатацилтрансферазы (КФ 2.3.1.15) при $t=20^\circ\text{C}$ и освещении 2500 лк по включению [¹⁴C]-олеата (184 кБк) в липиды в присутствии 0,6 мМ глицерол-3-фосфата, тритона X-100, 2 мМ MgCl_2 на протяжении 60 мин. Реакцию останавливали 10 % ТХУ, липиды экстрагировали по Nichols, разделяли их фракции методом тонкослойной хроматографии и автордиографировали.

Результаты включения в липиды [¹⁴C]-олеата свидетельствует о достоверном возрастании биосинтеза триацилглицеролов (ТАГ), снижении накопления диацилглицеролов (ДАГ) и увеличении количества фосфолипидов (ФЛ) по отношению к показателям в контроле во всех случаях действия микроэлементов. Включение [¹⁴C]-олеата в жирные кислоты (ЖК) является следствием изменения их общего фонда (пула), связанным с активацией липидного метаболизма при действии солей селена, цинка и хрома. Олеат является предшественником других ЖК, которые включаются в глицеролипиды. Выявлено возрастание интенсивности включения [¹⁴C]-олеата в основной компонент клеточных мембран — ФЛ, что свидетельствует об их участии в формировании токсикорезистентности клеток водоросли.

Что касается содержания липидов, то при действии селенита натрия отдельно и при совместном влиянии с ионами цинка и хрома (III) их общее содержание возрастает на 9 %, 13 % и 10 % соответственно. При этом, содержание ТАГ при действии селенита и селенита с цинком изменяется относительно контроля незначительно. При действии селенита и хрома количество ТАГ повышается на 76 %. Количество ДАГ при действии селенита отдельно и с ионами хрома достоверно уменьшается (на 18 % и на 15 % соответственно), а селенита с ионами цинка — возрастает на 31 %. Изменяется также содержание ФЛ: при действии селенита отдельно и с ионами цинка их содержание соответственно увеличивается на 20 % и 10 % относительно контроля, а при совместном воздействии селенита и хрома (III) — снижается на 15 %. Согласно с выявленными закономерностями изменяется содержание и неэтерифицированных ЖК: при действии селенита с ионами цинка и хрома (III) их содержание увеличивается соответственно на 48 % и 20 % относительно контроля.

Известно, что общей тенденцией реакции зеленых водорослей, в том числе и хлореллы, на воздействие микроэлементов является перераспределение соотношения липидов различных классов. Индивидуальные же реакции хлореллы на воздействие различных комбинаций солей являются адаптацией как на уровне общего метаболизма, так и на уровне липидного метаболизма. Сопоставляя результаты активности биосинтеза липидов с их содержанием в клетках, можно сделать вывод о том, что вновь синтезированные липиды активно используются для обеспечения специфических адаптаций к воздействию селенита и ионов металлов. Однако, механизм токсического действия микроэлементов и формирования резистентности клеток к ним, по-видимому, различен.

Features of lipid metabolism in *Chlorella vulgaris* Beij. under the action of trace elements

Bodnar O. I., Kovalskaya H. B., Grubinko V. V.

V. Hnatyuk Ternopil National Pedagogical University (TNPU), 2 Krivonosy st., 46027, Ternopil, Ukraine, fax: +380(352)43-59-01, tel.: +380(352)43-59-01, e-mail: bodnar@chem-bio.com.ua

Among the biologically active additives that are used for prevention of metabolic disorders are native dried algae and substances that were made on their basis. They can be used as an effective source of selenium and essential metals. For example, *Chlorella vulgaris* introduces micronutrients from aquaculture, not only into pigments and proteins, but also in a significant amount into lipids, stimulating their formation in algal cells (Lutsiv A. I et al., 2015; Vinyarskaya G. B et al., 2016; Lukashiv O. Ya. et al., 2017). The aim of the study was to determine the intensity of lipid biosynthesis in chlorella under the action of zinc and chromium (III) ions in the presence of sodium selenite. In the experiment, the aqueous solutions of Na_2SeO_3 , calculated from the normal ratio for Se (IV) — 10.0 mg/dm³, $\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ and $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ based on Zn^{2+} и Cr^{3+} — at 5.0 mg/dm³ for the *Chlorella vulgaris* culture. The activity of the enzyme of lipid biosynthesis of glycerol-3-phosphatacyltransferase (QF 2.3.1.15) at $t = 20^\circ\text{C}$ and illumination of 2500 lux was determined in algae by the incorporation of [¹⁴C]-oleate (184 kBq) into lipids in the presence of 0.6 mM of glycerol-3 phosphate, Triton X-100, 2 mM MgCl_2 during 60 min. The reaction was stopped by 10 % TCA, lipids were extracted using Nichols procedure, their fractions were separated using thin layer chromatography and autoradiographed.

The results of the of [¹⁴C]-oleate inclusion into lipids testifies a significant increase in the biosynthesis of triacylglycerols (TAG), a decrease of the diacylglycerols (DAG) accumulation and an increase in the amount of phospholipids (PL) relatively to the parameters in the control groups in all cases. Inclusion of [¹⁴C]-oleate in fatty acids (FA) is a consequence of changes in their total pool associated with the activation of lipid metabolism under the action of salts of selenium, zinc and chromium. Oleate is a precursor of other FAs that are incorporated into glycerolipids. An increase in the intensity of [¹⁴C]-oleate incorporation into the main component of cell membranes, PL, is revealed, which indicates their participation in the formation of toxic resistance of algal cells.

With regard to the content of lipids, in case when the sodium selenite acts separately and when it is combined with zinc and chromium(III) ions, their total content increases by 9 %, 13 % and 10 %, respectively. At the same time, the content of TAG under the action of selenite and selenite with zinc varies insignificantly with respect to the control. After adding selenite and chromium, the amount of TAG was increased by 76 %. The amount of DAG under the action of selenite separately and with chromium ions significantly decreases (by 18 % and 15 %, respectively), and selenite with zinc ions increases by 31 %. The content of PL is also changed: when the action of selenite is separately and with zinc ions, their content is accordingly increased by 20 % and 10 % relative to control, and when combined with selenite and chromium (III) — decreases by 15 %. According to the revealed regularities, the content of non-etherified FA varies: after adding selenite with zinc and chromium (III) ions, their content increases by 48 % and 20 %, respectively, with respect to the control.

It is known that the general tendency of green algae reaction, including chlorella, to the action of trace elements is the redistribution of the lipids ratio different lipid classes. Individual reactions of chlorella to the influence of various combinations of salts are an example of adaptation as at the level of general metabolism and at the level of lipid metabolism. Comparing the results of lipid biosynthesis activity with their content in cells, we can conclude that newly synthesized lipids are actively used to provide specific adaptations to the effects of selenite and metal ions. However, the mechanism of the toxic effect of microelements and the formation of cell resistance to them, apparently, is different.

Эффективность регуляторов роста при клональном размножении декоративных орхидей в культуре *in vitro*

Большакова Е. В., Емельянова И. С., Лукаткин А. С.

Национальный исследовательский Мордовский государственный университет
им. Н. П. Огарева, ул. Большевикская, 68, Саранск, 430005, Россия,
тел.: +7(8342)32-25-23, факс +7(8342)32-45-54

Создание высокоэкологичной среды обитания является одной из важнейших задач современного общества. В этой связи все более актуальным и востребованным становится озеленение и фитодизайн помещений. В настоящее время в практике фитодизайна все чаще используются орхидеи, среди которых большой популярностью пользуется представитель рода *Vanda*. Высокие декоративные качества, оригинальное строение цветка, сложный и длительный онтогенез обуславливают повышенное внимание к орхидным, как объекту специального исследования.

Немаловажным фактором для дифференцировки тканей и органогенеза при культивировании растений *in vitro* является содержание и соотношение в среде различных регуляторов роста (РР). В данной работе изучали особенности формирования и роста органов ванды гибридной при различном содержании РР в питательной среде.

Объектом исследования были пробирочные растения *Vanda hybrida*, полученные из Лаборатории клеточной биотехнологии Центрального ботанического сада НАН Республики Беларусь. Клонально размножаемые растения высаживали на среды Мурасиге-Скуга (МС) с добавлением индолилуксусной кислоты (ИУК, 0,5 мг/л) в комбинации с различными аналогами цитокинина: кинетином (от 0,5 мг/л до 4,0 мг/л), 6-бензиламинопурином (6-БАП, от 0,5 мг/л до 4,0 мг/л) или тидиазуроном (TDZ, от 10-4 М/л до 10-15 М/л). Пробирочные растения культивировали при температуре 20–24 °С и 16-часовом фотопериоде до 10 недель, еженедельно учитывали количество и размер листьев, количество и длину побегов, образование и длину корней. Все опыты повторяли три раза, в каждом опыте было от 5 до 15 биологических повторностей. Статистическую обработку проводили по стандартным биометрическим методам с использованием пакетов программ Microsoft Excel.

Анализ морфометрических данных показал, что при культивировании *Vanda hybrida* на среде МС с различными гормонами максимальный рост побегов был отмечен в варианте с использованием 0,5 мг/л ИУК и 2,5 мг/л кинетина, средний прирост составил 60,3 мм. Максимумы для 6-БАП и тидиазурона составили 47,8 и 26,7 мм соответственно.

При исследовании влияния регуляторов роста на листовую органогенез выяснили, что максимальное количество листьев и наибольшая их длина у ванды также были на среде с внесенным кинетином (2,5 мг/л) в совокупности с 0,5 мг/л ИУК, наибольшая длина листовой пластины составила 37,1 мм. На средах с другими регуляторами роста максимумы составили 17,8 мм (ИУК + 6-БАП) и 19 мм (ИУК + тидиазурон). При этом количество листьев было близким для всех вариантов сред — от 2,5 до 4 шт./растение.

Ризогенез *Vanda hybrida* слабо зависел от концентрации и вида РР. При использовании кинетина и 6-БАП совместно с ИУК существенных различий по количеству и длине корней не выявлено, максимальная длина корней составила 13 мм на среде МС с внесением 0,5 мг/л ИУК + 2,5 мг/л кинетина и 12,1 мм на среде с 0,5 мг/л ИУК и 3,0 мг/л 6-БАП. Для тидиазурона значения были несколько ниже.

Таким образом, внесенные в среду РР оказывают существенное влияние на формирование и рост побегов, корней и листьев растений ванды гибридной в культуре *in vitro*. Наиболее подходящим цитокинином является кинетин, позволяющий получить максимальные значения по ряду показателей органогенеза.

Efficacy of growth regulators in the clonal propagation of decorative orchids *in vitro*

Bolshakova E. V., Emelyanova I. S., Lukatkin A. S.

N. P. Ogarev Mordovia State University, 68 Bolshevistskaya st., 430005, Saransk, Russian Federation, tel.: +7(8342)32-25-23, fax: +7(8342)32-45-54

.....

Creation of highly ecologically environment is one of the most important problem of modern society. In this regard, more and more relevant and popular is the landscaping and phytodesign of home and office premises. Currently, in the practice of phytodesign, orchids are increasingly used, among which the *Vanda* genus is very popular. High decorative qualities, the original structure of the flower, complex and prolonged ontogenesis cause increased attention to orchid, as an object of special research.

An important factor for tissue differentiation and organogenesis in the cultivation of plants *in vitro* is the content and ratio in the medium of various plant growth regulators (PGRs). In this paper, we studied the patterns of the formation and growth of *Vanda* organs with different contents of PGRs in a nutrient medium.

The object of the study were *Vanda hybrida* plants obtained from the Laboratory of Cell Biotechnology of the Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of the Republic of Belarus. Clonally propagated plants were planted on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with indolylacetic acid (IAA, 0.5 mg/l) in combination with various cytokinin analogues: kinetin (from 0.5 to 4.0 mg/l), 6-benzylaminopurine (6-BAP, from 0.5 to 4.0 mg/l) or thidiazuron (TDZ, from 10⁻⁴ M/l to 10⁻¹⁵ M/l). Regenerated plants were cultivated at 20–24 °C and a 16-h photoperiod up to 10 weeks; the number and size of the leaves, the number and length of shoots, the rhizogenesis and length of the roots were taken weekly. All experiments were repeated three times, in each experiment there were from 5 to 15 biological replications. Statistical processing was carried out using standard biometric methods, using Microsoft Excel software packages.

Analysis of the morphometric data showed that when *Vanda hybrida* was cultured on MS medium supplemented with various PGRs, maximal shoot growth was noted in the variant using 0.5 mg/l IAA and 2.5 mg/l kinetin, the average increase being 60.3 mm. The maxima for 6-BAP and thidiazuron were 47.8 and 26.7 mm, respectively.

Investigation of PGRs effect on leaf organogenesis showed that the maximum number of leaves and their maximum length in *Vanda hybrida* were also on medium supplemented with kinetin (2.5 mg/l) and 0.5 mg/l IAA; the largest length of the leaf plate was 37.1 mm. On MS media with other PGRs, maxima were 17.8 mm (IAA + 6-BAP) and 19 mm (IAA + thidiazuron). In this case, the number of leaves was close to all variants of media, from 2.5 to 4 pieces/plant.

The rhizogenesis of *Vanda hybrida* was weakly dependent on the concentration and type of PGRs. In case of kinetin and 6-BAP, no significant differences in the number and length of the roots were detected, the maximum root lengths were 13 mm on MS medium supplemented with 0.5 mg/l IAA + 2.5 mg/l kinetin and 12.1 mm on medium supplemented with 0.5 mg/l IAA and 3.0 mg/l 6-BAP. In case of thidiazuron, the rhizogenesis values were somewhat lower.

Thus, addition of PGRs in MS medium have a significant effect on the formation and growth of shoots, roots and leaves in *Vanda hybrida* plants in *in vitro* culture. The most suitable cytokinin is kinetin, which allows obtaining maximum values for most parameters of organogenesis.

Культивирование *in vitro* тополя *Populus pseudo-cathayana* × *Populus deltoides* Barry cv. *Shan Hai Guan* в Центральном ботаническом саду НАН Беларуси

Брель Н. Г., Чижик О. В.

Центральный ботанический сад НАН Беларуси, ул. Сурганова, 2 в, Минск, 220012, Беларусь,
тел./факс: +375(17)284-14-84, e-mail: tilia004@gmail.com

В *in vitro* коллекции отдела биохимии и биотехнологии Центрального ботанического сада НАН Беларуси содержится ряд высокодекоративных и хозяйственно-ценных растений, среди которых гибрид тополя *Populus pseudo-cathayana* × *P. deltoides* Barry cv. *Shan Hai Guan*. Данный клон получен в Китае (КНР) в результате гибридизации *Populus pseudo-cathayana* × *Populus deltoides* Barry, он отличается высокими темпами роста, легкостью вегетативного размножения, устойчивостью к засухе и избытку влаги, к засоленности почвы и насекомым вредителям, а также высоким качеством древесины, и может являться перспективным источником сырья для энергетики и целлюлозно-бумажной промышленности, а также посадочным материалом для озеленения и лесозащитных полос.

Асептическая культура тополя была получена путем индукции пазушных почек на среде Murasige and Skoog (MS) с добавлением гиббереллиновой кислоты и 3% сахарозы. На этапе микроразмножения была использована среда MS с добавлением 0,5 мг/л бензиламинопурина (БАП) и 0,1 мг/л индолилуксусной кислоты (ИУК). На указанной среде коэффициент размножения был достаточно высоким и варьировал в интервале 3,5–4,5. На протяжении 7 месяцев мы смогли увеличить количество *in vitro* растений от нескольких десятков в феврале 2018 года до 1800 в августе. Тем не менее, следует отметить, что концентрация цитокинина 0,5 мг/л оказала негативное влияние на растения в стерильных условиях, которое проявилось в высокой степени обводненности побегов и часто их общей деформации. С целью избежать витрификации *in vitro* культура тополя была помещена на среду MS без добавления гормонов, содержащую 3% сахарозы и 5–10 г/л активированного угля. Через три недели мы заметили, что на указанной питательной среде растения имели крупные листья и достаточно длинные междоузлия, что благоприятно для черенкования побегов. Также было отмечено, что коэффициент размножения практически такой же, как и на средах с добавлением БАП, но без избыточной обводненности тканей.

Наблюдая рост тополя *in vitro* на среде MS с активированным углем, мы решили изучить развитие растений и на средах без упомянутого компонента, и на данном этапе можем сказать, что визуально растения не отличаются в своем развитии на обоих вариантах сред. Кроме того, мы заметили, что исследуемый клон тополя отличается повышенным корнеобразованием на всех используемых ранее вариантах питательных сред и не нуждается в дополнительном этапе укоренения.

Таким образом, мы пришли к выводу, что оптимальной средой для микроразмножения *Populus pseudo-cathayana* × *P. deltoides* Barry cv. *Shan Hai Guan* в условиях *in vitro* является среда MS, содержащая 3% сахарозы, 5–10 г/л активированного угля, и не более 0,2 мг/л БАП.

Cultivation *in vitro* of poplar *Populus pseudo-cathayana* × *Populus deltoides* Barry cv. *Shan Hai Guan* in the Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus

Brel N. G., Chizhik O. V.

Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, 2v Surganova st., 220012, Minsk, Republic of Belarus, tel./fax: +375(17)284-14-84, e-mail: tilia004@gmail.com

.....

In vitro collections of the Department of Biochemistry and Biotechnology of the Central Botanical Garden of the NAS of Belarus contain a number of highly decorative and economically valuable plants, including *Populus pseudo-cathayana* poplar hybrid *P. deltoides* Barry cv. *Shan Hai Guan*. This clone is obtained in China by the hybridization of *Populus pseudo-cathayana* × *Populus deltoides* Barry, it is characterized by high growth rates, ease of vegetative propagation, resistance to drought and excess moisture, salinity and insect pests, and high quality of wood. It can be a promising source of raw materials for energy and the pulp and paper industry, as well as planting material for gardening and forest shelter belts.

Aseptic culture of the poplar was obtained by induction of axillary buds on Murasige and Skoog (MS) medium supplemented with the gibberellic acid and 3% sucrose. At the micropropagation stage we used MS medium with the addition of 0.5 mg/l benzylaminopurine (BAP) and 0.1 mg/l indolylacetic acid (IAA). On this medium the multiplication factor was quite high and varied in the range 3.5–4.5. For 7 months the number of *in vitro* plants was increased from several dozens in February 2018 to 1800 in August. Nevertheless, it should be noted that the concentration of cytokinin 0.5 mg/l had a negative effect on plants such as a high degree of vitrification of the shoots and often their general deformation. In order to avoid *in vitro* vitrification, the aseptic culture of poplar was placed on MS medium without hormones, containing 3% sucrose and 5–10 g/l activated carbon. After three weeks, we noticed that on this nutrient medium the plants had large leaves and long internodes, which was favorable for cutting. We also noted that the multiplication factor is almost the same as in the media with the addition of BAP, but without excessive water in the plant tissues.

We also decided to compare the development of plants on MS media supplemented with activated carbon and on MS medium without addition of this component. At this stage we can say that visually the plants do not differ significantly in both variants of media. In addition, we noticed that the studied clone of the poplar is distinguished by an increased root formation on all previously used variants of nutrient media and does not require an additional stage of rooting.

Thus, we came to the conclusion that the optimal medium for micropropagation *Populus pseudo-cathayana* × *R. deltoides* Barry cv. *Shan Hai Guan in vitro* is MS medium containing 3% sucrose, 5–10 g/l activated carbon and not more than 0.2 mg/l BAP.

Введение в культуру *in vitro* редкого вида *Gentiana cruciata* L.

Вайновская И. Ф., Чижик О. В., Власова А. Б., Спиридович Е. В.

Центральный ботанический сад НАН Беларуси, ул. Сурганова, 2 в, Минск, 220012, Беларусь,
тел./факс: +375(17)284-17-47, e-mail: ilonavain@mail.ru

Происходящее в настоящее время обеднение генофонда растений приводит к нарушению функционирования природных экосистем. Наиболее перспективным направлением в решении проблемы сохранения генофонда и биоразнообразия является применение биотехнологических методов, в частности, сохранение редких и исчезающих видов растений в культуре *in vitro*. Цель исследования — разработка методов введения в культуру ткани и культивирования *in vitro* охраняемого вида *Gentiana cruciata* L. (горечавки крестовидной). Вид занесен в 1-е и 2-е издания Красной книги Беларуси (1981, 1993). Категория охраны: 1.

Эксплантами служили семена *Gentiana cruciata* L., собранные сотрудниками отдела биохимии и биотехнологии растений в Мядельском р-не (окрестности оз. Нарочь), где найдена природная популяция горечавки. Опыты показали, что при хранении семян при пониженной температуре (от -5°C до $+5^{\circ}\text{C}$), сохраняется всхожесть и ускоряется прорастание. Стерилизацию проводили по следующей схеме: замачивали в воде (60 мин.); переносили в раствор детергента — 15 мин.; отмывали под проточной водой 10 мин.; замачивали в растворе фунгицида «Прозаро» (15 мин.); отмывали стерильной дистиллированной водой; подвергали воздействию стерилизующих агентов; промывали стерильной дистиллированной водой в несколько смен. Комбинации стерилизующих агентов: 70 % этанол (1 мин.) + 0,1 % диацид (10 мин.); 70 % этанол (1 мин.) + 3 % H_2O_2 (15 мин.); 70 % этанол (1 мин.) + 0,01 % AgNO_3 (15 мин.). Применяемые нами схемы стерилизации по-разному влияли на жизнеспособность семян и последующее развитие проростков. Максимального числа жизнеспособных и минимального числа инфицированных семян удалось достичь при использовании комбинации стерилизующих растворов, а именно при последовательном выдерживании семян в 70 % этаноле (1 мин.) и 0,01 %-м растворе нитрата серебра (15 мин.).

После стерилизации семена для прорастания помещали на питательную среду по Мурасиге-Скута без регуляторов роста, содержащую: инозит — 100 мг/л, тиамин- HCl — 1 мг/л, никотиновую кислоту — 1 мг/л, пиридоксин- HCl — 1 мг/л, сахарозу — 2 %, агар — 0,8 %; рН среды 5,8. В целом, всхожесть семян *Gentiana cruciata* L. по сравнению с другими видами довольно низкая. Семена после стерилизации прорастали на среде культивирования через 45–50 дней.

Во втором пассаже использовали модифицированные питательные среды, дополненные витаминами и регуляторами роста (6-БАП, ИУК). Культивирование проводили при температуре 22–24 $^{\circ}\text{C}$, длине дня — 16 часов, освещенности — 4000 люкс (лампы Floga). Скорость роста полученных молодых растений была относительно низкой. Высоты 25–35 мм они достигали через 60 дней. В этом возрасте они имели в среднем 8–10 нормально развитых листьев. Все проростки, которые культивировали на питательной среде, дополненной регуляторами роста, были использованы в дальнейшем для микрочеренкования. Использование методов культуры ткани является оптимальным решением задачи как для размножения видов с затрудненным размножением *in situ* и *ex situ*, так и при массовом производстве ценных генотипов растений из коллекций ботанических садов.

Introduction to a culture *in vitro* of a rare species of *Gentiana cruciata* L.

Vainovskaya I. F., Chizhik O. V., Vlasava N. B., Spiridovich E. V.

Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, 2v Surganova st., 220012,
Minsk, Republic of Belarus, tel.: +375(17)284-14-74, fax: +375(17)284-14-64, e-mail: ilonavain@mail.ru

.....

The present depletion of the gene pool of plants leads to a disruption of the functioning of natural ecosystems. The most promising direction in solving the problem of preserving the gene pool and biodiversity is the use of biotechnological methods, in particular, the conservation of rare and endangered plant species in culture *in vitro*. The aim of the work is to develop methods for introducing into the tissue culture and *in vitro* cultivation of the protected species *Gentiana cruciata* L. The species is listed in the 1st and 2nd editions of the Red Book of Belarus (1981, 1993). Protection category: 1.

Explorers were seeds of *Gentiana cruciata* L., collected by employees of the Department of Biochemistry and Biotechnology of Plants in Myadel District (near Lake Naroch), where a natural population of gentian was found. Experiments have shown that when seeds are stored at a low temperature (–50°C to +5°C) germination is maintained and germination is accelerated. Sterilization was carried out according to the following scheme: soaked in water (60 min.); transferred to detergent solution — 15 minutes; washed under running water for 10 minutes; soaked in a solution of fungicide “Prozaro” (15 min); washed with sterile distilled water; sterilizing agents; washed with sterile distilled water in several shifts. Combinations of sterilizing agents: 70 % ethanol (1 min.) + 0.1 % diacid (10 min.); 70 % ethanol (1 min.) + 3 % H₂O₂ (15 min.); 70 % ethanol (1 min.) + 0.01 % AgNO₃ (15 min.). The sterilization regimens used by us had different effects on the viability of the seeds and the subsequent development of seedlings. The maximum number of viable and the minimum number of infected seeds was achieved by using a combination of sterilizing solutions, namely, by successively maintaining the seeds in 70 % ethanol (1 min.) and 0.01 % silver nitrate solution (15 min).

After sterilization, seeds for germination were placed on a nutrient medium according to Murashige, Skoog without growth regulators, containing: inositol 100 mg/l, thiamine-HCl 1 mg/l, nicotinic acid 1 mg/l, pyridoxine HCl 1 mg/l, sucrose — 2 %, agar — 0.8 %; pH of the medium is 5.8. In general, the germination capacity of *Gentiana cruciata* L. seeds is rather low compared to other species. Seeds after sterilization sprouted on culture medium after 45–50 days.

In the second passage, modified nutrient media supplemented with vitamins and growth regulators (6-BAP, IAA) was used. The cultivation was carried out at a temperature of 22–24 °C, the length of the day was 16 hours, and the illumination level was 4000 lux (Flora lamps). The growth rate of the young plants obtained was relatively low. They reached heights of 25–35 mm in 60 days. At this age, they had an average of 8–10 normally developed leaves. All sprouts that were cultured on a nutrient medium supplemented with growth regulators were subsequently used for micro-engraving. The use of tissue culture methods is the optimal solution of the problem both for reproduction of species with difficult reproduction *in situ* and *ex situ*, and for mass production of valuable plant genotypes from botanical garden collections.

Молекулярно-биохимические особенности гаплоидных регенерантов сахарной свёклы

Васильченко Е. Н., Колесникова Е. О., Жужжалова Т. П.

Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свёклы и сахара
им. А. Л. Мазлумова, пос. ВНИИСС, д. 86, Рамонский район, Воронежская область, Россия,
e-mail: biotechnologiya@mail.ru

Традиционные методы селекции, являющиеся слишком длительными, могут дополняться современными биотехнологическими методами. Метод культивирования репродуктивных органов с возможностью массового получения гаплоидных растений, открывает новые возможности для селекции. Благодаря генетической однородности линий удвоенных гаплоидов представляется возможным уже в течение 1–2 лет получать гомозиготный практически по всем генам селекционный материал, тем самым продлевая период его эксплуатации в производстве. В настоящее время подобная технология имеет ряд ограничений из-за низкого выхода гаплоидных регенерантов. Большое значение в регуляции процесса активации мегагамет играет консистенция и состав питательных сред для культивирования изолированных семязачатков сахарной свёклы, первоначальная оценка морфологических признаков, исследование полиморфизма изоферментных спектров, использование ДНК-маркеров для выделения гаплоидных регенерантов сахарной свёклы на заданный селекционный признак. В результате экспериментальных исследований установлено, что прекультивирование неоплодотворенных семязачатков на питательной среде жидкой консистенции активизирует процесс пролиферации ядер и клеток женского гаметофита, а при переносе на агаризованную среду стимулирует формирование растений-регенерантов в среднем до 6,7%. Индуцируемые растения различаются по морфологическим признакам: окраске и форме листовых пластинок, длине и окраске черешка, высоте растений. Гаплоидные регенеранты фенотипически отличаются от диплоидных форм меньшей высотой и размером всех органов. Проведение отбора позволяет выделить нормально развитые гаплоидные формы, которые в зависимости от генотипа, имеют более узкие листовые пластинки с длинными черешками или, наоборот, широкие листья с волнистым краем, но короткими черешками. Цитофотометрический анализ уровня пloidности позволяет идентифицировать на ранних этапах гаплоидные растения-регенеранты, отбирать и формировать линии сахарной свёклы с одинарным ($n=9$) набором хромосом в культуре *in vitro*. Путем чередования питательных сред (безгормональная и ростовая) проводят отбор жизнеспособных регенерантов. Стабилизирующий отбор нормально развитых гаплоидных растений-регенерантов обеспечивает выравнивание материала по морфологическим признакам и высокую способность к формированию адвентивных побегов. Биохимическая оценка обнаруживает различия распределения изоформ фермента 1- и 2- эстеразы (α - и β -эстераза), свидетельствующие о разной регуляции активности генов при клеточной дифференцировке гаплоидных регенерантов сахарной свёклы. Молекулярно-генетические исследования с использованием секвенирования амплифицированных фрагментов ДНК сахарной свёклы позволяют генотипировать гаплоидные регенеранты по стерильному и фертильному типам цитоплазмы. Проведенные исследования дают возможность проводить целенаправленный отбор регенерантов по генотипическим признакам на гаплоидном уровне. Применение методов культуры изолированных органов, клеток и тканей способствует получению генетически улучшенного селекционного материала. Гомозиготные линии, отличающиеся важнейшими ценными признаками, являются перспективным исходным материалом для селекции.

Molecular-biochemical features of sugar beet haploid regenerants

Vasilchenko E. N., Kolesnikova E. O., Zhuzhhalova T. P.

The A. L. Mazlumov All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar, 86 VNIISS, 396030, Ramonsky district, Voronezh region, Russian Federation, e-mail: biotechnologiya@mail.ru

.....

Traditional breeding methods which are too much time-consuming can be supplemented with modern biotechnological methods. The reproductive organs' cultivation method with possibility of mass obtaining of haploid plants gives new possibilities for breeding. Due to genetic homogeneity of doubled haploid lines, it seems possible to obtain practically homozygous for all genes breeding material within 1–2 years, thus prolonging period of its using in production. At present, such technology has a number of limitations because of low output of haploid regenerants. Consistence and composition of nutrient media for cultivation of isolated sugar beet ovules, initial estimation of morphological traits, study of isozyme spectra polymorphism, and use of DNA-markers to reveal sugar beet haploid regenerants according to a specified breeding trait are of great importance for / regulation of megagametes activation process. As a result of experimental studies, it has been determined that pre-cultivation of unfertilized ovules on a nutrient medium of liquid consistence makes the proliferation process of female gametophyte nuclei and cells more active and, when transferred to agar medium, stimulates formation of plants-regenerants up to 6.7% on average. The induced plants differ in morphological traits: colour and form of leaf blades, petiole length and colour, height of plants. Haploid regenerants differ phenotypically from diploid forms by less height and size of all organs. Selection carrying out allows revealing normally developed haploid forms which, depending on a genotype, have more narrow leaf blades with long petioles or, on the contrary, wide leaves with wavy edge, but short petioles. Cytophotometry analysis of ploidy level enables identification of plants-regenerants at early stages, and selection and formation of sugar beet lines with a single ($n=9$) chromosome set under *in vitro* culture. Viable regenerants are selected by alternation of nutrient media (no hormone-containing and growth ones). Stabilising selection of normally developed haploid plants-regenerants provides uniformity of the material according morphological traits and high ability to form adventive shoots. Biochemical evaluation reveals differences in distribution of 1- and 2-esterase (α - and β -esterase) enzyme isoforms that are indicative of different activity regulation of genes during cell differentiation of sugar beet haploid regenerants. Molecular-genetic studies using sequencing of sugar beet amplified DNA fragments allow haploid regenerants' genotyping according to sterile and fertile cytoplasm types. The conducted investigations enable a purposeful selection of regenerants according to genotype traits at haploid level. Using methods of isolated organs, cells and tissue culture promotes genetically improves breeding material obtaining. Homozygous lines notable for most important valuable traits are a perspective starting material for breeding.

Фитохимическое исследование биотехнологического сырья *Potentilla longifolia* Willd.

Вдовина Н. С., Тихомирова Л. И.

Алтайский государственный университет, пр-т Ленина, 61, Барнаул, 656049, Россия,
факс: +7(3852)667-626, тел.: +7(3852)291-291, e-mail: natalya.vdovina.95@mail.ru

Согласно данным А. И. Шретера (1975), корневища *Potentilla longifolia* Willd. (лапчатки длиннолистной) использовали в русской народной медицине в качестве вяжущего, кровоостанавливающего и желудочного средства, при цинге, поносе, дизентерии. Отвар травы употребляли в качестве седативного средства, а также при опущении матки. Толченую траву прикладывали к ранам для их заживления. Цветки и корни в виде настоя и отвара применяют в тибетской медицине при желудочно-кишечных заболеваниях, туберкулезе легких и атеросклерозе. Настой травы употребляют в виде втираний при ревматизме и простудных заболеваниях.

Растения-регенеранты *P. longifolia* получали в Отделе биотехнологии Южно-Сибирского ботанического сада Алтайского государственного университета. В качестве эксплантов использовали семена из коллекции ботанического сада. Для размножения побегов готовили питательные среды на минеральной основе Мурасиге-Скуга, содержащие 1 мкМ К (кинетин), 0,5 мкМ ИМК (индолил-3-масляная кислота) и 0,05 мкМ ГК (гиберелловая кислота). Укореняли на средах с 1,0 мкМ ИМК. Адаптацию и выращивание сырья проводили в гидропонной установке типа Минивит.

Качественный и количественный анализ сырья *P. longifolia* проводили в соответствии с методическими рекомендациями Р. А. Музычкиной и коллег (2011). Были выявлены алкалоиды, антраценовые производные, гликозиды, дубильные вещества, ксантоны, фенольные соединения и сумма флавоноидов.

Таблица 1. Количественное определение флавоноидов

№	Навеска	Оптическая плотность	x_i	$(x_i - \bar{x})$	$(x_i - \bar{x})^2$	Метрологические характеристики
1	1,0108	0,1889	2,301	0,469	0,219	$S = 0,326$ $S_{\bar{x}} = 0,132$ $\Delta x = \pm 0,7$ $\varepsilon = 4,8\%$
2	1,0020	0,2500	3,072	0,302	0,091	
3	1,0007	0,2205	2,713	0,057	0,003	
4	1,0005	0,2079	2,559	0,211	0,044	
5	1,0050	0,2600	3,186	0,416	0,173	
Среднее значение x_p , %			2,77			
Среднее значение $\Sigma(x_i - \bar{x})^2$				0,53		

Стандартное отклонение $S=0,326$.

Ошибка выборочной средней (абсолютная погрешность) $S_{\bar{x}}=0,132$.

Относительная ошибка выборочной средней (относительная погрешность) $0,132/2,77 \times 100 = 4,8\%$.

95% — доверительный интервал для среднего значения совокупности $2,77 \pm 2,57 \times 0,132 = 2,9 \pm 0,7$.

Методы биотехнологии позволяют получить качественное лекарственное растительное сырье в короткие сроки, в большом количестве не уничтожая природные запасы.

Phytochemical research of biotechnological raw materials *Potentilla longifolia* Willd.

Vdovina N. S., Tikhomirova L. I.

Altai State University, 61 Lenin ave., 656049, Barnaul, Russian Federation,
fax: +7(3852)667-626, tel.: +7(3852)21-291, e-mail: natalya.vdovina.95@mail.ru

According to the data of Al Shreter (1975), the potential *Potentilla longifolia* Willd. (lapchatka dlinolistnoy) used in Russian folk medicine as an astringent, hemostatic and gastric remedy, with scurvy, diarrhea, dysentery. Decoction of herbs used as a sedative, as well as with the omission of the uterus. The crushed grass was applied to the wounds for their healing. Flowers and roots in the form of infusion and broth are used in Tibetan medicine for gastrointestinal diseases, pulmonary tuberculosis and atherosclerosis. Herb infusion is used in the form of rubbing for rheumatism and colds.

Plants-regenerants *P. longifolia* received in the Department of Biotechnology of the South Siberian Botanical Garden, Altai State University. As explants used seeds from the botanical garden collection. Murasige-Skuga mineral nutrient media containing 1 μM K (kinetin), 0.5 μM IMC (indolyl-3-butyric acid) and 0.05 μM HA (gibberic acid) were prepared for the propagation of shoots. Rooted in media with 1.0 μM IMC. Adaptation and growing of raw materials were carried out in a hydroponic installation of the Minivit type. Qualitative and quantitative analysis of *P. longifolia* raw materials was carried out in accordance with the methodological recommendations of RA. Muzychkina and colleagues (2011). Alkaloids, anthracene derivatives, glycosides, tannins, xanthones, phenolic compounds and the sum of flavonoids have been identified.

Table 1. Quantitative determination of flavonoids

№	Навеска	Оптическая плотность	x_i	$(x_i - \bar{x})$	$(x_i - \bar{x})^2$	Метрологические характеристики
1	1,0108	0,1889	2,301	0,469	0,219	S = 0,326 $S_{\bar{x}} = 0,132$ $\Delta x = \pm 0,7$ $\varepsilon = 4,8\%$
2	1,0020	0,2500	3,072	0,302	0,091	
3	1,0007	0,2205	2,713	0,057	0,003	
4	1,0005	0,2079	2,559	0,211	0,044	
5	1,0050	0,2600	3,186	0,416	0,173	
Среднее значение $x, \%$			2,77			
Среднее значение $\Sigma(x_i - \bar{x})^2$				0,53		

Methods of biotechnology make it possible to obtain high-quality medicinal plant raw materials in a short time, in large quantities without destroying natural reserves.

Сравнительная характеристика морфогенеза трансформированных и исходной линий табака *in vitro*

Ведяшкина О. А., Лукаткин А. С.

Национальный исследовательский Мордовский государственный университет
им. Н. П. Огарева, ул. Большевикская, 68, Саранск, 430005, Россия,
тел.: +7(8342)32-25-23, факс +7(8342)32-45-54

На современном этапе развития науки трансформированные линии растений представляют собой удобный объект для изучения реакции на стрессовые воздействия. Изменение экспрессии какого-либо гена или введение извне чужеродных генов позволяет более детально выяснить особенности метаболизма, обусловленные этими генами, в условиях неблагоприятных внешних воздействий. Для оценки влияния абиотических факторов необходимо детальное понимание морфологических, физиологических и биохимических особенностей (в отличие от исходной линии — Wild type, Wt) трансформированных линий. В настоящее время известно много линий табака (*Nicotiana tabacum* L.), трансформированных по различным генам. Так, во ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии создано несколько линий, экспрессирующих Fe-СОД из *Arabidopsis thaliana* (преимущественно хлоропластной локализации), и показано, что интродукция гена Fe-СОД повышает стабильность фотосинтетического аппарата при действии окислительного стресса. Трансгенные растения табака имели измененную ультраструктуру клеточных компартментов (хлоропластов), повышенную активность СОД по сравнению с Wt-растениями (Baranova et al., 2010). В Ягеллонском университете (Краков, Польша) проведена трансформация табака (*Nicotiana tabacum* L.) сорта 'Самсун' с использованием штамма LVA 4404 *Agrobacterium tumefaciens*, содержащего бинарную плазмиду pBI 121, в которую введен ген, кодирующий слитый белок, состоящий из усеченного человеческого пластина и smGFP (пластин-GFP), под контролем промотора 35S вируса мозаики цветной капусты. Посредством такой трансформации стала возможной визуализация актинового цитоскелета, изменяющегося при различных воздействиях (Anielska-Mazur et al., 2009).

Целью данного исследования было сравнительное изучение морфогенеза Wt-линии табака (*Nicotiana tabacum* L., сорт 'Самсун') и нескольких трансформированных линий, культивируемых *in vitro*. В работе использовали линию 6214, стабильно экспрессирующую пластин-GFP (семена растений были получены из Малопольского центра биотехнологии, Краков, Польша) и введенную в культуру *in vitro*, а также пробирочные растения линий 29 и 3, сверхэкспрессирующие Fe-СОД (получены из ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии). Клонально размножаемые растения высаживали на агаризованные среды Мурасиге-Скуга (МС) и культивировали при температуре 20–24 °С и 16-часовом фотопериоде до 4 недель, еженедельно учитывая длину побега, корней, количество листьев и узлов. Статистическую обработку проводили по стандартным биометрическим методам, с использованием пакетов программ Microsoft Excel.

Анализ морфометрических данных показал, что растения-регенеранты табака (как Wt, так и трансформанты), выращенные из разных частей растений (апикальной, средней и базальной), проявляли существенные различия по скорости роста побега, более интенсивный рост наблюдался у регенерантов из апикальной зоны. Самый слабый органогенез и рост выявлен у растений, сформированных из базальных участков побега. Сравнение морфогенеза у Wt и трансформированных линий показало, что побегообразование и ризогенез лучше протекали у Wt-линии табака; существенной разницы по количеству листьев и узлов между Wt и трансформированными линиями не наблюдалось. Все трансформированные линии (6214, 29 и 3) проявляли сходную динамику изменений ростовых параметров и органогенеза при культивировании *in vitro*. Поскольку габитус и морфогенез трансформированных линий не отличался значительно от Wt-растений, их можно использовать при оценке устойчивости.

Comparative morphogenesis characteristics of transformed and Wild type tobacco lines *in vitro*

Vedyashkina O. A., Lukatkin A. S.

N. P. Ogarev Mordovia State University, 68 Bolshevistskaya st., 430005, Saransk, Russian Federation, tel.: +7(8342)32-25-23, fax: +7(8342)32-45-54

.....

At present, the transformed plant lines are a suitable object of studying the stress reactions of plants. Changes in the expression of a gene or the introduction of alien genes from outside makes it possible to clarify in more detail the metabolic patterns caused by these genes under harmful effects. To assess the influence of abiotic factors, a detailed understanding of the morphological, physiological and biochemical features of the transformed lines is necessary (in contrast to the original line — Wild type, Wt). At present, there are many tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) lines which are transformed with various genes. For example, several lines expressing Fe-SOD from *Arabidopsis thaliana* (predominantly chloroplast localization) have been created at All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, and it has been shown that Fe-SOD gene introduction increases the photosynthetic apparatus stability under oxidative stress. Transgenic tobacco plants had a modified ultrastructure of cellular compartments (chloroplasts), increased SOD activity compared to Wt plants (Baranova et al., 2010). In the Jagiellonian University (Krakow, Poland), a tobacco (*Nicotiana tabacum* L. ecotype 'Samsun') transformation was carried out using the strain LBA 4404 *Agrobacterium tumefaciens* containing the binary plasmid pBI 121 carried a gene coding for a fusion protein consisting of truncated human plastin and smGFP (plastin-GFP) under the control of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. Through this transformation, it became possible to visualize the actin cytoskeleton, which varies at different impacts (Anielska-Mazur et al., 2009).

The aim of this work was a comparative study of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) morphogenesis of Wt line ('Samsun') and several transformed lines cultivated *in vitro*. The line 6214 stably expressing plastin-GFP (seeds were obtained from the Małopolska Biotechnology Center, Kraków, Poland) was introduced in *in vitro* culture. Test tubes with tobacco plants of lines 29 and 3 expressing Fe-SOD from *Arabidopsis thaliana* were obtained from the All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology. Clonal propagated plants were planted on Murashige and Skoog (MC) agarized media and cultivated at 20–24°C and 16-hour photoperiod up to 4 weeks, weekly considering the length of shoot, roots, number of leaves and nodes. Statistical processing was carried out using standard biometric methods, with Microsoft Excel software packages.

Analysis of the morphometric data showed that the regenerated tobacco plants (both Wt and transformants) grown from different parts of the plants (apical, middle and basal) exhibited significant differences in shoot growth rate. More intensive shoot growth was observed in regenerants from the apical explants. The weakest organogenesis and growth was found in plants formed from the basal shoot explants. A comparison of morphogenesis in Wt and transformed lines showed that shoot formation and rhizogenesis were better in the Wt line of tobacco. There was no significant difference in the leaves and nodes number between Wt and transformed lines. All the transformed lines (6214, 29 and 3) exhibited a similar dynamics of growth parameters and organogenesis during *in vitro* cultivation. Since the habitus and morphogenesis of the transformed lines did not differ significantly from Wt plants, they can be used in assessing stress resistance.

Ассортимент древесных интродуцентов для микроклонального размножения в ЦБС НАН Беларуси

Веевник А. А., Гаранович И. М., Шпитальная Т. В.

Центральный ботанический сад НАН Беларуси, ул. Сурганова, 2 в, Минск, 220012, Беларусь,
тел.: +375(17)284-15-91, e-mail: bel.dendr@gmail.com

В целях массового производства декоративных растений на коммерческой основе в ЦБС НАН Беларуси создан и функционирует Центр микроклонального размножения растений. Существующие методы и технологии позволяют выращивать широкий набор видов и культиваров древесных растений. Преимущества имеют таксоны наиболее востребованные в плодоводстве и декоративном садоводстве. Учитывается также гарантированная возможность их массовой репродукции.

Основной культурой является голубика высокая. Очень популярное ныне плодое растение, востребованное как любительским, так и промышленным садоводством. Интродуцировано довольно много ее сортов, отличающихся сроками созревания, биохимическим составом и массой плодов. В настоящее время потребности в саженцах практически не ограничены.

Второй по значимости в наших условиях мы бы поставили сирень. Чрезвычайно любимый народом красивоцветущий кустарник. Черенкованием размножается плохо, прививки трудоемки. Имеется богатый генофонд: сорта мировой селекции, военной тематики, собственной селекции.

Несмотря на хорошую укореняемость черенков актинидии, микроклональное ее размножение достаточно актуально из-за большого спроса в любительском садоводстве и озеленении. Существует достаточно много сортов актинидии коломыкты, острой, полигамной с крупными плодами и высокими вкусовыми качествами. Как лиана актинидия очень востребована в озеленении, так как в условиях Беларуси лиан крайне мало.

Что касается таких культур, как гортензия и чубушник, то их значимость для зеленого строительства трудно переоценить. Они отличаются большим разнообразием сортов, формы цветков и соцветий, их окраски, габитусом, длительностью цветения, сочетаемостью в групповых посадках и т. д., что обеспечивает им ведущую роль среди красивоцветущих кустарников, посадочного материала которых в настоящее время недостаточно.

Зеленое строительство недостаточно обеспечено посадочным материалом липы, особенно ее культиваров.

Лимонник китайский востребован как лекарственное растение широкого спектра действия и как декоративная лиана. Другие способы его репродукции не успешны или затруднены.

Несомненно важную роль в ассортименте размножаемых *in vitro* растений занимает жимолость съедобная, первая по срокам созревания в наших условиях ягодная культура. Интродуцировано большое количество ее сортов: 'Ленинградский великан', 'Морена', 'Нимфа', 'Голубое веретено' и другие, пользующихся огромным спросом у садоводов-любителей.

Планируется по аналогии с малиной садовой освоить производство посадочного материала малины душистой и других видов для целей зеленого строительства.

Отдельную группу популярных культур занимают розы и рододендроны. Их производство освоено в других структурных подразделениях Сада.

Указанные растения, конечно, не ограничивают ассортимент древесных растений в культуре *in vitro*. Он будет постоянно обновляться и увеличиваться в соответствии со структурой спроса и потребностями рынка.

An assortment of wood introducents for microclonal propagation in the CBG of the NAS of Belarus

Veevnik A. A., Garanovich I. M., Shpitalnaya T. V.

Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, 2v Surganova st., 220012, Minsk, Republic of Belarus, tel.:+375(17)284-15-91, e-mail: bel.dendr@gmail.com

.....

With an aim of mass production of ornamental plants on a commercial basis the Central Botanical garden (CBG) of the National Academy of Science (NAS) of Belarus has created a Biotechnological complex of plant clonal micropropagation. The existing methods and technologies let us grow a wide spectrum of species and cultivars of wood plants. Priority is given to taxa which are most demanded in pomiculture and ornamental horticulture.

The main culture at the initial stage of the period of reaching a projected production capacity of the biotechcomplex is *Vaccinium corymbosum* L., a very popular fruit plant which is in demand both in amateur and commercial horticulture. There are 60 sorts of *Vaccinium corymbosum* L. tested in the collection of the CBG which vary in period of ripening, biochemical composition and fruit weight. 16 of them are included in the State Sorts Register of the Republic of Belarus. At present there is a great need for certified planting material of *Vaccinium corymbosum* L.

Lilac is the second important culture in our conditions. It is a beautiful flowering shrub very much liked by the people. It is badly propagated by cuttings, while ingraftings are labour-consuming. There is a rich genofond of lilac: sorts of world selection, sorts of our selection, sorts dedicated to the military.

A promising culture for industrial production of marketable berries is some species of *Actinidia*. In spite of a good rooting ability of its cuttings microclonal propagation is quite topical due to a great demand in amateur horticulture and landscape gardening. There is quite a lot of sorts of *Actinidia kolomicta*, *arguta*, *polygama* with big fruits and good taste qualities. As a climbing plant it is highly demanded in landscape gardening.

As for such cultures as *Hydrangea* and *Philadelphus* their importance for landscape gardening can't be overestimated. They are characterized by a great diversity of sorts, shapes of flowers and inflorescences, colour, habitus, length of blossoming, compatibility in group plantings etc., which gives them a leading role among beautifully blooming shrubs. Their planting stock is not enough.

Landscape gardening also lacks planting stock of linden, especially its cultivars.

Shizandra chinensis (Turcz) Baill. is in demand as a medicinal plant of a wide spectrum of effect as well as an ornamental climber.

An important role in the assortment of plants which are propagated *in vitro* is played by *Lonicera edulis* Turch. ex Freyn which is the first culture in terms of ripening in our conditions. A lot of its sorts have been introduced: 'Leningradsky velikan', 'Morena', 'Nympha', 'Goluboye vereteno' and others which are in great demand.

On the analogy with *Rubus idaeus* L. there are plans to start production of planting stock of *Rubus odoratus* L. and other species for landscape gardening.

Another popular group of plants is roses and rhododendrons. They are produced by other departments of the Botanical Garden.

Of course, the assortment of wood plants in *in vitro* culture is not limited by the mentioned plants. It will be constantly renewed and expanded depending on the structure of demand and market requirements.

Генерация цитоплазматических Ca^{2+} -сигналов и изменение ростовых процессов под действием экзогенного аскорбата в корнях проростков *Arabidopsis thaliana* L. Heynh., культивируемых *in vitro*

Войтехович М. А., Гриусевич П. В., Новосельский И. Ю., Самохина В. В., Демидчик В. В.

Белорусский государственный университет, биологический факультет, кафедра клеточной биологии и биоинженерии растений, ул. Курчатова, 10, Минск, 220030, Беларусь, тел.: +375(17)209-59-12, факс: +375(17)209-58-08, e-mail: dzemidchyk@bsu.by

L-аскорбиновая кислота (L-аскорбат или аскорбат) — ключевой антиоксидант растительной клетки, вовлеченный в цикл Фойер-Халливера-Асада и обеспечивающий детоксикацию H_2O_2 во всех клеточных компартментах. Аскорбат представлен и во внеклеточном пространстве. Однако его роль в этом компартменте малоизучена. Концентрация аскорбата в апопласте 0,1–1 ммоль/л, что значительно ниже, чем в цитоплазме (10–20 ммоль/л). Пероксидазные и оксидазные системы устраняют аскорбат из апопласта, переводя его в форму дегидроаскорбата, который транспортируется внутрь клетки при помощи активных систем. Аскорбат может быть вовлечен в генерацию гидроксильных радикалов в клеточной стенке в результате реакций со связанными в ней переходными металлами, в частности, Cu^{2+} и Fe^{3+} . Гипотетически это может приводить к активации Ca^{2+} -проницаемых катионных каналов и входу ионов кальция в клетку, что является важнейшим сигнальным явлением у высших растений. В настоящей работе мы приводим результаты тестирования данной гипотезы. Эксперименты проводились с интактными корнями 5–12-дневных проростков *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Col-0, конститутивно экспрессирующими фотобелок экворин в цитоплазме. Ca^{2+} -сигнал измерялся с использованием высокочувствительно компьютеризованного хемилюминометра. В ходе проведенных опытов было показано, что в корнях *Arabidopsis*, экзогенный аскорбат в концентрации выше 0,1 ммоль/л вызывает временное увеличение активности цитоплазматического Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит.}}$). Аскорбат-индуцируемые Ca^{2+} -сигналы имели волнообразную форму с одним пиком, достигая максимума в течение 1–5 мин в зависимости от тестируемой концентрации. Они подавлялись при введении в среду хелаторов меди и железа, что указывает на вовлечение свободнорадикальных процессов, катализируемых переходными металлами, в частности синтеза гидроксильных радикалов. Введение в среду совместно с аскорбатом ионов меди и железа стимулировало аскорбат-индуцируемое повышение уровня Ca^{2+} , а добавление блокаторов Ca^{2+} -проницаемых ионных каналов (La^{3+} и Gd^{3+}) вызывало его подавление. Значительный ингибирующий эффект также оказывала тиомочевина, которая способна снижать уровень генерации гидроксильных радикалов. В целом, проведенные эксперименты показали, что внеклеточный аскорбат может быть важным сигнальным агентом в корне высших растений, активируя вход Ca^{2+} в результате активации соответствующих катионных каналов плазматической мембраны. В ходе работы было также проведено исследование влияния экзогенного аскорбата на рост и архитектуру корней арабидопсиса с применением техники замены среды. Замена контрольной среды на аскорбат-содержащую, начиная с уровня 0,3 мМ аскорбата, подавляла рост основного корня и модифицировала такие параметры его архитектуры, как диаметр корня и длина клеток зоны растяжения.

Generation of cytosolic Ca^{2+} signals and modification of growth induced by exogenously-applied ascorbate in roots of *Arabidopsis thaliana* plants cultivated *in vitro*

Vaitsiakhovich M. A., Hryvusevich P. V., Navaselsky I. Yu., Samokhina V. V., Demidchik V. V.

Belarusian State University, Biological Faculty, Department of Plant Cell Biology and Bioengineering, 10 Kurcatava st., 220030, Minsk, Republic of Belarus, tel.: +375 (17) 209-59-12, fax: +375 (17) 209-58-08, e-mail: dzemidchik@bsu.by

L-ascorbic acid (L-ascorbate or ascorbate) is the key antioxidant of the plant cell involved in the Foyer-Halliwell-Asada cycle and provides detoxification of H_2O_2 in all cell compartments. Ascorbate is also present in the extracellular space. The concentration of ascorbate in the apoplast is 0.1–1 mmol/l, which is much lower than in the cytoplasm (10–20 mmol/l). Peroxidase and oxidase systems eliminate ascorbate from the apoplast, transforming it into the form of dehydroascorbate, which is transported inside the cell with by active transport systems. Ascorbate can be involved in the generation of hydroxyl radicals in the cell wall as a result of reactions with transition metals (Cu^{2+} and Fe^{3+}). Hypothetically, this can lead to the activation of Ca^{2+} -permeable cation channels and influx of Ca^{2+} , which is a key signaling agent in plants. Here we have tested this hypothesis and measured ascorbate-induced Ca^{2+} influx and elevation in the cytosol. We have also examined whether exogenously-applied ascorbate can modify plant root growth in sterile culture. Experiments were carried out using roots of *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. Col-0 constitutively expressing Ca^{2+} -reporting photoprotein aequorin targeted to the cytosol. Seedlings were grown vertically in plastic dishes on the gel containing 100 % Murashige and Skoog medium with 1 % sucros and 0.35 % PhytigelTM during 5 to 12 days. Ca^{2+} signals were measured by precision single tube Turner 20/20 Luminometer using standard protocols. It was shown that, in the roots of *Arabidopsis*, exogenous application of L-ascorbate at the level above 0.1 mmol/l caused a temporary increase in the activity of cytosolic Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$). Ascorbate-induced Ca^{2+} signals had one peak, reaching a maximum during 1–5 min, depending on the concentration tested. These ascorbate-induced Ca^{2+} transients were inhibited by cation channel blockers Gd^{3+} and La^{3+} , hydroxyl radical scavenger thiourea and transition metal chelators. The effect exogenous ascorbate on growth and root architecture of *Arabidopsis* was explored using medium exchange technique. The replacement of the control medium with ascorbate-containing medium modified root elongation and root architecture parameters, such as root diameter and the length of elongation zone cells, etc. Statistically significant increase of root size was found at concentrations of ascorbate lower than 0.1–0.3 mmol/l while, at the levels above 0.3 mmol/l, severe inhibition was found. In conclusion, it was demonstrated that extracellular ascorbate can be an important signaling and growth regulation agent in roots of higher plants cultivated *in vitro*.

Долговременное сохранение растительного материала в криобанке Института физиологии растений Российской академии наук

Высоцкая О. Н.

Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, ул. Ботаническая, 35, Москва, 127276, Россия, тел.: +(8-499)678-54-21; e-mail: cryo_ippras@mail.ru; cryo@ippras.ru

В 1982 г. по инициативе Раисы Георгиевны Бутенко сотрудники лаборатории криосохранения во главе с Александром Сергеевичем Поповым организовали Криобанк Института физиологии растений Российской академии наук. В настоящее время в ИФР РАН сохраняют в жидком азоте более 900 образцов разнообразного растительного материала (суспензионные культуры клеток, меристематические апексы, семена орхидей и других ценных растений). Многие образцы из шести криоколлекций ИФР РАН принадлежат к редким и исчезающим видам растений (IUCN Red List of Threatened Species, списки СИТЕС, Красная книга Российской Федерации и различные региональные Красные книги). Периодическая проверка жизнеспособности образцов криобанка показала, что растительный материал, устойчивый к замораживанию, может восстанавливать свой рост и развитие после десятилетий пребывания в жидком азоте. Семена многих разных видов растений сохранили свою всхожесть после длительного криогенного сна (*Campanula persicifolia* — 30 лет хранения, *Astragalus subpolaris* — 29 лет хранения, *Lespedeza hedsaroides* — 29 лет хранения, *Campanula latifolia* — 28 лет хранения, *Vaccinium myrtillus* — 22 года хранения, *Allium schoenoprasum* — 17 лет хранения и другие). Пролиферирующие каллусы были получены *in vitro* из клеток моркови посевной (*Daucus carota*, subsp. *sativus*) после 25 лет хранения в жидком азоте и из клеток люцерны (*Medicago sativa*) после 27-летнего хранения. Растения малины (*Rubus idaeus*) и земляники (*Fragaria*) восстановлены из апексов после многих лет хранения в жидком азоте.

Для подготовки растительного материала к сохранению в криобанке были использованы оригинальные методы, разработанные сотрудниками ИФР РАН (АС № 865245, АС № 1097875, АС № 114673, АС № 1440137, АС № 1522006, патенты РФ № 2220563, № 2248121, № 2302107). Сравнение протоколов, использованных для криосохранения апексов земляники, показало, что метод с применением воздушной дегидратации (патент РФ № 2302107) более эффективен по сравнению с методом медленного замораживания (патент РФ № 2220563). Дегидратированные потоком воздуха апикальные меристемы земляники, замороженные погружением в жидкий азот, как правило, восстанавливают свой рост быстрее, чем апексы, замороженные в растворах криопротекторов методом медленного охлаждения с использованием диметилсульфоксида, программируемого замораживателя и автоматической инициации кристаллизации. Так, тщательно разработанный для земляники метод криосохранения меристем (патент РФ № 2302107) был использован для формирования криоколлекции этой культуры из 50 сортов и адаптирован для замораживания верхушек побегов растений других видов: рябины (*Sorbus*), малины и ежевики (*Rubus*).

Таким образом, с помощью технологии *in vitro* принадлежащие к различным систематическим группам растений коллекционные образцы из криобанка ИФР РАН могут быть восстановлены и использованы в научных исследованиях, производстве посадочного материала плодовых и ягодных растений или для реинтродукции растений в естественные места обитания.

Long-term preservation of plant material in cryobank of Plant Physiology institute of Russian Academy of Science

Vysotskaya O. N.

K. A. Timiryazev Institute of Plant Physiology Russian Academy of Sciences, 35 Botanicheskaya st., 127276, Moscow, Russian Federation, tel.: +7(499)678-54-21, e-mail: cryo@ippras.ru; cryo_ippras@mail.ru

.....

The Cryobank at the Timiryazev Institute of Plant Physiology of Russian Academy of Science was organized in 1982 under the initiative of Raisa G. Butenko. Now IPPRAS cryobank stores more than 900 specimens of different plant material (cell cultures, meristem apices, isolated from *in vitro* plantlets, seeds of orchid and other plant species). Many specimens from six IPPRAS cryocollections belong to rare, threatened and endangered plant species (the IUCN Red List of Threatened Species, CITES appendices, Red Book of Russian Federation and different another regional Red Books). Viability of cryobank specimens has been periodically tested during long-term preservation. It is shown that cryoresistant plant material can to recover its growth and development after decades of liquid nitrogen storage. Seeds of many plant species (*Campanula persicifolia* more than 30 years of storage, *Astragalus subpolaris* more than 29 years of storage, *Lespedeza hedysaroides* more than 29 years of storage, *Campanula latifolia* more than 28 years of storage, *Vaccinium myrtillus* more than 22 years of storage, *Allium schoenoprasum* more than 17 years of storage and anthers species) germinated after a long cryogenic sleep. Proliferated calli were obtained from carrot cells (*Daucus carota*, subsp. *sativus*) after 25 years preservation in liquid nitrogen and from alfalfa cells (*Medicago sativa* L.) after 27 years storage. Also raspberry (*Rubus idaeus*, cv. Skromnitza) and strawberry (*Fragaria* × *ananassa*: Alaja zorka, Tribute, Kokinskaya pozdnaya and others cultivars) plantlets were recovered *in vitro* from apical meristems after many years of storage in liquid nitrogen.

The plant material specimens stored in cryobank were adapted to frozen in liquid nitrogen by using original cryopreservation methods developed by IPPRAS researchers (USSR ACs №№ 865245, 1097875, 114673, 1440137, AC № 1522006, RF patents №№ 2220563, 2248121, 2302107). The comparison of protocols used for cryopreservation of strawberry meristems showed that method with air dehydration of apices (patent RF № 2302107) is more efficient than the slowly freezing method (patent RF № 2220563). It was found that long-term cryopreserved strawberry meristems frozen after air dehydrated by immersion in liquid nitrogen, as a rule, recovery their growth faster than apices from specimens frozen in cryoprotectants solutions by slowly cooling method at using dimethyl sulfoxide and programmed freezer with automatically initiation crystallization. As a result the elaborated cryopreservation technique (patent RF № 2302107) was used for the formation of strawberry meristem cryocollection (50 cultivars). Moreover its frozen protocol was adapted for shoot tip freezing of different plant cultures: rowan (*Sorbus* L.), raspberry and blackberry (*Rubus* L.).

Thus, IPPRAS cryobank specimens which belong to different systematic groups of plants can be recovered and used in scientific researches, production of seedlings of fruit and berry plants or for reintroduction of rare plants into natural habitats by *in vitro* technique.

Влияние гормонального состава среды выращивания на накопление гинзенозидов в суспензионной культуре клеток японского женьшеня (*Panax japonicus* var. *reperns*)

Глаголева Е. С., Константинова С. В., Титова М. В., Кочкин Д. В.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, биологический факультет, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, Москва, 119234, Россия, факс: +7(495)939-01-26, тел: +7(495)939-27-76, e-mail: glagoleva.elena@gmail.com

Гинзенозиды являются основными биологически активными веществами растений рода женьшень (*Panax* L., Araliaceae). Важным направлением современной фитохимии и биотехнологии растений является изучение закономерностей накопления таких соединений в культурах растительных клеток *in vitro*. С помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии, совмещенной с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС), в нашей работе был проведен подробный анализ качественного и количественного состава гинзенозидов в суспензионной культуре клеток женьшеня японского *Panax japonicus* var. *reperns*, выращенной на средах с разным составом фитогормонов. Контрольную линию культуры выращивали на среде с минеральной основой по Мурасиге-Скугу, содержащей (в соответствии с коллекционным паспортом) α -НУК (2 мг/л) и кинетин (1 мг/л). Опытный вариант культуры выращивали на такой же среде, но без добавления кинетина. Клетки обоих вариантов культуры накапливали основные гинзенозиды группы 20(S)-протопанаксатриола (ППТ) (Rg1, Re, Rf) и 20(S)-протопанаксадиола (ППД) (Rb1, Rc, Rb2/Rb3, Rd) и их малонильные производные. Также были обнаружены глюкуроны олеаноловой кислоты (гинзенозид R0 и чикусетсусапонин IVa) и некоторые минорные гинзенозиды. Однако, по содержанию отдельных гинзенозидов эти два варианта значительно различались. В контрольном варианте основной вклад в общее содержание гинзенозидов (более 80 % от суммы) вносили гинзенозиды R0, Rg1 и Rb1, а также малонильные производные гинзенозидов группы ППД (Rb1, Rb2/Rb3, Rc, Rd). В варианте без кинетина наблюдалось ~2-кратное снижение содержания производных ППД (Rb1, Rb2/Rb3, Rc, Rd), а также значительное (до 8 раз) снижение всех идентифицированных малонильных производных. При этом содержание ППТ производных (особенно Rf) в культуре, выращенной на среде без кинетина, было наоборот выше, чем в контроле, в 2–4 раза к концу цикла выращивания. Также клетки данной линии накапливали значительно больше чикусетсусапонина IVa (его содержание колебалось от 8,2 до 26,4 мг/г сухой биомассы в течение цикла субкультивирования, в то время как в контроле — только от 3,7 до 4,8 мг/г сухой биомассы). Таким образом, в культуре, выращенной на среде без кинетина, именно этот гликозид олеаноловой кислоты являлся преобладающим (до 44 % от суммы гинзенозидов).

Настоящее исследование показывает, что клетки женьшеня в условиях стерильной культуры сохраняют способность к синтезу достаточно широкого набора гинзенозидов. Изменение гормонального состава среды выращивания может влиять противоположным образом на накопление тритерпеновых гликозидов, относящихся к разным структурным группам (производные протопанаксадиола или -триола, олеаноловой кислоты, малонильные производные).

The effect of growth media phytohormone composition on ginsenoside profile in *Panax japonicus* suspension culture

Glagoleva E. S., Konstantinova S. V., Titova M. V., Kochkin D. V.

M. V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 1-12 Leninskie Gory, 119234, Moscow, Russian Federation, fax: +7(495)939-01-26, tel.: +7(495)939-10-00, e-mail: glagoleva.elena@gmail.com

.....

Ginsenosides are the major biologically active substances of ginseng (*Panax* L., Araliaceae). The production of such compounds *in vitro* is an important subject of biotechnology research. We used high performance liquid chromatography combined with mass spectrometry (HPLC-MS) to investigate the composition of ginsenosides in *Panax japonicus* var. *repens* suspension culture. The control culture was maintained in Murashige and Skoog medium containing α -NUK (2 mg/l) and kinetin (1 mg/l). We studied the accumulation of ginsenosides in cell culture grown in incubation medium without kinetin. We identified major neutral ginsenosides of 20 (S)-protopanaxatriol (PPT) and 20(S)-protopanaxadiol (PPD) group (Rg1, Re, Rf and Rb1, Rc, Rb2/Rb3, Rd respectively) in both control and experimental samples. Malonylated derivatives of PPTs and PPDs, glucuronides of oleanolic acid (R0 and chikusetsosaponin IVa), and some minor ginsenosides were also found in both experimental conditions. However, there were significant difference in ginsenoside content between kinetin-minus and control conditions. Ginsenosides R0, Rg1, Rb1 and malonyl derivatives of PPD were the most abundant ginsenosides (more than 80% of the total) in control culture. At the same time, there was approximately two-fold decrease of PPDs in the absence of kinetin. Also, in the absence of kinetin we observed a significant decrease (up to 8-fold) of all identified malonyl derivatives. On the other side, the concentration of PPT derivatives (especially Rf) in the kinetin-minus culture was ~2–4 fold higher than in the control. Furthermore, this culture strain accumulated a larger amount of chikusetsosaponin IVa. The content of this ginsenoside varied from 8.2 to 26.4 mg/g dry weight during subculturing, while in the control conditions the changes were less pronounced (3.7 to 4.8 mg/g). As a result, this oleanolic acid glycoside was predominant (up to 44% of the total) in the culture grown without kinetin. Our data suggest that ginseng cells in a sterile culture preserve the ability to synthesize and accumulate a sufficiently wide range of ginsenosides. Composition of culture media phytohormones can change the concentration of individual triterpene glycosides (PPT, PPD, oleanolic acid and malonyl derivatives) belonging to different structural groups in opposite directions.

Получение и характеристика культуры клеток тиса Валиха *Taxus Wallichiana* — продуцента противоопухолевых дитерпеноидов

**Глоба Е. Б.¹, Демидова Е. В.¹, Гайсинский В. В.¹, Кочкин Д. В.²,
Носов А. М.^{1,2}**

¹ Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, ул. Ботаническая, 35, Москва, 127276, Россия, тел.: +7 (499) 678-54-00, Факс +7 (499) 678-54-20 e-mail: ifr@ippras.ru

² Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, биологический факультет, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, Москва, 119234, Россия, тел.: +7(495)939-27-76, факс: +7(495)939-43-09, e-mail: info@mail.bio.msu.ru

Дитерпеноиды растений тиса *Taxus spp.* (таксоиды), прежде всего паклитаксел (Таксол®), на сегодняшний день является одними из наиболее востребованных противоопухолевых соединений. Их производство ограничено острым дефицитом исходного сырья — коры взрослых деревьев тиса. Радикальным решением этой проблемы является использование культур клеток высших растений, однако для многих культур клеток тиса отмечены медленный рост и исчезающе малая интенсивность образования таксоидов. В связи с этим получение и характеристика культур клеток редких видов тиса весьма актуальны.

Проведена работа по введению в культуру *in vitro* тиса *Taxus Wallichiana* Zucc. — эндемика горных районов южной Азии (Гималаи). В результате получены каллусные и суспензионные культуры клеток, которые в течение трех лет поддерживаются в коллекции отдела биологии клетки ИФР РАН и обладают стабильными ростовыми характеристиками. Индекс роста каллусной культуры находится в пределах 4–5, суспензионной — 8–10, что является достаточно высокими показателями для медленно растущих культур клеток *Taxus spp.* Жизнеспособность суспензионной культуры клеток на протяжении всего цикла выращивания превышает 90 %.

По данным ВЭЖХ-МС анализа, в биомассе полученной суспензионной культуры клеток *T. Wallichiana* найдены дитерпеноиды таксанового ряда, которые относятся к структурному типу тайванксана (14-гидроксилированные таксоиды): синенксан В, синенксан С, таксуюннин С, 2,5,9,10,14-пента-ацетокси таксадиен, юннанксан и изомер 7-гидрокси-2,5,10,14-тетра-ацетокси таксадиена. Преобладающим соединением является юннанксан. После обработки суспензионной культуры клеток метилжасмонатом (100 мкМ) в биомассе клеток обнаружены 13-гидроксилированные таксоиды, в том числе паклитаксел, в количествах, сопоставимых с содержанием в коре интактных растений тиса.

Проведенные исследования позволяют считать полученные культуры клеток *Taxus Wallichiana* перспективными для дальнейшего биотехнологического использования.

Obtaining and characterization of plant cell cultures of *Taxus Wallichiana* — a producers of antitumor diterpenoids

Globa E. B.¹, Demidova E. V.¹, Gaisinsky V. V.¹, Kochkin D. V.², Nosov A. M.^{1,2}

¹ K. A. Timiryazev Institute of Plant Physiology Russian Academy of Sciences, 35 Botanicheskaya st. 127276, Moscow, Russian Federation, tel.: +7(499)678-54-00, fax: +7(499)678-54-20, e-mail: ifr@ippras.ru

² M. V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 1-12 Leninskie Gory, 119234, Moscow, Russian Federation, tel.: +7(495)939-27-76, fax: +7(495)939-43-09, e-mail: info@mail.bio.msu.ru

.....

Diterpenoids of yew plants *Taxus spp.* (taxoids), especially paclitaxel (Taxol®), are one of the most important antitumour compounds. Their production is limited by the acute shortage of raw materials — the bark of adult yew trees. A radical solution to this problem is the use of plant cell cultures, however, for many cultures of yew cells slow growth and a vanishing low rate of formation of taxoids are noted and the obtaining and characterization of plant cell cultures of rare species of yew is very important.

The work on the initiating of plant culture of the *Taxus Wallichiana* Zucc. — endemic of the mountainous areas of South Asia (the Himalayas) was carried out. As a result, callus and suspension plant cell cultures were obtained. During three years are maintained in the Plant Cell Collection of Institute of Plant Physiology RAS and possess stable growth characteristics. The growth index of callus is in the range of 4 to 5, the growth index of suspension culture is 8–10, which is quite high for slow growing cultures of *Taxus spp.* The viability of cell suspension culture during growing cycle exceeds 90 %.

According to HPLC-MS analysis, taxane diterpenoids were found in the biomass of the suspension plant cell culture of *T. Wallichiana*, which refer to the structural type of taivanxane (14-hydroxylated taxoids): synenksan B, synenksan C, taxuninin C, 2.5.9.10, 14-penta-acetoxy-taxadiene, yunnanxane and isomer of 7-hydroxy-2,5,10,14-tetra-acetoxy-taxadiene. The predominant compound is yunnanxane. After treatment of the plant cells suspension culture with methyl jasmonate (100 μM), 13-hydroxylated taxoids, including paclitaxel, were found in the cell biomass in amounts comparable to the content of intact yew plants.

The carried out researches allow to consider received cultures of cells *Taxus Wallichiana* perspective for the further biotechnological use.

Оптимизация условий культивирования *Astragalus alopecurus in vitro*

**Головацкая И. Ф.¹, Бокучава Д. Б.¹, Нечаева М. В.¹, Бойко Е. В.¹,
Иванова В. А.¹, Кабил Ф.²**

¹ Национальный исследовательский Томский государственный университет, пр-т Ленина, 36, Томск, 634050, Россия, тел./факс: +7(3822)52-97-65

² Каирский университет, факультет сельского хозяйства, ул. Гаммаа, Гиза, Египет, e-mail: golovatskaya.irina@mail.ru

Ценными источниками вторичных метаболитов являются растения рода *Astragalus* L. Растения содержат тритерпеновые гликозиды, флавоноиды, сапонины и алкалоиды. Кроме того, эти растения способны аккумулировать некоторые микроэлементы, например, селен и марганец. В настоящее время установлено кардиотоническое, седативное и противоопухолевое действие экстрактов разных видов астрагала. Однако ареал обитания этих растений довольно узкий, а природные ресурсы ограничены. Возникает необходимость поиска альтернативных источников биологически активных веществ. Одним из таких источников может служить культура клеток растения, полученная в условиях *in vitro*.

Целью исследования было получение стабильной каллусной культуры астрагала лисохвостного (*Astragalus alopecurus* Pall.) и изучение роста и морфологии клеток каллуса.

В качестве эксплантов для получения каллусной культуры использовали молодые листья астрагала лисохвостного, культивируемого *in vitro*, а также каллус, образовавшийся в основании стебля растений. Для индукции каллусогенеза в питательную среду вносили стимуляторы роста — гормоны из классов цитокининов и ауксинов. Для изучения гормональной регуляции индукции каллусогенеза и поддержания роста каллуса использовали три варианта гормональной среды с разными видами гормонов и их соотношениями. Наиболее оптимальной для каллусогенеза была среда, содержащая 2,4-дихлорфеноксисуксиную кислоту, 6-бензиламинопурин и кинетин в соотношении 4:1:2.

Поскольку рост клеток в значительной степени определяется содержанием углеводов, то изучено влияние концентрации сахарозы (от 2 до 3,5 %) в питательной среде на каллусогенез. При культивировании на среде с 2–2,5 % сахарозой наблюдали медленное каллусообразование на экспланте и быструю потерю жизнеспособности каллуса. Более высокие концентрации сахарозы привели к активному образованию клеточной массы.

Показаны различия динамики роста культур, полученных из листового и базального каллуса. Так, во 2-м пассаже прирост биомассы базального каллуса происходил быстрее и интенсивнее, чем прирост биомассы листового каллуса. Основываясь на наблюдениях за каллусогенезом на материнском экспланте, мы пришли к выводу о наличии веществ, отсутствующих в искусственной среде. В связи с этим вводили в среду экстракт материнского растения, что оказывало положительный эффект на рост каллусных культур во втором и последующих пассажах. Часто каллусные культуры прекращали свой рост из-за накопления в среде вторичных метаболитов, поэтому мы вводили адсорбент этих веществ — активированный уголь. Он оказывал положительное влияние на прирост каллуса и ингибировал процессы старения клеточной культуры в количестве 1 г/л.

Цитологические исследования каллусных культур *A. alopecurus* показали, что в них присутствуют несколько типов клеток, отличающихся по форме и размерам. В зависимости от исходного экспланта преобладал тот или иной тип клеток. Так, в каллусе, полученном из молодых листьев, преобладали округлые клетки, а в каллусе, полученном из базальной части побега — вытянутые и овальные клетки. Этот факт отображает явление асинхронного роста каллусных клеток, обусловленное уровнем эндогенных регуляторов роста.

Таким образом, изучен рост и морфология клеточной культуры *A. alopecurus*. Выявлена зависимость преобладающего типа клеток от происхождения экспланта. Показаны оптимальные условия для культивирования клеточных культур.

Работа выполнена при поддержке РФФИ №17-54-61017.

Optimization of cultivation conditions for *Astragalus alopecurus* *in vitro*

Golovatskaya I. F.¹, Bokuchava D. B.¹, Nechaeva M. V.¹, Boyko E. V.¹, Ivanova V. A.¹, Kabil F.²

¹ National Research Tomsk State University, 36 Lenin ave., 634050, Tomsk, Russian Federation, tel./fax: 8 (3822) 529765

² Kair University, Faculty of Agriculture, Gammaa st., Giza, Egypt, e-mail: golovatskaya.irina@mail.ru

Valuable sources of secondary metabolites are plants of the genus *Astragalus* L. Plants contain triterpene glycosides, flavonoids, saponins and alkaloids. In addition, these plants are able to accumulate some trace elements, for example, selenium and manganese. At the present time, cardiogenic, sedative and antitumor activity of extracts of different types of *Astragalus* has been established. However, the habitat of these plants is rather narrow, and natural resources are limited. There is a need to search for alternative sources of biologically active substances. The culture of plant cells obtained under *in vitro* conditions can be one of such sources.

The aim of the study was to obtain a stable callus culture of *Astragalus alopecurus* Pall. and to study the growth and morphology of callus cells.

As explants for the production of the callus culture, young leaves of *A. alopecurus*, cultivated *in vitro*, and also callus formed in the basal part of the stem were used. To induce callusogenesis in the nutrient medium, growth stimulants were added—hormones from classes of cytokinins and auxins.

To study the hormonal regulation of induction of callusogenesis and maintenance of callus growth, three variants of the hormonal medium with different kinds of hormones and their ratios were used. A medium containing 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid, 6-benzylaminopurine and kinetin in a ratio of 4:1:2 was the most optimal for callusogenesis.

Since the content of carbohydrates largely determines the growth of cells, the effect of sucrose concentration (from 2 to 3.5 %) in the nutrient medium on callusogenesis has been studied. When cultured on medium with 2–2.5 % sucrose, slow callus formation on the explant and rapid loss of callus viability were observed. Higher concentrations of sucrose led to the active formation of cell mass.

Differences in growth dynamics of cultures obtained from leaf and callus from the basal part of the stem are shown. Thus, in the 2nd passage the growth of the biomass of the basal callus occurred more rapidly and intensively than the growth of the biomass of leaf callus.

Based on observations of callusogenesis on the maternal explant, they came to the conclusion that there are substances absent in the artificial environment. In this connection, the extract of the mother plant was introduced into the medium, which had a positive effect on the growth of callus cultures in the second and subsequent passages.

Often callus cultures ceased to grow due to the accumulation of secondary metabolites in the medium, so we injected the adsorbent of these substances — activated carbon. It had a positive effect on the growth of callus and inhibited the aging of the cell culture in an amount of 1 g/l.

Cytological studies of callus cultures showed that they contain several types of cells that differ in shape and size. Depending on the initial explant, this or that type of cells predominated. So, in callus, obtained from young leaves, rounded cells prevailed, and in the callus, obtained from the base of shoot — elongated and oval cells. This fact reflects the phenomenon of asynchronous growth of callus cells.

Thus, the growth and morphology of *A. alopecurus* cell culture was studied. The dependence of the predominant type of cells on the origin of the explant was revealed. Optimal conditions for the cultivation of cell cultures are shown.

The work was supported by the Russian Foundation for Basic Research project No. 17-54-61017.

Особенности структурной организации *in vitro* проростков льна-долгунца и льна масличного

Гончарук Е. А.

Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, ул. Ботаническая, 35, Москва, 127276, Россия, факс: +7(499)678-54-20, тел.: +7(499)678-53-53, e-mail: goncharuk.ewgenia@yandex.ru

В последние годы вид *Linum Usitatissimum* L. весьма успешно находит применение в фундаментальных и прикладных исследованиях биотехнологии. Изучение морфологических и структурных характеристик растений льна является важным для выявления значимых показателей при оценке перспективных параметров качества продукции льноводства. В культуре ткани *in vitro* лен имеет продолжительную историю исследований, посвященных изучению различных аспектов его культивирования, что значительно расширило область его использования. Биотехнологические подходы позволяют реализовать возможности моделирования необходимых или поддержания оптимальных условий выращивания в условиях *in vitro* и таким образом помогают в изучении физиолого-биохимических особенностей культуры.

Наиболее востребованы в различных отраслях промышленности такие представители льна культурного, как лен-долгунец и лен масличный. Основная продуктивная часть льна-долгунца — стебель — источник волокна, одного из наиболее ценных продуктов льноводства, в то же время существующие подвиды льна масличного также имеют большое значение вследствие возможности двустороннего использования культуры как для получения льняного масла, так и волокна. Качественные характеристики волокна во многом определяются присутствием лигнина — полимера фенольной природы. В связи с этим и для льна-долгунца, и для льна масличного изучение внутреннего строения стебля, его структурной организации и особенностей накопления и локализации в нем лигнина представляют значительный интерес.

Известно, что *in vivo* у интактных растений льна масличного и льна долгунца мезоструктура стебля имеет некоторые отличительные для этих разновидностей особенности, выражающиеся в различиях диаметра стебля и биометрических параметров лубяных пучков как структурных элементов, определяющих качество волокна. Для изучения физиолого-биохимических особенностей культуры льна *in vitro* как модельной системы важным аспектом является структурное строение побегов прегенеративного возрастного периода, соответствующего имматурному или виргинильному возрастному состоянию онтогенетической фазы «быстрого роста», во многом определяющее процессы формирования волокна и его качество. Проведенные исследования проростков *in vitro* позволили установить, что побег прегенеративного возрастного периода льна-долгунца в онтогенетической фазе «быстрого роста» характеризовался большей зрелостью относительно такого льна масличного, что выразилось в наличии полости в зоне центрального цилиндра, более узком слое наружной первичной коры с клетками эндодермы, примыкающими к образующейся области формирования и закладки лубяных пучков, также более выраженной у льна-долгунца нежели у льна масличного. Что касается процесса лигнификации, присущего опорным тканям льна, гистохимические исследования позволили установить сходство локализации лигнина в клетках ксилемы и в области формирования, закладки лубяных пучков у двух разновидностей льна. Однако у льна долгунца была более выражена интенсивность данного процесса, что подтверждалось и результатами биохимических исследований. Таким образом, лен-долгунец и лен масличный *in vitro* имеют отличия в структурной организации побега прегенеративного периода, обусловленные морфофизиологическими особенностями проростков изучаемых разновидностей.

Features of the structural organization sprout fiber flax and seed flax *in vitro*

Goncharuk E. A.

K. A. Timiryazev Institute of Plant Physiology Russian Academy of Sciences, 35 Botanicheskaya st., 127276, Moscow, Russian Federation, fax: +7(499)678-54-20, tel.: +7(499)678-53-53, e-mail: goncharuk.ewgenia@yandex.ru

.....

In recent years the species *Linum Usitatissimum* L. have been very successfully used in fundamental and applied research of biotechnology. The study of the morphological and structural characteristics of flax plants is important for identifying significant indicators in assessing the prospective parameters of the products flax quality. In tissue culture *in vitro*, flax has a long history of research devoted to the study of various aspects of its cultivation, which greatly expanded the scope of its use. Biotechnological approaches allow to realize the possibilities of modeling necessary or maintaining optimal growing conditions *in vitro* and thus help in studying of the physiological and biochemical features of the culture.

The most demanded in various industries such representatives of flax are cultivated as fiber flax and seed flax. The main productive part of fiber flax is the stem — the source of fiber, one of the most valuable flax products, while the existing subspecies of seed flax is also very important due to the possibility of two-way use of the crop for both oil and fiber. The qualitative characteristics of the fiber are largely determined by the presence of lignin — a polymer of a phenolic nature. In connection with this, for both fiber flax and seed flax, the study of the internal structure of the stem, its structural organization, the features of the accumulation and localization of lignin in it are of considerable interest.

It is known that *in vivo* in intact plants of fiber flax and seed flax, the mesostructure of the stem has certain features that are distinctive for these varieties, expressed in differences in stem diameter and in the biometric parameters of bast beams as structural elements that determine the quality of the fiber. Study of the physiological and biochemical features of flax culture *in vitro* as a model system, an important aspect is the shoots structure of the pregenerative age period appropriate to the immature or virgin age of the ontogenetic phase of “rapid growth”, which largely determines the processes of fiber formation and its quality. The conducted *in vitro* seedling studies allowed to establish that the sprout of the pre-regenerative age of the fiber flax in the ontogenetic phase of “rapid growth” was characterized by greater maturity relative to that of seed flax, which was expressed in the presence of a cavity in the stele (hollow-stalked), a narrower layer of the outer primary cortex with endoderm cells, adjacent to the emerging area of formation and laying of bast beams, also more pronounced in flax fiber than in flax oil. As to the lignification process inherent in flax sustentacular tissues, histochemical studies have made it possible to establish the similarity of lignin localization in xylem cells and in the formation and folding of bast beams in two flax varieties. However, flax fiber was more pronounced intensity of this process, which was confirmed by the results of biochemical studies. Thus, fiber flax and seed flax *in vitro* have differences in the structural organization of sprout of the pre-generative period, caused by the morpho-physiological features of seedlings of the studied varieties.

Характеристика трансгенных растений кукурузы в поколениях от самоопыления

**Деркач Е. В.¹, Черчель В. Ю.¹, Дзюбецкий Б. В.¹, Моргун Б. В.²,
Нитовская И. А.², Сатарова Т. Н.¹**

¹ Институт зерновых культур Национальной академии аграрных наук Украины,
ул. Владимира Вернадского, 14, Днепро, 049027, Украина,
факс: +380(562)36-26-18, тел.: +380(562)36-26-18, e-mail: kvderkach@gmail.com

² Институт клеточной биологии и генетической инженерии Национальной академии наук
Украины, ул. акад. Заболотного, 148, Киев, 03143, Украина,
факс: +380(44)526-71-04, тел.: +380(44)526-71-04, e-mail: molgen@icbge.org.ua

Устойчивость к гербицидам является необходимым качеством сельскохозяйственных культур. Одним из широко используемых в сельском хозяйстве является контактный гербицид широкого спектра действия «БастаТМ». Его действующее вещество — глюфосинат аммония представляет собой эквимолярную, рацемическую смесь D- и L-изомеров фосфинотрицина. Устойчивость трансгенных растений к фосфинотрицину может быть обеспечена работой фермента фосфинотрицинацетилтрансферазы, который кодируется геном *bar* из генома бактерии *Streptomyces hygroscopicus*.

Целью работы была характеристика морфобиологических особенностей трансгенных растений кукурузы с чужеродным геном *bar* в поколениях от самоопыления T2-T6.

Трансгенные растения кукурузы были получены из исходного гибрида PLS61 × ДК633266. Генетическую трансформацию проводили путем биолиственной обработки каллусов на щитках незрелых зародышей векторной конструкцией, содержащей ген β-глюкуронидазы *Escherichia coli* и ген фосфинотрицинацетилтрансферазы (*bar*) *S. hygroscopicus*, оба под контролем промотора гена убиквитина кукурузы. Селекцию каллусной ткани и растений-регенерантов *in vitro* после трансформации вели на фоне соответственно 10 и 5 мг/л фосфинотрицина. Растения поколения T1 были получены при опылении растения T0 пыльцой исходного гибрида PLS61 × ДК633266. Растения поколений T2-T6 получены в результате самоопыления. В условиях закрытого грунта испытывали устойчивость растений-трансформантов на селективном фоне, который создавали опрыскиванием всходов раствором гербицида «БастаТМ» в концентрации 1 г/л в пересчете на фосфинотрицин.

После проведения биолиственной трансформации наличие гена *bar* в каллусной ткани кукурузы, растениях-регенерантах T0 и в последующих поколениях было подтверждено методом ПЦР.

Установлено, что контрольные растения, не подвергшиеся трансформации, после обработки гербицидом погибают в течении недели. Частота выживаемости растений-трансформантов после гербицидной обработки возрастала от 64,5±8,2% в поколении T2 до 100% в поколении T6. Трансформанты без гербицидной обработки по фенологическим показателям и высоте растений в поколении T2 существенно не отличались от нетрансформированных, необработанных гербицидом, а в поколении T3 обнаруживали увеличение продолжительности межфазных периодов, разрыва в цветении мужских и женских соцветий, а также уменьшение высоты растений. В поколении T6 трансгенные растения в вариантах на безгербицидном фоне и при обработке гербицидом по фенологическим показателям и высоте растения достоверно не различались, что указывает на вероятный переход экспрессируемого трансгена *bar* в гомозиготное состояние в пяти циклах гомозиготации в результате самоопыления, успешный отбор на селективном фоне, а также стабилизацию растительного генома в ряду поколений после введения трансгенов.

Characteristics of maize transgenic plants in generations from self-pollination

Derkach K. V.¹, Cherchel V. Yu.¹, Dzyubetsky B. V.¹, Morgun B. V.², Nitovskaya I. O.², Satarova T. M.¹

¹ State Enterprise Institute of Grain Crops of National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, 14 Volodimir Vernadsky st., 049027, Dnipro, Ukraine, fax: +380(562)36-26-18, tel.: +380(562)36-26-18, e-mail: kvderkach@gmail.com

² Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine, 148 Akademika Zabolotnoho st., 03143, Kyiv, Ukraine, fax: +380(44)526-71-04, tel.: +380(44)526-71-04, e-mail: molgen@icbge.org.ua

Resistance to herbicides is a necessary trait of modern agricultural crops. BastaTM, a broad-spectrum contact herbicide, is one of them widely used in agriculture. Its active substance, ammonium glufosinate, is an equimolar, racemic mixture of D- and L-isomers of phosphinothricin. Plant resistance to phosphinothricin can be provided by the enzyme phosphinothricin acetyltransferase, which is encoded by *bar* gene from genome of bacterium *Streptomyces hygroscopicus*.

The purpose of the study was to characterize biological peculiarities of maize transgenic plants with a foreign *bar* gene in generations from self-pollination T2-T6.

Maize transgenic plants were initiated from the original hybrid PLS61 × DK633266. Genetic modification was carried out via biolistic transformation of callus tissue on immature embryos with a vector containing a reporter gene of β-glucuronidase from *Escherichia coli* and a gene of phosphinothricin acetyltransferase from *S. hygroscopicus* (*bar*), both under the promoter of maize ubiquitin gene. Selection of calli and regenerants *in vitro* after transformation was carried out under 10 and 5 mg/l of phosphinothricin, respectively. Plants of T1 generation were obtained by pollination of the T0 plant with pollen of the initial PLS61 × DK633266 hybrid. Plants in T2-T6 generations were obtained by self-pollination. Transgenic plants were cultivated in a greenhouse and tested with BastaTM spraying solution at concentration of 1 g/l in phosphinothricin.

After biolistic transformation, the presence of *bar* gene in maize callus tissue, regenerants of T0 and next generations was confirmed by the PCR method.

It was established that control plants without genetic transformation after herbicide treatment perished within a week. The survival rate of transformed plants after herbicide treatment increased from 64.5±8.2% in T2 to 100% in T6 generations. T2 plants on phenological parameters and plant height did not differ significantly from untransformed ones, while in T3 generation, the elongation of interphase periods, the prolonged rupture in the flowering time of male and female inflorescences, and the decrease in plant height were detected. In T6 generation transgenic plants without and under herbicide treatment on phenological parameters and plant height did not differ significantly, indicating a probable transition of the expressing transgene *bar* into homozygous state in five cycles of homozygosity via self-pollination, successful selection on the selective background and stabilization of the plant genome in generations after transgene introduction.

Дрожжевой ген *suc2*, кодирующий внеклеточную инвертазу, влияет на распределение сахаров в вегетативных органах трансформированных растений картофеля *in vitro*

Дерябин А. Н., Трунова Т. И.

Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, ул. Ботаническая, 35, Москва, 127276, Россия, тел.: +7(499)678-53-26, факс: +7(495)977-80-18, e-mail: anderyabin@mail.ru

Инвертаза (К. Ф. 3.2.1.26) является ключевым ферментом углеводного метаболизма. Она катализирует необратимую реакцию расщепления гликозидной связи в молекуле сахарозы с образованием двух нефосфорилированных молекул гексоз глюкозы и фруктозы. Растительные инвертазы различаются по биохимическим характеристикам (рН оптимуму, растворимости) и внутриклеточной локализации. В данной работе исследовали роль инвертазы клеточной стенки (апопластная инвертаза) в распределении сахаров в вегетативных органах растений картофеля, полученных *in vitro*. Опыты проводили с нетрансформированными растениями картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта 'Дезире' и линией того же сорта, трансформированной вектором, содержащим целевой ген *suc2*, кодирующий зрелый белок инвертазы *Saccharomyces cerevisiae*. При конструировании трансгена использовался фрагмент Asp718/SalI из плазмиды PI-3-INV. Этот фрагмент был соединен с последовательностью лидерного пептида ингибитора протеиназы II картофеля, обеспечивающего апопластную локализацию дрожжевой инвертазы. При этом фрагмент Asp718/SalI находился между клубнеспецифичным В33-промотором гена пататина класса I и октапин-синтаза терминатором в бинарном векторе pBin19. Полученные с помощью агробактериальной трансформации листовых высевок растения-регенеранты картофеля были отобраны *in vitro* на среде Мурасиге-Скуга (МС) с канамицином и проверены на экспрессию трансгена методом Northern-блот-гибридизации, в Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology (Германия). Растения картофеля выращивали в пробирках, уплотненных ватно-марлевыми пробками, при температуре $21 \pm 1^\circ\text{C}$, 16-ч световом дне (освещенность 100 ммоль квантов/м²·с), на МС-среде, дополненной 2% сахарозы (рН 5.8). Для получения микроклубней использовали МС-среду того же состава, но содержащую 8% сахарозы, при этом пробирки с растениями картофеля помещали в темноту на 10 недель.

Ранее нами было показано, что синтезируемый геном *suc2* белок инвертазы дрожжей транспортировался во внеклеточное пространство (апопласт), слабо адсорбировался на клеточной стенке и проявлял высокую ферментативную активность. Установлено, что трансформанты, по сравнению с контрольными растениями, более активно потребляли сахарозу из МС-среды. Важно учесть, что сахароза является метаболически неактивным углеводом, поэтому чтобы быть использованной в обменных процессах, она должна расщепиться на моносахара, например, инвертазой. Осуществляя гидролиз сахарозы, инвертаза изменяет состав и соотношение растворимых углеводов в разных компартментах клетки, что регулирует экспрессию генов, чувствительных к изменению отношения сахароза/моносахара. Показано, что трансформация растений картофеля геном *suc2* привела к накоплению фруктозы в апопласте, сахарозы и глюкозы в листьях, и существенно увеличила содержание глюкозы в микроклубнях и корнях. Накопление сахаров в листьях вследствие торможения оттока ассимилятов способствовало снижению ростовых и весовых параметров у растений и большей их обводненности, что свидетельствует о регуляторной роли инвертазы клеточной стенки. Можно предположить, что растения картофеля, трансформированные геном *suc2*, могут найти широкое применение в фитобиотехнологии.

Авторы выражают благодарность группе доктора Lothar Willmitzer (Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology, Германия) и сотрудникам лаборатории сигнальных систем контроля онтогенеза им. акад. М. Х. Чайлахяна ИФР РАН за предоставленные для исследований растения-регенеранты картофеля.

Yeast gene *suc2* encoding cell-wall invertase influences on sugars distribution in vegetative organs of transformed potato plants *in vitro*

Deryabin A. N., Trunova T. I.

K. A. Timiryazev Institute of Plant Physiology Russian Academy of Sciences, 35 Botanicheskaya st., 127276, Moscow, Russian Federation, tel.: +74996785326, fax: +74999778022, e-mail: anderyabin@mail.ru

Invertase (EC 3.2.1.26) is an enzyme of carbohydrate metabolism, which catalyzes the irreversible hydrolysis of sucrose into the two monosaccharides (glucose + fructose). In higher plants, an invertase has several types, which differs in the biochemical properties and subcellular localization. In this study, we investigated a functional role of the cell-wall invertase (CWI) on sugars distribution in vegetative organs of potato plants *in vitro*. It is known, that CWI is involved in important physiological processes, including phloem unloading, cell differentiation control, sucrose level regulation in apoplast, and sucrose transport across the plasmalemma.

Our study was carried out with potato (*Solanum tuberosum* L., cv. 'Desirée') plants and the line which expressed the *suc2* gene of *Saccharomyces cerevisiae* under control of the tuber-specific patatin B33-promoter of class I with an N-end-connected potato proteinase II inhibitor signal peptide, which provides apoplastic localization of yeast invertase. The CWI construct was prepared using an *Asp718/SalI* fragment (containing the sequence of the *suc2* gene encoding the mature invertase protein fused to the signal sequence of proteinase inhibitor II) prepared from the PI-3-INV plasmid. Both fragments were cloned between the B33 promoter and the octopine synthase terminator in pBin19 binary vector. Potato plants were transformed using the *Agrobacterium* system and selected *in vitro* on kanamycin containing Murashige and Skoog (MS) medium, in Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology (Germany). Plants were propagated *in vitro* by the cuttings method using stem cuttings with one axillary bud, grown in test tubes, sealed with cotton-gauze plugs, at 21±1°C and 16-h long light day (illuminating intensity of 100 µmol photons/(m²·s)) on MS-medium containing 0.7 % agar and 2 % sucrose, pH 5.8. The standard liquid tuberization medium contained MS-medium salts and 80 g·l⁻¹ sucrose. Plants were in darkness at 21±1°C within 10 weeks.

According to the main heterotrophy of the plants grown *in vitro*, disaccharide of sucrose (2–3 %) as a carbohydrate source is used most often. In the plant cells sucrose can't be utilized for metabolism. Before using it must be split into hexoses by, for example, invertase. To reveal a role of the CWI in changing the composition of soluble carbohydrates in various vegetative organs and cell compartments we have assessed the contents of sugars in leaves, roots, microtubers and the apoplastic washing fluid from leaves of potato plants. The transformants compared to the nontransformed plants utilized osmotically active compounds (mainly, sucrose) more intensively. The results indicate that activity of yeast invertase increase the sugars content in vegetative organs and the apoplast of the transformed plants and led to changes in their morphometric parameters. Transformation of potato plants with the yeast invertase gene resulted in accumulation of fructose in the apoplast, sucrose and glucose in the leaves, and especially, glucose in microtubers and roots. In transformed plants compared to that in the nontransformed plants contents of sugars in leaves and roots was higher by 35–45 %, in microtubers — by 270 %. It is indicative of regulatory function of CWI. Thus, use of the transformed potato plants with of the constitutive expression the yeast invertase gene could be found some application in biological, medical and/or pharmaceutical engineering.

The authors are grateful Dr. Lothar Willmitzer (Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology, Germany) and to the staff of the Laboratory of Signaling Systems of Ontogenesis Control named after Academician M. Kh. Chailakhyan (K. A. Timiryazev Institute of Plant Physiology of the Russian Academy of Sciences) who kindly provided potato plants for the study.

Особенности редокс-регуляции ранних этапов прорастания пыльцевых зерен ели голубой

Евменьева А. А., Максимов Н. М., Брейгина М. А.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, биологический факультет, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, Москва, 119234, Россия, факс: +7(495)939-11-15, тел.: +7(495)939-12-09, e-mail: evmenievaanastasia@gmail.com, pollen-ions@yandex.ru

Полярный рост — тип направленного роста, характерный для определенных типов эукариотических клеток, в частности, для корневых волосков, зигот бурых водорослей и пыльцевых трубок. Одним из ключевых регуляторных модулей, обеспечивающих запуск и поддержание полярного роста, по современным представлениям, являются активные формы кислорода (АФК). Внутриклеточный кальций и мембранный потенциал являются важными звеньями регуляторных цепей и в обзорах последних лет рассматриваются и обсуждаются в комплексе с редокс-регуляцией полярного роста. Наиболее удобным модельным объектом для изучения полярного роста у голосеменных и цветковых растений является пыльцевая трубка. Хотя прорастание пыльцы у этих групп растений в общих чертах сходно, для пыльцы голосеменных характерны специфические структурные и физиологические особенности, в том числе, на два порядка более низкая скорость прорастания. К настоящему моменту физиологическая регуляция прорастания у голосеменных растений изучена очень слабо. Наша работа была посвящена изучению роли экзогенных и эндогенных АФК в прорастании пыльцы ели с целью дальнейшего сравнительного анализа регуляторных механизмов у голосеменных и цветковых растений.

Первая часть работы состояла в оценке возможности влияния экзогенных АФК на ранние этапы прорастания пыльцевых зерен. Оценивалось влияние экзогенного H_2O_2 на эффективность прорастания, скорость роста трубок и их физиологическое состояние. В широком диапазоне концентраций (100 мкМ — 2 мМ) влияния на прорастание не наблюдалось, однако все концентрации H_2O_2 стимулировали рост трубок. Анализ динамики мембранного потенциала и цитоплазматического рН пыльцевых зерен показал, что в первые два часа инкубации показатели держатся на низком уровне, что соответствует состоянию покоя (подобные измерения для голосеменных проводились впервые). После 14 часов инкубации была зарегистрирована значительная гиперполяризация вегетативной клетки, которая отражает активацию метаболизма и запуск полярного роста. В состоянии покоя пероксид водорода никакого влияния на исследуемые физиологические показатели не оказывал. Полученные результаты свидетельствуют о том, что экзогенные АФК не участвуют в регуляции ранних этапов прорастания у ели (в отличие от табака, изученного ранее). Рост трубки ели, однако, подвержен влиянию экзогенных АФК.

Во второй части работы была показана необходимость эндогенных АФК для реализации ранних этапов прорастания. Результаты ингибиторного анализа с применением блокатора НАДФН-оксидазы и антиоксидантов разной специфичности позволили установить роль эндогенных O_2^- и H_2O_2 в контроле прорастания. В соответствии с этим, спектрофлуориметрически был зафиксирован выход АФК из пыльцевых зерен ели на раннем этапе активации, в котором участвовала НАДФН-оксидаза. Полученные данные впервые демонстрируют физиологические особенности ранних этапов прорастания пыльцы голосеменных растений, в том числе, особенности функционирования регуляторного редокс-модуля.

Настоящая работа была поддержана РФФИ (проект № 18-34-00979).

Redox-regulation of pollen germination in *Picea pungens* at early stages

Evmenyeva A. A., Maksimov N. M., Breygina M. A.

M. V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 1-12 Leninskie Gory, 119234, Moscow, Russian Federation, fax: +7(495)939-11-15, tel.: +7(495)939-12-09, email: evmenievaanastasia@gmail.com, pollen-ions@yandex.ru

.....

Polar growth is a type of directional growth specific for particular eukaryotic cell types, such as root hairs, brown algae zygotes and pollen tubes. According to recent findings, one of the key regulatory modules providing initiation and sustaining of polar growth are reactive oxygen species (ROS). Intracellular calcium and membrane potential are important parts of regulatory networks and in recent reviews they are discussed in association with redox-regulation of polar growth. The most convenient model object for comparative investigation of polar growth in gymnosperm and angiosperm plants is a pollen tube. Although pollen germination in these two plant groups is basically similar, there are some specific structural and physiological features, including considerably slower germination in gymnosperms. To date, physiological regulation of germination in gymnosperms needs to be elucidated. The present work is devoted to examination of how exogenous and endogenous ROS are involved in germination of blue spruce pollen for the purpose of the further comparative analysis of regulatory mechanisms in gymnosperm and angiosperm plants.

First, the influence of exogenous ROS on pollen germination and physiology at early stages has been revealed. The effect of H₂O₂ on germination efficiency, rate of pollen tube growth and physiological state of pollen was assessed. In a wide range of H₂O₂ concentrations (100 μ M — 2 mM) no effect on germination was found, but all concentrations stimulated pollen tube growth. The dynamical analysis of membrane potential and cytoplasmic pH in the vegetative cell showed that during the first 2 hours of incubation these parameters stay low, which reflects the dormancy state (such measurements in gymnosperms were conducted for the first time). After 14 hours of incubation a considerable hyperpolarization occurred, showing metabolism activation and initiation of polar growth. In the dormancy state hydrogen peroxide didn't affect on the assessed physiological parameters. The obtained results gave the evidence of that exogenous ROS don't take part in regulation of spruce pollen germination at early stages (unlike tobacco pollen which had been studied earlier). However, spruce pollen tube growth is influenced by exogenous ROS.

The second part of this work confirmed endogenous ROS involvement in pollen germination at early stages. Inhibitory analysis with the application of the NADPH-oxidase inhibitor and antioxidants of different specificity revealed the pivotal role of endogenous O₂⁻ and H₂O₂ in germination control. In agreement with this, ROS efflux from pollen grains of *P. pungens* and contribution of NADPH-oxidase to ROS production at the early phase of activation was detected by spectrofluorometry.

The obtained data demonstrate physiological features of early stages of pollen germination in gymnosperm plants, including the functioning of regulatory redox module.

The present work was supported by Russian Foundation for Basic Research (the project number is 18-34-00979).

Криосохранение конгломератов клеток, полученных из побегов рябины (*Sorbus* L.), культивируемых *in vitro*

Евсюков С. В., Высоцкая О. Н.

Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, ул. Ботаническая, 35, Москва, 127276, Россия, факс: +7(499)678-54-20, тел.: +7(499)678-54-00, e-mail: evsyukov_2013@mail.ru

Применение технологии криосохранения помогает существенно снизить затраты на длительное хранение *in vitro* различных коллекций растений. При температуре жидкого азота ценные клоны криоустойчивого растительного материала (штаммы клеток, разновидности, сорта и виды) могут сохранять свою жизнеспособность неопределенно долгое время без обновления питательных сред. В связи с этим, мы изучали устойчивость конгломератов клеток рябины к замораживанию в жидком азоте. В качестве экспериментального материала были выбраны два сорта рябины: 'Мичуринская Десертная' и 'Титан', различающиеся по регенерационным способностям и коэффициентам размножения *in vitro*.

Сорт 'Мичуринская Десертная' был получен Иваном Владимировичем Мичуриным в результате скрещивания гибрида рябины (св. 'Ликерная': *Sorbus aucuparia* × *Aronia melanocarpa*) и мушмулы германской (*Mespilus germanica*). Растения этого сорта представляют собой деревья высотой не более 3 метров с широкой кроной, нежно-зелеными листьями, серыми ветвями и относительно высокой зимостойкостью. Другой сорт — 'Титан' был получен И. В. Мичуриным в 1916 г. после опыления гибридной рябины сорта 'Бурка' смесью пыльцы яблони и груши. Деревья этого сорта рябины имеют компактную крону, темно-зеленые блестящие листья, плодоносят каждый год и имеют высокую зимостойкость.

Экспериментальный растительный материал размножали *in vitro* на модифицированной среде Мурасиге-Скуга, дополненной 2 мг/л бензиламинопурина и увеличенными концентрациями ауксинов. В результате, в течение 4 месяцев культивирования были получены плотные конгломераты побегов. Адаптированные к холоду конгломераты были разделены на мелкие кусочки и дегидратированы в потоке стерильного воздуха с использованием протокола криосохранения (патент РФ № 2302107).

Конгломераты клеток, полученные *in vitro* от побегов рябины, были заморожены в жидком азоте с помощью протокола криосохранения, разработанного ранее для меристем земляники. Основной идеей данного метода криосохранения является быстрое охлаждение дегидратированного растительного материала без использования программируемого замораживателя и токсичных криопротекторов. Для этого все криопробирки с дегидратированным растительным материалом быстро погружали в жидкий азот. После хранения в жидком азоте в течение 24 часов, конгломераты перемещали из криопробирок на агаризованную среду Мурасиге-Скуга, дополненную 6-бензиламинопурином, для восстановления *in vitro*. Посткриогенный рост был восстановлен у 50 % конгломератов сорта 'Титан' и у 67–75 % — сорта 'Мичуринская Десертная'. После криосохранения из конгломератов были получены побеги, которые были размножены *in vitro*.

Cryopreservation of cell conglomerates derived from rowan shoots (*Sorbus* L.) cultured *in vitro*

Evsyukov S. V., Vysotskaya O. N.

K. A. Timiryazev Institute of Plant Physiology Russian Academy of Sciences, 35 Botanicheskaya st., 127276, Moscow, Russian Federation, fax: +7(499)678-54-20, tel.: +7(499)678-54-00, e-mail: evsyukov_2013@mail.ru

.....

The application of cryopreservation techniques can significantly reduce the costs for long-term storage *in vitro* of different plant collections. At temperature of liquid nitrogen valuable clones of cryoresistance plant material (cell strains, varieties, cultivars and species) may store of their viability during unlimited time without renewal of nutrient media. In this regard, we have studied the resistance of rowan cell conglomerates to cryogenic freezing. As an experimental material we have selected two rowan clones (cvs.: 'Michurinskaya Desertnaya' and 'Titan') with different regenerative capacities and propagation rates *in vitro*.

'Michurinskaya Desertnaya' has been received by Ivan V. Michurin as a result of complex crossing rowan hybrid (cv. 'Likiernaya': *Sorbus aucuparia* × *Aronia melanocarpa*) and medlar (*Mespilus germanica*). The plants of this cultivar are tree having a height of not more than 3 m with a wide crone, gently green leaves, grey branches and relatively high winter hardiness. Another cultivar, named as 'Titan', was obtained by I. V. Michurin in 1916 from pollination of mountain ash hybrid (cv. 'Burka') with a pollen mixture of apple and pear. The trees of this cultivar have a compact crone, dark green nitid leaves, every year fruiting and high winter resistance.

Experimental plant material was propagated *in vitro* on modified MS medium, supplemented by 2 mg/l 6-benzylaminopurine and increased concentrations of auxins. In a result dense shoot conglomerates of ash berry were obtained during 4 cultivation months. Cold adapted conglomerates were dissected into small pieces and dehydrated in sterile air flow with used of cryopreservation protocol (patent RU No. 2302107).

Rowan cell conglomerates obtained *in vitro* from shoots were frozen in liquid nitrogen by cryopreserved protocol developed earlier for strawberry meristems. The main idea of this cryopreserved method is rapid immersion of dehydrated plant material in liquid nitrogen without using of programmed freezer and toxic cryoprotectants. For this purpose all cryo tubes with dehydrated plant material quickly immersed into liquid nitrogen. After storage in liquid nitrogen during 24 hours conglomerates were moved from tubes on MS agar medium with 0.5 mg/l of 6-benzylaminopurine for recovery *in vitro*. Post-cryogenic growth of shoots was recovery for 50 % conglomerates of 'Titan' and for 67–75 % for 'Michurinskaya Desertnaya'. After cryopreservation all recovered shoots were propagated *in vitro*.

Некоторые аспекты размножения *in vitro* сортов и селекционных образцов эфиромасличных растений семейства *Lamiaceae*

Егорова Н. А., Якимова О. В., Ставцева И. В., Загорская М. С., Тевфик А. Ш.

Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма, ул. Киевская, 150,
Симферополь, 295493, тел./факс: (3652)56-00-07, e-mail: yegorova.na@mail.ru

Семейство Яснотковые (*Lamiaceae*) включает около 250 родов, многие из которых выращивают как эфиромасличные, пряно-ароматические и лекарственные растения. Активное использование в фармацевтической, пищевой, парфюмерно-косметической промышленности и медицине обуславливает интерес к этим растениям с практической и научной точки зрения. В ФГБУН «НИИ-ИСХ Крыма» много лет проводится работа по созданию новых сортов эфиромасличных растений. В связи с этим весьма актуальна разработка биотехнологических методов, которые позволяют повысить эффективность традиционных приемов селекции и семеноводства. Одним из таких наиболее востребованных методов является клональное микроразмножение. Целью работы было изучение особенностей размножения *in vitro* сортов и селекционных образцов выращиваемых в Крыму эфиромасличных растений семейства *Lamiaceae* на 2-м этапе клонального микроразмножения. Для исследований использовали сорта и селекционные образцы лаванды (*Lavandula angustifolia* Mill.), шалфея (*Salvia sclarea* L.), душицы (*Origanum vulgare* L.), мяты (*Mentha spp.*), мелиссы (*Melissa officinalis* L.) и тимьяна (*Thymus vulgaris* L.). В качестве эксплантов в этих опытах использовали сегменты стебля с узлом, выделенные из побегов, полученные из меристемных культур.

У всех изученных генотипов на 2-м этапе (собственно микроразмножения) наблюдали множественное побегообразование. Показана целесообразность использования для размножения *in vitro* у анализируемых видов двух методов (индукции адвентивных побегов и микрочеренкования), что позволило повысить коэффициент размножения. Выявлены факторы, влияющие на морфогенез эксплантов, — генотип и условия выращивания донорного растения, состав питательной среды, тип и происхождение экспланта, условия культивирования, количество субкультивирований. Определены особенности изменения морфометрических показателей развития эксплантов и коэффициента размножения в зависимости от этих факторов. Коэффициент размножения был максимальным у душицы (до 74,1), лаванды (до 24,5), тимьяна (до 21,3) и минимальным у шалфея (до 9,7). У разных сортов и образцов мяты этот показатель варьировал от 2,2 до 18,4.

Установлены особенности влияния длительности культивирования на размножение *in vitro*. В частности, у лаванды и душицы по мере субкультивирований вначале наблюдали повышение коэффициента размножения, который достиг максимума у лаванды во 2-3-м, а у душицы — в 5-м пассажах, а затем снижение этого показателя. У пяти сортов и образцов мяты наибольшие значения коэффициента размножения были отмечены в 4-5-м пассажах. В то же время у шалфея в течение первых трех пассажей коэффициент размножения достоверно не изменялся, а затем происходило его постепенное снижение.

На эффективность микроразмножения оказывало влияние расположение экспланта на побеге, полученном *in vitro*. При культивировании микрочеренков, выделенных из средней части побега, коэффициенты размножения были выше по сравнению с нижними узлами и верхушкой побега у шалфея в 1,3–2,8 раза, а у душицы в 2,2–5,1 раза. У мяты также отмечена тенденция повышения этого показателя при выделении эксплантов из средней части побега. В то же время при микроразмножении лаванды показано, что коэффициент размножения у эксплантов из верхней части побега был в 1,2–1,9 раз выше, чем у микрочеренков из средней и нижней зоны микроразмножения. Работа выполнена в рамках Государственного задания № 0834-2015-0006 и при поддержке гранта РФФИ № 18-416-910008 p_a.

Some aspects of propagation *in vitro* for cultivars and breeding samples of essential oil plants in the family Lamiaceae

**Yegorova N. A., Yakimova O. V., Stavtseva I. V., Zagorskaya M. S.,
Tevfik A. Sh.**

Research Institute of Agriculture of Crimea, 150 Kievskaya st., 295493, Simferopol,
tel./fax: (3652)56-00-07, e-mail: yegorova.na@mail.ru

Family Lamiaceae contains about 250 genera, many of which are grown as essential oils, spicy aromatic and medicinal plants. Active use in the pharmaceutical and food industries, perfumery and cosmetics as well as in medicine promotes great interest to these plants from a practical and scientific point of view. For many years FSBSI "Research Institute of Agriculture of Crimea" has been working on the creation of new cultivars of essential oil plants. In this regard, it is very important to develop biotechnological methods that improve the efficiency of traditional methods of plant breeding and seed production. Clonal micropropagation is one of the most popular methods. The aim of the work was to study the peculiarities of propagation *in vitro* for cultivars and breeding samples grown in the Crimea of essential oil plants in the family Lamiaceae at the second stage of clonal micropropagation. Cultivars and breeding samples of lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.), sage (*Salvia sclarea* L.), oregano (*Origanum vulgare* L.), mint (*Mentha spp.*), lemon balm (*Melissa officinalis* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) were used for research. Stem segments with a node isolated from shoots, obtained from meristem cultures, were used as explants in these experiments.

Multiple shoot formation was observed in all studied genotypes at the 2nd stage (micropropagation proper). The expediency of using two methods (induction of adventitious shoots and microshoots cutting) for propagation *in vitro* in the analyzed species was shown. This allows to increase the multiplication index. Factors that influence explant morphogenesis — genotype and growing conditions of the donor plant, composition of the culture medium, type and origin of the explant, cultivation conditions and subcultures number were revealed. Specific features of changes in morphometric parameters of explants development and the multiplication index have been determined depending on these factors. The multiplication index was the highest for oregano (up to 74.1), lavender (up to 24.5), thyme (up to 21.3) and minimum — for sage (up to 9.7). This index varied from 2.2 to 18.4 for different cultivars and samples of mint.

Specific features of the effect of cultivation duration on propagation *in vitro* were established. In particular, during lavender and oregano subcultivation, an increase of the multiplication index was initially observed; it peaked for lavender in 2nd-3rd, and for oregano — in 5th passages; then the decrease of this index was noted. In the 4–5th passages, the highest multiplication index was identified for five mint cultivars and samples. At the same time, the multiplication index of sage did not change significantly during the first three passages, and then it gradually decreased.

The location of the explant on the shoot obtained *in vitro* had an effect on the efficiency of micropropagation. It was shown that during cultivation microcuttings isolated from the middle part of the shoot, multiplication index was 1.3–2.8 times higher for sage, and 2.2–5.1 — for oregano compared to lower nodes and shoot apex. There was also a tendency of increase of this index for mint when explants were isolated from the middle part of the shoot. At the same time, during lavender micropropagation it was identified that the multiplication index for explants from the upper part of the shoot was 1.2–1.9 times higher than for microcuttings from the middle and lower zones of the microshoot.

This work was supported by the Budget project No. 0834-2015-0006 and Russian Foundation for Basic Research grant No. 18-416-910008 p_a.

Устойчивость растений *Trifolium repens* L., полученных путем клеточной селекции, к ионам меди

Ермошин А. А., Неугодникова Е. А., Киселёва И. С.

Уральский федеральный университет, пр. Ленина, 51, Екатеринбург, 620000, Россия,
тел.: +7(343)389-97-28, e-mail: Alexander.Ermoshin@urfu.ru

Загрязнение среды тяжелыми металлами (ТМ) является весьма распространенным типом антропогенного воздействия на экосистемы. В Уральском регионе один из наиболее значимых поллютантов — ионы меди. Они высокотоксичны для всех живых организмов. Получение растений, устойчивых к высоким дозам этого металла является важной задачей как для понимания механизмов устойчивости растений к Cu^{2+} , так и создания форм, которые могут быть использованы для целей фиторемедиации.

В качестве объекта для клеточной селекции был выбран клевер ползучий (*Trifolium repens* L.), как широкораспространенный вид, используемый как газонное, медоносное, пастбищное растение.

Были определены токсичные и летальные дозы ионов меди для проростков клевера, на основании чего выбраны селекционные концентрации — 100 и 200 мкМ.

Проведена ступенчатая клеточная селекция. Из семядольных листьев клевера был получен первичный каллус на среде МС с 3% сахарозы, 1 мг/л БАП и 1 мг/л НУК. Через 4 пассажа был получен каллус, стабильно растущий на 200 мкМ ионов меди в среде, в то время как при непосредственном переносе семядольных листьев на среду с этими концентрациями ионов меди клетки погибали. Полученные устойчивые клеточные линии переносили на среды для регенерации, рекомендованные для каллусов клевера, однако они потеряли морфогенность.

Для получения растений-регенерантов, устойчивых к высоким дозам ионов меди, был опробован другой подход. В качестве источника первичного каллуса использовали не семядольные листья, а стерильные семена, высаженные непосредственно на среду для каллусогенеза, в которую сразу было добавлено 200 мкМ ионов меди. В этом случае выживали и давали каллус только устойчивые клеточные варианты. На среде с ионами меди прорастало 38% семян, тогда как на среде без меди — 72% (контроль). Полученные каллусы были перенесены на среду для регенерации. В результате было получено 22 независимых регенеранта, которые далее были пасивированы на среду того же состава, но без фитогормонов. Микрклональное размножение полученных линий проводили на среде без токсиканта для устранения эпигенетических эффектов. В результате отобрано 10 наиболее активно растущих линий, из которых успешно к грунту было адаптировано 3.

Определение устойчивости полученных линий проводили на изолированных листьях, которые помещали черешками в раствор с 1 мМ сульфата меди на 18 ч. После этого определяли уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ), активность каталазы, пероксидазы и супероксиддисмутазы (СОД).

Воздействие меди во всех вариантах опыта вызвало незначительное увеличение уровня ПОЛ, что может быть связано с тем, что черешок выполняет барьерную функцию, при транспорте ионов меди в лист. Существенного изменения активности СОД во всех вариантах также не было. При этом активность каталазы и пероксидазы менялась значительно. В контрольном варианте действие ионов меди вызвало снижение активности пероксидазы почти на 50%, в то время как у селекционных вариантов активность фермента не только не падала, но возрастала до 25%. Активность каталазы в контроле также уменьшалась в два раза, в то время как у опытных растений возрастала в 2–4 раза. Таким образом, линии клевера ползучего, полученного методом клеточной селекции, обладают более высокой активностью ферментов окислительного стресса, что позволяет судить об их большей потенциальной устойчивости к ионам меди.

Tolerance to copper ions in *Trifolium repens* L. plants, obtained by cell selection

Ermoshin A. A., Neugodnikova E. A., Kiseleva I. S.

Ural Federal University, 51 Lenin ave., 620000, Ekaterinburg, Russian Federation,
tel.: +7(343)389-97-28, e-mail: Alexander.Ermoshin@urfu.ru

.....

Environmental pollution by heavy metals (HM) is a very common type of anthropogenic impact on ecosystems. Copper ions are the most significant pollutants in the Ural region. They are highly toxic to all living organisms. Selection of plants tolerant to high levels of this metal is an important task both for understanding the mechanisms of plant resistance to Cu^{2+} and for creating forms that can be used for phytoremediation purposes.

White clover (*Trifolium repens* L.) was chosen as an object for cell selection. It is a widespread species used as a lawn, honey and pasture plant.

Toxic and lethal doses of copper ions were determined for clover seedlings and concentrations of 100 and 200 μM were chosen according to this study as selective factor.

Step cell selection was carried out. A primary callus was obtained from clover cotyledons on MS medium with 3 % sucrose, 1 mg/l BAP, and 1 mg/l NAA. Through 4 passages the callus cultures growing at medium with 200 μM copper ions concentration were obtained, while cells directly placed to medium with copper ion concentrations died. The resulting stable cell lines were transferred to regeneration media recommended for clover calli, but they lost the ability to morphogenicity.

To obtain regenerating plants tolerant to high doses of copper ions, another approach has been tested. The primary callus was obtained from sterile seeds, planted directly on the medium for callus genesis with immediately added 200 μM copper ions. In this case, only stable cell lines survived and gave callus. 38 % of the seeds germinated on the medium with copper ions, whereas on medium without copper — 72 % (control). The resulting calli were transferred to the medium for regeneration. As a result, 22 independent regenerates were obtained and then were passivated on the same medium, but without phytohormones. To eliminate epigenetic effects microclonal propagation of the obtained lines were proceeded in a medium without toxicant. As a result, 10 most actively growing lines were selected, three of them were successfully adapted to soil cultivation.

Evaluation of the line's stability was done on isolated leaves that were placed in 1 mM copper sulfate solution by petioles for 18 hours. After this the level of lipid peroxidation, activity of catalase, peroxidase and superoxide dismutase (SOD) in leaves were measured.

Exposition to copper caused a small increase in the level of lipid peroxidation in all variants of the experiment, that could be due to the barrier function of the petiole while translocating copper ions to the leaves. No significant changes in SOD activity in all specimens were also detected. In this case, the activity of catalase and peroxidase changed significantly. In the control variant, the effect of copper ions caused a decrease in peroxidase activity by almost 50 %, while in the selected lines the activity of the enzyme increased to 25 %. The catalase activity in the control plants also decreased 2-fold, while in the experimental plants it increased from 2 to 4 times. Thus, the white clover lines obtained by cell selection method revealed a higher activity of oxidative stress enzymes, which makes it possible to presume their greater potential tolerance to copper ions.

Новые промоторы генов антимикробных пептидов из *Stellaria media* L. для генетической трансформации растений

**Ефремова Л. Н., Казакова К. А., Маджарова Н. В.,
Стрельникова С. Р., Комахин Р. А.**

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии,
ул. Тимирязевская, 42, Москва, 127550, Россия, тел.: +7(499)977-99-63, e-mail: recombination@iab.ac.ru

Ранее практически все трансгенные растения содержали два гетерологичных гена, один из которых находился под контролем конститутивного промотора и использовался для селективного отбора трансформированных клеток, а другой «целевой» ген — под контролем промотора любого типа был предназначен для изменения фенотипа растения. В настоящее время возможности мультигенной трансформации делают доступными импорт в растения целых метаболических путей, включающих экспрессию протеиновых комплексов из нескольких «целевых» генов, и создание трансгенных растений, одновременно производящих целый спектр соединений. Известно, что использование одного и того же промотора для нескольких рекомбинантных генов при мультигенной трансформации может иметь негативное влияние на их экспрессию и наследование. Более предпочтительно использовать различные промоторы со схожим уровнем и профилем экспрессии. В настоящее время ощущается дефицит доступных растительных промоторов с необходимыми параметрами, поэтому пополнение их списка весьма желательно.

Ранее нами с коллегами из растения мокрицы (*S. media*) были клонированы нуклеотидные последовательности промоторов pro-SmAMP1 (MF461278) и pro-SmAMP2 (KX196447). Их свойства оценивали по экспрессии репортерного гена *uidA* и селективного гена неомифосфотрансферазы II (*nptII*). При транзientной экспрессии в растениях *Nicotiana benthamiana* (Domin) промотор pro-SmAMP1 оказался в два раза сильнее, чем pro-SmAMP2. По эффективности в *N. benthamiana* оба промотора в 2–4 раза превосходили вирусный промотор CaMV35S, а в растениях рапса (*Brassica napus* L.) и сахарной свёклы (*Beta vulgaris* L.) были сопоставимы с ним. Функциональность pro-SmAMP2 показана в каллусах растений льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.). В гомозиготных линиях трансгенных растений табака (*Nicotiana tabacum* L.) оба промотора в 2 раза сильнее, чем вирусный промотор CaMV35S. По эффективности контроля гена *nptII* при селекции трансгенных растений табака и арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana* L.) на средах с антибиотиком канамицином в рекомендованных концентрациях оба промотора не уступают дублицированному вирусному промотору 2xCaMV35S. Короткие делеционные варианты pro-SmAMP1 и pro-SmAMP2 рекомендуются для использования в биотехнологии культурных растений в качестве сильных и конститутивных промоторов.

Коровые области pro-SmAMP1 и pro-SmAMP2 до –121 п. н. относительно сайта инициации транскрипции идентичны на 94% и различаются точечными заменами или инсерциями/делециями. В докладе впервые будут представлены экспериментальные результаты о функциональности регуляторных полиморфизмов в коровых последовательностях промоторов, обуславливающих превосходство pro-SmAMP1 над pro-SmAMP2 при транзientной экспрессии в *N. benthamiana* (Domin).

Кроме этого из генома *S. media* нами впервые в мире были клонированы промоторы генов антимикробных пептидов pro-SmAMPX и pro-SmAMPD. С помощью компьютерных программ показано, что их нуклеотидные последовательности не имеют видимой гомологии с pro-SmAMP1 и pro-SmAMP2, а также между собой. Предварительные эксперименты свидетельствуют, что pro-SmAMPX и pro-SmAMPD сопоставимы по эффективности с вирусным промотором CaMV35S.

New promoters of antimicrobial peptides genes from *Stellaria media* L. for genetic transformation of plants

Efremova L. N., Madzharova N. V., Kazakova K. A., Strelnikova S. R., Komakhin R. A.

All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, 42 Timiriazevskaya st., 127550, Moscow, Russian Federation, tel.: +7(499)977-99-63, e-mail: recombination@iab.ac.ru

.....

Formerly, virtually all transgenic plants contained two heterologous genes; one of them was a selection marker gene controlled by a constitutive promoter and the other was a target gene destined to change the plant phenotype controlled by a promoter of any type. At present, multigene transformation allows the import into plants of the entire metabolic pathways, including expression of protein complexes consisting of several target genes as well as generation of transgenic plants producing multiple compounds simultaneously. It is a well known fact that using the same promoter for several recombinant genes in multigene transformation may negatively affect their expression and inheritance. Preferable is employing different promoters with similar level and profile of expression. Currently, the set of available plant gene promoters with any particular parameters is scant and introduction of the new ones is highly desirable.

Earlier we with colleagues cloned from chickweed (*S. media*) plants the nucleotide sequences of the pro-SmAMP1 (MF461278) and pro-SmAMP2 (KX196447) promoters. Their properties were evaluated by expression of the reporter gene *uidA* and the selective gene of neomycin phosphotransferase II (*nptII*). In transient expression in *Nicotiana benthamiana* (Domin) plants pro-SmAMP1 promoter was twice as strong as the pro-SmAMP2 promoter. In *N. benthamiana*, both promoters were by 2–4 times more efficient than the CaMV35S viral promoter, and in rape plants (*Brassica napus* L.) and sugar beet (*Beta vulgaris* L.) were comparable with it. The functionality of the pro-SmAMP2 was shown in the calluses of flax (*Linum usitatissimum* L.) plants. In the homozygous lines of transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plants, the pro-SmAMP1 and pro-SmAMP2 are twice as strong as the CaMV35S promoter. Both promoters are at least as effective as the duplicated 2xCaMV35S promoter for *nptII* gene control in the selection of transgenic tobacco and arabidopsis (*Arabidopsis thaliana* L.) plants on media with antibiotic kanamycin at recommended concentrations. Short deletion variants of the pro-SmAMP1 and pro-SmAMP2 are recommended for use in the biotechnology of cultivated plants as strong and constitutive promoters.

The core regions pro-SmAMP1 and pro-SmAMP2 up to –121 bp relative to the transcription start site are identical by 94% and differ by point replacements or insertions/deletions. In the report, the experimental results on the functionality of regulatory polymorphisms in the core regions sequences of promoters causing the superiority of pro-SmAMP1 over pro-SmAMP2 in transient expression in *N. benthamiana* (Domin) will be presented for the first time.

In addition, for the first time in the world, the promoters of the pro-SmAMPX and pro-SmAMPD antimicrobial peptide genes were cloned from the *S. media* genome. Using computer programs, it has been shown that their nucleotide sequences have no apparent homology with the pro-SmAMP1 and pro-SmAMP2 promoters and with each other. Preliminary experiments indicate that pro-SmAMPX and pro-SmAMPD are comparable in effectiveness to the CaMV35S viral promoter.

Физиолого-биохимические особенности каллусных тканей *Ajuga turkestanica*

Закирова Р. П.¹, Эшбакова К. А.¹, Сагдуллаев Ш. Ш.¹, Носов А. М.²

¹ Институт химии растительных веществ им. акад. С. Ю. Юнусова АН РУз, ул. М. Улугбека, 77, Ташкент, 100170, Узбекистан, факс: +998(71)120-64-75, тел.: +998(71)262-59-13, e-mail: ranozakirova@mail.ru

² Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, ул. Ботаническая, 35, Москва, 127276, Россия,

Широкое использование природных источников растительного сырья привело к стремительному сокращению их запасов. Многие растения, представляющие практический интерес, относятся к редким или эндемичным видам. Поэтому поиск альтернативного возобновляемого растительного сырья весьма актуален.

В связи с этим культивирование тканей и клеток растений *in vitro* приобретает особую актуальность. Метод является одним из способов сохранения генофонда ценных растений и способствует ускоренному решению некоторых фундаментальных и прикладных аспектов. *Ajuga turkestanica* (Rgl.) Briq. (Lamiaceae) является эндемиком Западного Тянь-Шаня и Гиссаро-Алая. Растение продуцирует экидистероиды и другие биологически активные вещества.

Целью настоящего исследования являлось изучение биосинтетической активности двух линий каллусных тканей *Ajuga turkestanica*.

Исходная клеточная культура была получена из листьев дикорастущего растения и выращивалась на питательной среде Мурасиге-Скуга с добавлением сахарозы 30 г/л, мезоинозита 100 мг/л, тиамин HCl 0,4 мг/л при температуре 26°C в темноте.

В процессе культивирования на безгормональной среде были выделены две линии: дедифференцированная каллусная ткань, отличающаяся активным ростом, и линия, характеризующаяся высоким морфогенным потенциалом.

Проведен химический анализ каллусных тканей методом ВЭЖХ. Было выявлено, что при двухлетнем культивировании исследуемых линий наблюдалось снижение содержания экидистероидов, но сохранялся высокий выход фенолпропаноидов.

Установлена антифунгальная активность каллусов *Ajuga turkestanica* в отношении *Fusarium oxisporum* Schrf. *Vasinfestum* Bilai. Обе линии каллусной ткани подавляют рост колонии гриба на 45%. Установлено, что под влиянием гормональных факторов антифунгальная активность повышалась.

Physiological and biochemical features of callus tissue *Ajuga turkestanica*

Zakirova R. P.¹, Eshbakova K. A.¹, Sagdullaev Sh. Sh.¹, Nosov A. M.²

¹ Acad. S. Yu. Yunusov Institute of the Chemistry of Plant Substances of the Academy of Sciences of Uzbekistan, 77 Ulugbek st., 100170, Tashkent, Uzbekistan, fax: +998(71)120-64-75, tel.: +998(71)262-59-13, e-mail: ranozakirova@mail.ru

² K. A. Timiryazev Institute of Plant Physiology Russian Academy of Sciences, 35 Botanicheskaya st., 127276, Moscow, Russian Federation, fax: (499) 678-54-20

.....

The widespread use of natural sources of plant raw materials led to a rapid reduction in their reserves. Many plants of practical interest belong to rare or endemic species. Therefore, the search for alternative renewable plant raw materials is actual.

In connection with this, the cultivation of tissues and plant cells *in vitro* is getting particular urgency. The method is one of the ways to preserve the gene pool of valuable plants and promotes an accelerated solution of some fundamental and applied aspects.

Ajuga turkestanica (Rgl.) Briq. (Lamiaceae) is an endemic to the Western Tien-Shan and Gissar-Alai. The plant produces ecdysteroids and other biologically active substances.

The purpose of this study was to study the biosynthetic activity of two lines of callus tissue *Ajuga turkestanica*.

The initial cell culture was obtained from the leaves of a wild plant and grown on the nutrient medium of Murasige and Skooga with the addition of sucrose 30 g/l, mesoinositol 100 mg/l, thiamine HCl 0.4 mg/l at 26°C in the dark.

In the process of cultivation on the hormone-free medium, two lines were distinguished: a dedifferentiated callus tissue characterized by active growth and a line characterized by a high morphogenic potential.

A chemical analysis of callus tissues was carried out by HPLC. It was found that a two-year cultivation of the lines under study resulted in a decrease in the content of ecdysteroids, but a high yield of phenylpropanoids remained.

The antifungal activity of calli *Ajuga turkestanica* against *Fusarium oxisporum* Schrf. *Vasinfestum Bilai*. Both lines of callus tissue suppress the growth of the fungal colony by 45 %. It was found that under the influence of hormonal factors antifungal activity increased.

Индукция морфогенеза *in vitro* и гистологический анализ процессов регенерации из флоральных эксплантов *Rhododendron dauricum* L.

Зайцева Ю. Г., Полубоярова Т. В., Мурасева Д. С., Новикова Т. И.

Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения РАН,
ул. Золотодолинская, 101, Новосибирск, 630090, Россия,
факс: +7(383)330-19-86, тел.: +7(383)339-98-29, e-mail: ulianna_zaitseva@mail.ru

Культура клеток высших растений представляет собой уникальную модель для исследования фундаментальных основ морфогенеза растений. Благодаря отсутствию организменного контроля процессов развития и использованию экзогенных регуляторов роста системы *in vitro* могут играть важную роль в понимании механизмов морфогенеза, что открывает широкие перспективы применения метода культуры ткани для решения различных фундаментальных и прикладных задач. Несмотря на большой пласт работ по клональному микроразмножению представителей рода *Rhododendron* L. исследования по воспроизводству дикорастущих видов Сибири и Дальнего Востока единичны. Протоколы, разработанные для размножения вечнозеленых сортов, зачастую не эффективны для дикорастущих листопадных рододендронов из-за генотипических различий. Более того, основная цель большинства исследований по микроразмножению рододендронов связана с оптимизацией условий для массового получения микроклонов, а фундаментальный аспект, включающий детальное исследование хронологической последовательности этапов морфогенеза, отсутствует. В настоящей работе представлена система регенерации из флоральных эксплантов *Rhododendron dauricum* L. с использованием различных регуляторов роста, включая тидиазурон (ТДЗ), и проанализированы особенности морфогенеза с точки зрения гистологического анализа.

В результате разработан двухступенчатый протокол прямой регенерации побегов из флоральных эксплантов *R. dauricum*, включающий два этапа: предкультивирование в течение 4-х дней на безгормональной среде Андерсона и индукцию морфогенеза при помощи ТДЗ и зеатина. Флоральные экспланты (пестики с цветоножками) изолировали из цветочных почек перед началом цветения. Предкультивирование флоральных эксплантов *R. dauricum* способствовало двукратному повышению частоты регенерации и сокращению продолжительности процессов морфогенеза. Регенерация побегов происходила на цветоножке.

Проведенный гистологический анализ начальных этапов морфогенеза показал участие эпидермальных клеток цветоножки в процессах регенерации. Кроме эпидермальных клеток в процессах морфогенеза участвуют остатки меристем, находившиеся в пазухах почечных чешуй, удаленных при изоляции эксплантов. В процессе предкультивирования на безгормональной среде происходит рост паренхимных клеток экспланта и активация делений эпидермальных клеток и пазушных меристем. После переноса на индукционную среду на 7 день эксперимента в поверхностном слое эпидермы начинают формироваться центры клеточных делений, из которых впоследствии формируются адвентивные побеги. Параллельно происходит развитие пазушных меристем, закладка и формирование пазушных почек. Таким образом, регенерация из флоральных эксплантов, индуцированная ТДЗ, происходит по прямому пути морфогенеза, но в основе его лежат два параллельных процесса: дедифференциация эпидермальных клеток с последующим приобретением компетенции к морфогенезу и активация и развитие уже существующих меристем.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 17-04-00782

Induction of *in vitro* morphogenesis and histological analysis of regeneration processes from *Rhododendron dauricum* L. floral explant

Zaytseva Y. G., Poluboyarova T. V., Muraseva D. S., Novikova T. I.

Central Siberian Botanical Garden, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
101 Zolotodolinskaya st., 630090, Novosibirsk, Russian Federation,
fax: +7(383)330-19-86, tel.: +7(383)339-98-29, e-mail: ulianna_zaitseva@mail.ru

.....

A cell culture of vascular plants is a unique model for basic research of the plant morphogenesis. Due to the lack of organismic control of developmental processes and the use of exogenous plant growth regulators, *in vitro* systems can play an important role in understanding the mechanisms of morphogenesis, which provides wide prospects for the application of tissue culture method for solving various fundamental and applied problems. In spite of a large amount of data on clonal micropropagation of representatives of the genus *Rhododendron* L, there are few studies on the propagation of wild species of Siberia and the Russian Far East. Protocols developed for multiplication of evergreen cultivars are often not efficient for wild semi-evergreen or deciduous rhododendrons due to genotypic differences. Moreover, the main goal of these studies is related to optimization of conditions for rhododendron micropropagation, whereas a fundamental aspect including detailed study of the chronological sequences of morphogenesis stages is absent. This study presents a regeneration system from *Rhododendron dauricum* L. floral explants using various plant growth regulators including thidiazuron (TDZ) and the detailed histological analysis throughout the process of morphogenesis.

As a result, a two-step protocol of the direct shoot regeneration from floral explants of *R. dauricum* consisting of two stages: preculture for 4 days on hormone-free medium and induction of morphogenesis on medium supplemented with TDZ and zeatin was developed. Floral explants (pistils with pedicels) were isolated from flower buds before flowering. The preculture of *R. dauricum* floral explants resulted in a twofold increase in the regeneration frequency and reduction in the duration of the morphogenesis processes. The regeneration of shoots occurred on the pedicel of explants.

The histological analysis of the initial stages of morphogenesis showed the involvement of epidermal cells of the pedicel in the regeneration processes. Besides the epidermal cells, the residual meristems that were located in the base of bud scales removed during explant isolation were also involved in the morphogenesis processes. The growth of parenchymal cells, activation of division of epidermal cells and axillary meristems occurred during preculture process. After 7 days of explant transferring to the induction medium, the centers of cell division were observed in the surface layer of the epidermis that finally led to the formation of adventitious shoots on the pedicel. At the same time, the development of axillary meristems and axillary bud formation were observed. Thus, the TDZ-induced regeneration from the floral explants occurred through the direct morphogenesis pathway, but it was based on two parallel processes: the dedifferentiation of the epidermal cells with the subsequent acquisition of competence to morphogenesis as well as the activation and development of existing meristems.

The reported study was funded by Russian Foundation for Basic Research (RFBR) according to the research project No. 17-04-00782.

Использование метода гаплоидии (андрогагенез *in vitro*) в селекционном процессе злаковых культур Юга Украины

Замбриборщ И. С., Шестопап О. Л.

Селекционно-генетический институт — Национальный центр семеноведения
и сортоизучения НААН Украины, Овидиопольская дорога, 3, Одесса, 65036, Украина,
факс: +380(48)789-52-89, тел.: +380(48)789-54-01, 789-54-27, e-mail: izambriborsh@gmail.com

Использование гаплоидных технологий весьма целесообразно в селекционных программах злаков, направленных на ускорение адаптации в местном генофонде новых генов, контролируемых ценными признаками от гибридов, содержащих экзотическую геноплазму. Анализ результатов наших исследований и данных литературы показал, что уровень эффективности этой биотехнологии определяется генетической конституцией донорного материала, а совершенствование этапов процесса гаплопродукции будет постоянной задачей биотехнологов при введении в селекционную работу новых генотипов.

При тестировании гаплопродукционной способности 47 сортов и 143 гибридов F1 озимой мягкой пшеницы обнаружены различия как по частоте индукции каллюса, так и по способности к регенерации растений в процессе андрогагенеза *in vitro*. Диапазон варьирования показателей гаплопродукции был широким и составил по показателю «формирование каллюса» у сортов 0–21,2%, а у гибридов 0–38,8%; по показателю «регенерация зеленых растений»: у сортов 0–9,4%, у гибридов 0–9,1%. Показано положительное влияние 1BL / 1RS транслокации на показатели гаплопродукции в культуре изолированных пыльников *Triticum aestivum* L. Установлено, что гибриды F1 имеют больший гаплопродукционный потенциал в культуре пыльников, чем сорта. За период с 2011 по 2017 гг. в селекционные отделы передано 580 линий озимой мягкой пшеницы.

С целью выявления сортов-доноров гаплопродукции среди коллекции сортов *T. durum* Desf. исследовали морфогенетические реакции в процессе андрогагенеза *in vitro* 8 озимых и 15 яровых сортов пшеницы твердой. Показано, что генотипы демонстрируют различную индукционную способность в культуре пыльников *in vitro*. Максимальный уровень индукции новообразований наблюдали среди озимых форм у сорта 'Блестящий' (12,94±1,82), среди яровых — Чадо 1Р (8,52±1,46) и Харьковская 19 (9,09±2,50). Нечувствительными к предоставленным условиям культивирования оказались микроспоры в пыльниках одного озимого и пяти яровых сортов. Интересно, что для мягкой пшеницы характерен более высокий морфогенетический и регенерационный потенциал в культуре пыльников яровых форм, чем озимых, тогда как обе формы пшеницы твердой достоверно не различались по проявлению признака «формирование каллюса»: 0–12,94% (озимые) и 0–9,09% (яровые).

По результатам наших исследований андрогагенеза *in vitro* *Oryza sativa* L. показана перспективность и результативность проведения данных работ в Украине. В 2012–2017 гг. проведено тестирование морфогенетического потенциала в культуре пыльников риса 35 гибридных популяций F2 от межсортных скрещиваний между отечественными и иностранными сортами. Путем андрогагенеза *in vitro* в культуре пыльников риса за шесть лет получено 183 линии риса посевного (процент спонтанной диплоидизации 24,9%). В результате проведенной сотрудниками Института риса (г. Скадовск) селекционной оценки лучших линий, установлено, что полученные (в 2012 г.) линии риса характеризовались высокорослостью, более высокими показателями продуктивной кустистости, имели более плотную кисть, а также превышали оригинальные сорта по показателям продуктивности главной метелки (2,98–5,99 г против 2,34–5,15 г у стандартов в зависимости от группы спелости). Шесть линий переданы для регистрации в Национальный центр генетических ресурсов растений Украины.

Using of the haploid method (androgenesis *in vitro*) in the selection process of cereals in the South of Ukraine

Zambriborshch I. S., Shestopal O. L.

*Plant Breeding & Genetics Institute — National Center of Seed and Cultivar Investigation,
3 Ovidiopolskaya road, 65036, Odessa, Ukraine,
fax: +380(48)789-52-89, tel.: +380(48)789-54-01, 789-54-27, e-mail: izambriborsh@gmail.com*

The using of haploid technologies is highly advisable in cereal breeding programs aimed at accelerating adaptation in the local gene pool of new genes that control valuable attributes from hybrids containing exotic genoplasm. The analysis of our studies results and literature data has shown that the level of effectiveness of this biotechnology is determined by the genetic constitution of the donor material, and the improvement of the haploproduction process stages will be a constant problem for biotechnologists when introducing new genotypes into breeding.

When testing the haploproduction capacity of 47 varieties and 143 hybrids F1 of winter soft wheat, differences both in the frequency of induction of callus and in the ability to regenerate plants during androgenesis *in vitro* were found. The variation range in haploproduction indices was wide and amounted on the sign “callus formation”: 0–21.2 % in varieties and 0–38.8 % in hybrids; on the sign “regeneration of green plants”: 0–9.4 % in varieties, 0–9.1 % in hybrids. The positive effect of 1BL / 1RS translocation on haploproduction indices in anther culture of *Triticum aestivum* L. was shown. The F1 hybrids have been found to have a greater haploproduction potential in anther culture than varieties. During 2011 to 2017 the 580 lines of winter soft wheat were transferred to the breeding departments.

The varieties of donor haploproduction of among the varieties collection of *T. durum* Desf. were identify. Morphogenetic reactions in the process of androgenesis *in vitro* of 8 winter and 15 spring wheat varieties were studied. It is shown that the genotypes demonstrate a different induction capacity in anther culture *in vitro*. The maximum level of tumors induction was observed among the winter forms in the variety ‘Blestyashy’ (12.94±1.82), among the spring forms — Chado 1P (8.52±1.46) and Kharkov 19 (9.09±2.50). Insensitive to the provided cultivation conditions were microspores in the anthers of one winter and five spring varieties. It is interesting that spring soft wheat has a higher morphogenetic and regeneration potential in the anthers culture than in winter forms, whereas both forms of hard wheat didn't significantly differ in the manifestation of the sign “callus formation”: 0–12.94 % (winter) and 0–9.09 % (spring forms).

The prospects and effectiveness of works to androgenesis *in vitro* *Oryza sativa* L. in Ukraine were reflected in the results of our studies in 2012–2017. The morphogenetic potential in the anther culture of 35 hybrid F2 populations from crossings between domestic and foreign varieties was tested. By androgenesis *in vitro* in the rice anther culture during six years, 183 double haploid lines (a percentage of spontaneous diploidization of 24.9 %) were obtained. As a result of selection of the best lines made by the Institute of Rice (Skadovsk), it was established that the rice lines obtained in 2012 were characterized by tallness and exceeded the original varieties in terms of productivity of the main panicle (2.98–5.99 g versus 2.34–5.15 g for the standards, depending on the ripeness group). Six lines were transferred for registration to the National Center for Plant Genetic Resources of Ukraine.

Анализ изменения стабильности ДНК в клетках культуры протонемы мха *Physcomitrella patens* при засолении

Звонарев С. Н.¹, Мацкевич В. С.¹, Angelis K. J.², Демидчик В. В.^{1,*}

¹ Белорусский государственный университет, биологический факультет, кафедра клеточной биологии и биоинженерии растений, ул. Курчатова, 10, Минск, 220030, Беларусь, тел.: +375(17)209-59-12, факс: +375(17)209-58-08

² Institute of Experimental Botany, Academy of Sciences of Czech Republic, Rozvojová 263, 165 02 Praha 6, Czech Republic

* e-mail: dzemidchyk@bsu.by

Среди наземных растений лишь единицы способны выживать на почвах с высоким содержанием солей. Один из ярких примеров таких растений — мох *Physcomitrella patens*, который является отличным модельным организмом для изучения физиологии и эволюции растений. Мхи были первыми наземными растениями и имеют много физиологических сходств с солеустойчивыми водорослями. В этой связи детальное исследование реакций клеток мохообразных в ответ на засоление представляет значительный интерес для понимания фундаментальных механизмов солеустойчивости.

В данной работе мы подробно изучили ключевые первичные реакции *Physcomitrella patens* (*P. patens*) на избыток NaCl — образование супероксида, предшественника различных токсичных АФК, обнаруженных в растениях при засолении. Также нами было исследовано генотоксическое действие хлорида натрия.

В работе использовались 7-дневные протонемные клетки. Генерацию супероксидного анионного радикала определяли с использованием флуоресцентного зонда дигидроэтидиума (ДГЭ) с УФ-возбуждением и стандартного фильтра Nikon FITC для регистрации флуоресцентного излучения. Использовались две разных техники Comet: нейтральный Comet assay для обнаружения двунитевых разрывов ДНК и щелочной Comet assay который более чувствителен к одонитевым разрывам ДНК.

Обнаружено, что NaCl при концентрациях выше 200 мМ вызывает значительное увеличение интенсивности флуоресценции ДГЭ (на 150 % по сравнению с фоновыми значениями). Эффект NaCl увеличивался с концентрацией NaCl, достигая максимального значения при 300 мМ. В соответствии с рекомендациями производителя ДГЭ является селективным зондом по отношению к $O_2^{\cdot -}$, однако результаты наших тестов показали, что он чувствителен ко многим АФК. Супероксиддисмутаза уменьшала индуцированную NaCl флуоресценцию ДГЭ на 40–45 % при 200–300 мМ NaCl и на 60 % при 400 мМ NaCl. Эти данные показывают, что по меньшей мере половина ДГЭ-сигнала происходит от супероксида, а другая половина, вероятно, вызвана другими АФК. Тиомочевина, которая известна как специфический •ОН-скевенджер, уменьшала индуцированную NaCl флуоресценцию ДГЭ на 20 % при 200 мМ NaCl и на 30 % при 300 и 400 мМ NaCl, соответственно. Это означает, что значительная часть сигнала ДГЭ также была вызвана реакцией с гидроксильными радикалами. Восстановленный глутатион, диметилсульфоксид и спермин также модифицировали индуцированный NaCl сигнал ДГЭ. Эти вещества вызывали 40–50 % снижение сигнала ДГЭ при 200–300 мМ NaCl и 25–30 % при 400 мМ NaCl.

Эксперименты с использованием техники СОМЕТ показали, что 100 мМ NaCl вызывает значительное увеличение дву- и одноцепочечных разрывов ДНК. Обработка 300 и 500 мМ NaCl увеличивала количество двуцепочечных разрывов ДНК на 3–3,5 и 4–4,5 раза соответственно. Скевенджеры гидроксильных радикалов, такие как тиомочевина или диметилсульфоксид, частично ингибировали образование разрывов ДНК в ответ на NaCl.

В целом, нами было обнаружено, что NaCl вызывает образование АФК в *P. patens*, которые могут быть измерены с помощью зонда ДГЭ. Супероксидный и гидроксильный радикалы доминирующие фракции АФК при солевом стрессе в *P. patens*. Высокие уровни NaCl вызывают одно- и двуцепочечные разрывы ДНК в *P. patens*, образование которых ингибируется скевенджерами гидроксильного радикала.

NaCl causes DNA instability in the protonema cells of moss *Physcomitrella patens*

Zvonarev S. N.¹, Mackievic V. S.¹, Angelis K. J.², Demidchik V. V.¹

¹ Belarusian State University, Biological Faculty, Department of Plant Cell Biology and Bioengineering, 10 Kurcatava st., 220030, Minsk, Republic of Belarus, tel. +375 (17) 209-59-12, fax. +375 (17) 209-58-08

² Institute of Experimental Botany, Academy of Sciences of Czech Republic, Rozvojová 263, 16502 Praha 6, Czech Republic, e-mail: dzemidchik@bsu.by

Only few plant species can survive under severe salinity conditions. One prominent example is a moss *Physcomitrella patens*, which is a great model organism for plant physiology and evolution studies. Green algae that are ancestors of mosses lived in saline water and had an efficient protection against NaCl. Higher plants have lost their protection against NaCl while some mosses still maintain them. Mosses were first terrestrial plants and share many physiological features with salt-tolerant alga. In this respect, study of salt response in mosses can reveal some hidden fundamental mechanisms of plant salt tolerance.

We have investigated in details a key primary reaction of *Physcomitrella patens* (*P. patens*) to NaCl — the generation of superoxide, a precursor of various toxic ROS detected in plants under high salinity and have also addressed a very important question of the DNA damage under salt stress.

In work used 7-days old protonemal cells and 1-day liquid culture of protonemal cells (for Comet assay). The superoxide anion radical generation was tested using a fluorescent probe dihydroethidium (10^{-6} M; Sigma, USA) with UV excitation and standard Nikon FITC filter (B-2E) for recording fluorescence emission (to avoid chlorophyll autofluorescence). Two different Comet assays were used: neutral Comet assay modified for detection of double-strand breaks and alkaline Comet assay, which is more sensitive to single-strand DNA breaks. The fraction of DNA in comet tails (% tail-DNA) was used as a measure of DNA damage.

Growth tests have demonstrated that *P. patens* can tolerate as much as 200–500 mM NaCl therefore these NaCl concentrations were used in assays with DHE and COMET. We have found that NaCl at concentrations above 200 mM caused significant increase in an intensity of DHE fluorescence (up to 150% as compared to background values). The effect of NaCl increased with NaCl concentration, reaching the maximal value at 300 mM. Accordingly to manufacturer's guidance DHE is selective to $O_2^{\cdot-}$, however our tests demonstrated that this probe is sensitive to many ROS. The superoxide dismutase decreased NaCl-induced DHE fluorescence by 40–45% and 60% at 200–300 mM NaCl and 400 mM NaCl, respectively. These data show that at least a half of DHE signal originated from superoxide, while another half is probably caused by other ROS. Thiourea, which is known as specific $\cdot OH$ -scavenging agent, reduced NaCl-induced DHE fluorescence by 20% at 200 mM NaCl and by 30% at 300 and 400 mM NaCl, respectively. This means that significant portion of DHE signal was from reaction with hydroxyl radicals too. Reduced glutathione, dimethyl sulfoxide and spermine also modified NaCl-induced DHE signal. These substances caused 40–50% reduction in DHE signal at 200–300 mM NaCl and 25–30% at 400 mM NaCl.

Tests with COMET assay have demonstrated that 100 mM NaCl induced significant increase in the quantity of double strand DNA breaks (100–120% increase compared to control). Treatment by 300 and 500 mM NaCl increased the number of double strand DNA break by 3–3.5 and 4–4.5 times, respectively. Hydroxyl radical scavengers, such as thiourea or DMSO partially inhibited formation of DNA breaks in response to NaCl.

Overall, our data demonstrated that NaCl induces production of ROS in *Physcomitrella patens*, which can be measured by DHE probe. Superoxide and hydroxyl radicals dominate ROS generation under salt stress in *Physcomitrella patens*. High NaCl levels trigger single and double strand breaks of DNA in *Physcomitrella patens*, which are inhibited by hydroxyl scavengers.

Клональное микроразмножение *Thuja occidentalis* L.

**Зонтиков Д. Н.¹, Зонтикова С. А.¹, Шургин А. И.², Сергеева Ю. А.²,
Бастракова А. Ю.², Клева О. С.², Майорова А. В.², Смирнова А. А.²,
Сергеев Р. В.²**

¹ Костромской государственной университет им. Н. А. Некрасова, ул. 1 Мая, 14,
Кострома, 156000, Россия, тел.: +7(910)371-23-33, zontikovd@mail.ru

² Поволжский государственный технологический университет, пл. Ленина, 3,
Йошкар-Ола, 424000, Россия, тел.: +7(917)705-05-09, e-mail: rsergeyev@yahoo.com

.....

Различные сорта и формы *Thuja occidentalis* L. активно используют для озеленения населенных пунктов, а также в фармацевтической промышленности благодаря эфирным маслам, которые выделяют из молодых побегов.

Для получения посадочного материала *T. occidentalis* преимущественно используют метод вегетативного размножения, при котором побеги 15–20 см в возрасте двух лет обрабатывают ауксинами и помещают в парники с регулируемым климатом, где происходит процесс укоренения. Однако данный метод имеет ряд существенных недостатков, риск передачи инфекции, а также ограничение по количеству получаемого материала. По этой причине особое значение приобретает использование метода клонального микроразмножения.

Для введения в культуру *in vitro* использовали молодые побеги, которые изолировали с растений в июне, августе и октябре месяце. Вначале изолированные побеги промывали в водном растворе перманганата калия и стерильной воде. Стерилизацию растительного материала в условиях ламинарного бокса проводили 70 % раствором этанола и водным раствором 3 % гипохлорита натрия, с последующим промыванием в стерильной дистиллированной воде. На питательную среду помещали части побега длиной до 2,5 см.

Изучали активность морфогенеза в зависимости от времени введения в культуру донорных эксплантов, изолируемых весной, летом и осенью; влияние используемой питательной среды — MS, Q&L и Anderson при введении в культуру *in vitro* дополненную регуляторами роста 2-ip от 1 до 3 мг/л и NAA от 0,1 до 0,3 мг/л. Установили зависимость скорости роста побегов на этапе микрочеренкования от 6 BA в концентрации от 0,5 до 1,5 мг/л; 2-ip — от 1,0 до 3,0 мг/л и Kin в концентрации 1,0 мг/л. Укореняли полученные растения-регенеранты в торфяные таблетки Jiffy-7. Применение данного метода размножения *T. occidentalis* в зависимости от используемого сорта или формы позволяет за год работы получать до 300 тысяч штук растений-регенерантов, готовых к адаптации к почвенным условиям.

Microcloning propagation of *Thuja occidentalis* L.

**Zontikov D. N.¹, Zontikova S. A.¹, Shurgin A. I.², Sergeeva U. A.²,
Bastrakova A. U.², Kleva O. S.², Mayorova A. V.², Smirnova A. V.²,
Sergeev R. V.²**

¹ Kostroma State University, 14, 1st of May st., Kostroma, 156000, Russian Federation,
tel: +7(910)371-23-33, e-mail: zontikovdn@mail.ru,

² Volga State University of Technology, 3 Lenin sq., Yoshkar-Ola, 424000, the Republic of Mari El, Russian
Federation, tel.: +7(917) 705-05-09, e-mail: rsergeyev@yahoo.com

.....

Different varieties and forms of *Thuja occidentalis* L. are actively used for the greening of settlements, as well as in the pharmaceutical industry due to essential oils that are isolated from young shoots.

To obtain planting material *T. occidentalis*, the vegetative propagation method is predominantly used, at which shoots of 15–20 cm at the age of two years are treated with auxins and placed in climate-controlled hotbeds where the rooting process takes place. However, this method has a number of significant drawbacks, the risk of transmission of infection, as well as a limitation on the amount of material received. For this reason, the use of the clonal micropropagation method is of particular importance.

For introduction into culture *in vitro*, young shoots were used which were isolated from plants in June, August and October. Initially, the isolated shoots were washed in an aqueous solution of potassium permanganate and sterile water. Sterilization of plant material under laminar box conditions was carried out with a 70 % ethanol solution and an aqueous solution of 3 % sodium hypochlorite, followed by washing in sterile distilled water. On the nutrient medium, parts of the shoot up to 2.5 cm long were placed.

Morphogenesis activity was studied depending on the time of introduction into the culture of donor explants, isolated in spring, summer and autumn; the effect of the nutrient medium used — MS, Q & L and Anderson — when introduced into the culture *in vitro* supplemented with 2-ip growth regulators from 1 to 3 mg/l and NAA from 0.1 to 0.3 mg/l. The dependence of the growth rate of shoots on the stage of micro-engraving on 6 BA in a concentration from 0.5 to 1.5 mg/l was established; 2-ip — 1.0 to 3.0 mg/l and Kin at a concentration of 1.0 mg/l. Rooted the resulting regenerative plants in peat tablets Jiffy-7. The use of this method of reproduction of *T. occidentalis*, depending on the variety or form used, allows to obtain up to 300 thousand pieces of regenerative plants ready for adaptation to soil conditions over a year of operation.

Флаван-3-олы в каллусных культурах *Camellia sinensis* L., выращиваемых в темноте и перенесенных в световые условия

Зубова М. Ю.¹, Осипов В. И.², Загоскина Н. В.¹

¹ Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, ул. Ботаническая, 35, Москва, 127276, Россия, тел.: +7(499)678-53-51, e-mail: biophenol@gmail.com

² Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений, ул. Грина, 7/1, Москва, 117216, Россия, тел.: +7(495)388-55-09, e-mail: ossipov@utu.fi

Флаван-3-олы (или катехины) относятся к одним из наиболее исследованных фенольных соединений, широко распространенных в растительных тканях. Известно их антиоксидантное, антибактериальное и противорадиационное действие. Кроме того, флаван-3-олы обладают Р-витаминной (капилляроукрепляющей) активностью.

Одним из важных продуцентов катехинов являются растения чая. В их молодых побегах может накапливаться до 25% этих соединений от сухой массы растения. Направленность на биосинтез этих представителей фенольного метаболизма сохраняется и при культивировании клеток чая в условиях *in vitro*, хотя и на более низком уровне по сравнению с исходными эксплантами. При этом в культурах было отмечено образование только катехина и эпикатехина и отсутствие их галлированных форм, характерных для листьев чая.

Целью исследования являлось изучение состава и содержания флаван-3-олов в каллусных культурах чайного растения, выращиваемых в темноте или перенесенных в световые условия, с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и масс-спектрометрии.

Каллусные культуры чайного растения (*Camellia sinensis* L., грузинская разновидность) выращивали на модифицированной питательной среде Хеллера в темноте или при 16-часовом фотопериоде в условиях факторостата ИФР РАН.

Изучение состава и содержания флаван-3-олов проводили методом ВЭЖХ и масс-спектрометрии. Для анализа масс-спектрометрических данных использовали программу «Data analysis 4.0» (BRUKER Daltonics).

Гетеротрофная каллусная культура чайного растения представляла собой медленно растущий плотный каллус бежевого цвета. При ее перенесении в условия 16-часового фотопериода отмечалось незначительное позеленение каллусов к середине пассажа, что свидетельствует о начальных этапах формирования в ней хлоропластов.

В каллусных культурах, растущих в темноте или перенесенных в условия 16-часового фотопериода (первый пассаж), были идентифицированы два диастереоизомера флаван-3-олов — (+)-катехин и (-)-эпикатехин, а также (-)-эпикатехин-6-С-глюкозид. В обоих случаях преобладающим соединением являлся (-)-эпикатехин, на долю которого приходилось более 70% от всех идентифицированных флаван-3-олов. Его содержание в культурах, растущих в темноте или перенесенных на свет, в 6 и в 5 раз превышало содержание (+)-катехина, соответственно. Более высокое содержание (-)-эпикатехина по сравнению с (+)-катехином в растительных клетках, возможно, связано с различной устойчивостью стереоизомеров, а также с особенностями биосинтеза этих соединений. Что же касается (-)-эпикатехин-6-С-глюкозида, то это соединение впервые было идентифицировано в каллусной культуре чайного растения, и его содержание не превышало 10% от всего комплекса флаван-3-олов у обоих типов культур.

Все вышеизложенное свидетельствует о значительном сходстве в биосинтезе катехинов у каллусных культур чая, растущих в темноте или перенесенных в условия 16-часового фотопериода.

Flavan-3-ol in callus cultures of *Camellia sinensis* L. grown in the dark and transferred to light conditions

Zubova M. Yu.¹, Ossipov V. I.², Zagoskina N. V.¹

¹ K. A. Timiryazev Institute of Plant Physiology Russian Academy of Sciences, 35 Botanicheskaya st., 127276, Moscow, Russian Federation, tel.: +7 (499) 678-53-51, e-mail: biophenol@gmail.com

² Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants, 7/1 Grina st., 117216, Moscow, Russian Federation, tel.: +7(495)388-55-09, e-mail: ossipov@utu.fi

.....

Flavan-3-ols (or catechins) belong to the most studied phenolic compounds widely spread in plant tissues. Their antioxidant, antibacterial and antiradiation effects are known. Furthermore, flavan-3-ols have P-vitamin (capillary-strengthening) activity.

One of the main producers of catechins are tea plants. The young shoots of the tea plant can accumulate up to 25 % of these compounds by the dry weight of the plant. The orientation to the catechins biosynthesis is also preserved under *in vitro* conditions, although the level of their content is lower in comparison with the initial explants. At the same time, in the cultures the formation of catechin and epicatechin was noted. Gallates of these flavan-3-ols characteristic for tea leaves were absent.

The objective of this research was to study the composition and content of flavan-3-ols in tea plant callus cultures grown in the dark or transferred to light conditions using the HPLC method and mass-spectrometry assay.

The tea plant callus cultures (*Camellia sinensis* L., Georgian variety) were grown on a modified Heller nutrient medium in darkness or in 16 hour photoperiod under conditions of IPP RAS factorostat.

The study of the composition and content of flavan-3-ols was carried out by HPLC analysis and mass-spectrometry method. For the analysis of mass spectrometric data, the program "Data Analysis 4.0" (BRUKER Daltonics) was used.

The heterotrophic tea plant callus culture was a slowly growing dense callus of beige color. When it was moved to the light conditions, a slight greening of the calli was observed by the middle of the cultivation period. This indicates the initial stages of the chloroplasts formation in it.

In callus cultures grown in the dark or transferred to the light conditions (first passage), two diastereoisomers of flavan-3-ol — (+)-catechin and (-)-epicatechin, as well as (-)-epicatechin-6-C-glucoside were identified. In both cases, the dominant compound was (-)-epicatechin, which accounted for more than 70 % of all identified flavan-3-ols. Its content in dark-grown cultures or light-grown tissues was 6 and 5 times higher than the content of (+)-catechin, respectively. The higher content of (-)-epicatechin compared to (+)-catechin in plant cells may be due to the different stability of stereoisomers, as well as to the biosynthesis features of these compounds. (-)-Epicatechin-6-C-glucoside was first identified in the callus culture of a tea plant. The content of this metabolite did not exceed 10 % of the total flavan-3-ols complex in both types of cultures.

Thus, all of the foregoing indicates a significant similarity in the biosynthesis of catechins in tea plant callus cultures growing in the dark or transferred to the 16-hour photoperiod conditions.

Изучение фармакологического действия экстракта биомассы штамма суспензионной культуры клеток ИФР-ДМ-05-pro *Dioscorea deltoidea* Wall на модели язвенного колита у крыс

Иванов И. М.¹, Григорьев Г. К.², Носов А. М.¹, Кочкин Д. В.¹,
Титова М. В.¹, Ключин А. Г.¹, Фоменков А. А.¹, Никитин М. В.¹

¹ Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, ул. Ботаническая, 35, Москва, 127276, Россия, тел.: +7(499)678-53-91

² Медико-оздоровительный центр МГТС, Петровский бульвар 12, стр. 1, Москва, 127051, Россия, тел.: +7(495)950-05-48

Введение. Воспалительные заболевания кишечника, включая болезнь Крона и неспецифический язвенный колит, вызываются сложным взаимодействием между генетической предрасположенностью, экологическими факторами и аутоиммунным повреждением тканей, приводящим к хроническому рецидивирующему воспалению кишечника. Терапия гормональными препаратами (преднизолон и др.) является основой комплексного лечения данной патологии. Однако у части пациентов отмечается изначальная невосприимчивость или постепенно развивается устойчивость к кортикостероидам. Эти лекарства вызывают серьезные побочные эффекты.

В связи с вышеизложенным необходимо вести поиск новых средств медикаментозной терапии, сочетающих выраженный терапевтический эффект и меньшую токсичность.

Цель исследования. Выявить терапевтическое действие экстракта биомассы суспензионной культуры клеток штамма ИФР-ДМ-05-pro *Dioscorea deltoidea* Wall в эксперименте на модели язвенного колита у крыс.

Материалы и методы. Исследования проведены на крысах породы Wistar.

Экстракт получали разрушением клеток замораживанием-размораживанием биомассы, центрифугированием, и стерилизующей ультрафильтрацией надосадочной жидкости.

За исключением интактной группы, крысам позволяли в течение 8 суток, для индуцирования колита, без ограничений пить 5 % раствор декстрана сульфата натрия (DSS). Крысам опытной группы вводили стерильный экстракт биомассы диоскореи 1 раз в сутки подкожно в дозе 1 мг фураностаноловых гликозидов (дельтозид 0,3 мг и протодиосцин 0,7 мг) в 1 мл ежедневно. Оценку наличия скрытой крови в стуле проводили бензидиновой пробой. На 8 сутки с начала приема крысами раствора DSS, в хвостовую вену всем животным ввели 1,25 % раствор синьки Эванса из расчета 0,2 мл/100 г для прижизненного окрашивания пораженного язвами кишечника. Ткань толстого кишечника длиной 7 см иссекли, высушивали в сублимационной установке. Затем краситель экстрагировали формамидом и измеряли его концентрацию на спектрофотометре при длине волны 620 нм. Чем концентрация выше, тем значительнее язвенное поражение.

Результаты. По результатам эксперимента у животных получавших инъекции экстракта биомассы по сравнению с животными, не получавшими инъекции, было отмечено существенно меньшее количество скрытой крови в кале, в крови — увеличение на 28 % тромбоцитов, более чем в 2,5 раза меньшее содержание билирубина, в 1,7 раза меньшее количество холестерина. Методика прижизненного окрашивания язвенных поражений кишечника показала достоверно меньшее содержание красителя, а значит и язвенных поражений.

Побочное действие. Постинъекционные инфильтраты в местах подкожного введения экстракта.

Заключение. Полученные результаты убедительно демонстрируют высокий терапевтический эффект при использовании экстракта биомассы штамма ИФР-ДМ-05-pro *Dioscorea deltoidea* Wall и подтверждают целесообразность разработки лекарственного средства на его основе для терапии язвенных заболеваний кишечника.

Studying of pharmacological effect of extract of biomass of a strain of suspension culture of cells IFR-DM-05-pro of *Dioscorea deltoidea* Wall on model of ulcer colitis at rats

Ivanov I. M.¹, Grigoriev G. K.², Nosov A. M.¹, Kochkin D. V.¹, Titova M. V.¹, Klyushin A. G.¹, Fomenkov A. A.¹, Nikitin M. V.¹

¹ K. A. Timiryazev Institute of Plant Physiology Russian Academy of Sciences, 35 Botanicheskaya st., 127276, Moscow, Russian Federation, tel.: +7(499)678-53-91

² MGTS mediko-recreational center, 12/1 Petrovsky boulevard, 127051, Moscow, Russian Federation, tel.: +7(495)950-05-48

.....

Introduction. Inflammatory diseases of intestines, including an illness Krone and nonspecific ulcer colitis, are caused by difficult interaction between genetic predisposition, ecological factors and the autoimmune damage of fabrics leading to a chronic recurrent inflammation of intestines. Therapy by hormonal drugs (Prednisolonum, etc.) is a basis of complex treatment of ground pathology. However at part of patients initial immunity is noted or gradually resistance to corticosteroids develops. These drugs cause the most serious side effects.

Due to the above it is necessary to conduct search of the new means of medicamentous therapy combining the expressed therapeutic effect and smaller toxicity.

Research objective. To reveal therapeutic effect of extract of biomass of suspension culture of cells of strain IFR-DM-05-pro *Dioscorea deltoidea* Wall in experiment on model of ulcer colitis at rats.

Materials and methods. Researches are conducted on rats of breed of Wistar.

Extract was received destruction of cells biomass freezing defrosting, centrifuging, and the sterilizing ultrafiltration of nadosadochny liquid.

Except for intact group, rats were allowed within 8 days, for induction of colitis, without restrictions to drink 5 % solution of a dextran of sodium sulfate (DSS). To rats of experienced group entered sterile extract of biomass of a Chinese yam of 1 times a day subcutaneously in a dose of 1 mg of furostanolovy glycosides (deltozid 0.3 mg and protodiosin 0.7 mg) into 1 ml daily. The assessment of existence of the occult blood in a chair was carried out the benzidine test. For the 8th days since the beginning of reception by rats of DSS solution, all animal entered 1.25 % into a tail vein solution of blue of Evans at the rate of 0.2 ml / 100 g for intravital coloring of the intestines affected with ulcers. Tissue of a large intestine 7 cm long was excised, dried up in sublimation installation. Then dye was extracted formamide and measured its concentration on the spectrophotometer at the wavelength of 620 nanometers. The concentration is higher, the canker is more considerable.

Results. By results of experiment at the animals receiving biomass extract injections in comparison with the animals who were not receiving an injection the smaller quantity of the occult blood to Calais, increase by 28 % of thrombocytes in blood, more than by 2.5 times the smaller content of bilirubin, by 1.7 times smaller quantity of a holestrerin was noted significantly. The technique of intravital coloring of cankers of intestines showed authentically smaller content of dye, so and cankers.

Side effect. Post-injection infiltrates in places of hypodermic maintaining extract.

Conclusion. The received results convincingly show high therapeutic effect, when using extract of biomass of strain IFR-DM-05-pro of *Dioscorea deltoidea* Wall and confirm expediency of development of medicine on its basis for therapy of ulcer diseases of intestines.

Поиск мотивов в 5'-НТО для регуляции экспрессии генов растений

**Кабардаева К. В.¹, Тюрин А. А.¹, Гра О. А.¹, Фадеев В. С.¹, Мустафаев О.²,
Голденкова-Павлова И. В.¹**

¹ *Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, ул. Ботаническая, 35, Москва, 127276, Россия, факс: +7(499)678-54-20, тел.: +7(499)678-54-00, e-mail: kabardaewa@yandex.ru*

² *Бакинский государственный университет, ул. акад. Захида Халилова, 23, Баку, факс: +994(12)598-33-76, тел.: +994(12)539-05-35, e-mail: orkhan@bioset.org*

.....

Детальный анализ модульной структуры регуляторных районов эукариотических генов, включая гены растений, становится лидирующим направлением в изучении механизмов регуляции экспрессии генов. Поэтому мы провели исследования на трансгенных растениях табака для изучения вклада CG-богатой синтетической последовательности в эффективность экспрессии репортерного гена термостабильной лихеназы на уровне транскрипции и трансляции. Использование регуляторных последовательностей, характерных для индивидуальных генов, с целью изучения их функциональной роли в регуляции экспрессии генов, по нашему мнению, не позволяет учесть разнообразие потенциальных регуляторных мотивов, вариации в CG-содержании и вторичной структуры в последовательностях, т. е. нивелировать индивидуальные свойства последовательности. В связи с этим в своем исследовании мы использовали синтетическую последовательность, которая содержит характерные для 5'-областей генов растений CG-богатые мотивы и имеет размер 405 п. н., который, с одной стороны, близок среднему размеру 5'-НТО генов, включенных в анализ, а, с другой стороны, число нуклеотидов в этой последовательности кратно трем, что позволило дополнительно использовать ее и как 5'-область кодирующей последовательности гибридного гена, в котором синтетическая последовательность слита в рамке считывания с последовательностью репортерного гена. Наши результаты позволяют заключить, что CpG динуклеотиды, локализованные в 5'-области гетерологичного гена, увеличивают активность транскрипции в растениях, при этом не исключают и положительный вклад синтетической CG-богатой последовательности, содержащей мотивы, характерные для 5'-области генов растений, в эффективность трансляции мРНК гетерологичных генов.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 18-04-00026.

The search of motifs in the 5'-UTR for the regulation of plants genes expression

Kabardaeva K. V.¹, Tyurin A. A.¹, Gra O. A.¹, Fadeev V. S.¹, Mustafaev O.², Goldenkova-Pavlova I. V.¹

¹ *K. A. Timiryazev Institute of Plant Physiology Russian Academy of Sciences, 35 Botanicheskaya st., 127276, Moscow, Russian Federation, e-mail: kabardaewa@yandex.ru*

² *Baku State University, 23 Zahid Halilov st., Baku, Azerbaijan, fax: +994(12)598-33-76, tel.: +994(12)539-05-35, e-mail: orkhan@bioset.org*

.....

Detailed analysis of the modular structure of eukaryotic gene regulatory areas, including plants, is becoming a leading trend in the study of mechanisms for regulating gene expression. Therefore, we have conducted studies on transgenic tobacco plants to examine the contribution of the CG-rich synthetic sequence in the expression efficiency of the reporter gene for thermostable lichenase at the level of transcription and translation. In our opinion the application of regulatory sequences specific to individual genes to study their functional role in regulating gene expression does not allow to take into account the diversity of potential regulatory motives, variations in CG-content and secondary structure in sequences, i. e. to level the individual properties of the sequence. In this regard, in our study we used a synthetic sequence that contains typical for 5'-regions of plant genes CG-rich motives and has a size of 405 p. n., which, on the one hand, is close to the average size of 5'-NTO genes included in the analysis, and, on the other hand, the number of nucleotides in this sequence is a multiple of three, which allowed to use it as well as 5'-region coding sequence of a hybrid gene, in which the synthetic sequence is merged in the frame of reading with a sequence of a reporter gene. Our results allow to conclude that the CpG dinucleotide, localized in the 5'-region of the heterologous gene, increases the activity of transcription in plants, it does not rule out the positive contribution of synthetic CG-rich sequence containing motifs characteristic of the 5'-region of plants' genes, the efficiency of translation of mRNA of heterologous genes.

Действие растительных экстрактов *Withania somnifera* L. на раковые клетки человека

Калашникова Е. А., Киракосян Р. Н.

Российский государственный аграрный университет — Московская сельскохозяйственная академия им. К. А. Тимирязева, ул. Тимирязевская, 49, Москва 127550, Россия,
тел.: +7(916)927-73-19, e-mail: kalash0407@mail.ru

Растения ашваганды (*Withania somnifera* L.) уже более 3000 лет применяют в народной медицине при лечении различных заболеваний. Это обусловлено тем, что во всех частях растения (листьях, коре, плодах, семенах и в большей степени в корне) синтезируются такие вещества как сапонины, гликозиды, стероидные лактоны, олигосахариды, витанолид, а также свободный витамин А (агликон), обладающий противоопухолевым действием. Поэтому изучение действия экстрактов данного растения на раковые клетки человека всегда остается актуальным.

В работе была изучена цитотоксичность экстрактов, полученных из растений-регенерантов и каллусной ткани. В качестве объекта исследования была взята линия клеток М-HeLa (эпителиоидная карцинома шейки матки человека, сублиния HeLa, клон М HeLa).

Работа была выполнена на основании ранее разработанных методик и проведенных исследований с экстрактами растений рода *Astragalus* L. На данном этапе работы устанавливали концентрации растительных экстрактов, при которых наблюдается гибель раковых клеток. Причем данные концентрации определяли непосредственно для экстрактов из растений-регенерантов и экстрактов из каллусной ткани. Экспериментальным путем нами было определено, что после лиофильной сушки экстрактов в пробирке осталось 31,4 мг сухого вещества от растений-регенерантов и 28,3 мг сухого вещества от каллусной ткани. Полученные массы растворяли в DMSO до концентрации 5000 мкг/мл, после чего проводили разбавление раствора до 50 мкг/мл, и полученные концентрации в дальнейшем наносили на раковые клетки человека.

В результате проведенных исследований было установлено, что растительные экстракты, полученные из растений-регенерантов и каллусной ткани, обладают разной цитотоксичностью. Как следует из полученных результатов, малые концентрации экстрактов (50 мкг/мл) были не токсичны для исследуемых раковых клеток, о чем свидетельствует 100%-ое их выживание при использовании двух изучаемых экстрактов. Однако по мере повышения концентрации цитотоксический эффект экстрактов начинал проявляться. Причем более ярко этот эффект был характерен для растительных экстрактов, полученных из растений-регенерантов. Для этих экстрактов уже при концентрации 250 мкг/мл наблюдали гибель более 40% раковых клеток, а при концентрации 500 мкг/л и выше гибель раковых клеток была в пределах 90–95%. Что касается растительных экстрактов, полученных из каллусной ткани, то цитотоксический эффект был слабо выражен и максимальная гибель раковых клеток (23%) была отмечена лишь при самых высоких концентрациях экстракта (5000 мкг/мл).

Таким образом, полученные результаты еще раз подтверждают тот факт, что синтез вторичных соединений в каллусной ткани может быть маловероятен или отсутствует вообще. Поэтому на сегодняшний момент целесообразно работать с растительным экстрактом, полученным из растений-регенерантов.

Effects of herbal extracts *Withania somnifera* L. on human cancer cells

Kalashnikova E. A., Kirakosyan R. N.

Russian State Agrarian University — Moscow Timiryazev Agricultural Academy, 49 Timiryazevskaya st., 127550, Moscow, Russian Federation, tel.: 8 (916) 927-73-19, e-mail: kalash0407@mail.ru

.....

Plants ashvaganda (*Withania somnifera* L.) for more than 3000 years used in folk medicine in the treatment of various diseases. This is because all parts of the plant (leaves, bark, fruits, seeds, and more radically) are synthesized substances such as saponins, glycosides, steroidal lactones, oligosaccharides, withanolide and free withaferin A (aglycone) of antitumor action. Therefore, the study of the effects of extracts of this plant on human cancer cells always remains relevant.

The cytotoxicity of extracts obtained from regenerated plants and callus tissue was studied. The M-HeLa cell line (epithelial carcinoma of the human cervix, HeLa sublines, HeLa clone) was taken as the object of study.

The work was carried out on the basis of previously developed techniques and studies with extracts of plants of the genus *Astragalus* L. at this stage of the work, the concentrations of plant extracts were established, in which there is a death of cancer cells. Moreover, these concentrations were determined directly for extracts from regenerating plants, and extracts from callus tissue. Experimentally, we determined that after lyophilic drying of extracts, 31.4 mg of dry matter from regenerated plants and 28.3 mg of dry substance from callus tissue remained in the vial. The obtained masses were dissolved in DMSO to a concentration of 5000 µg/ml, after which the solution was diluted to 50 µg/ml and the resulting concentrations were subsequently applied to human cancer cells.

In result of the conducted researches it was established that plant extracts obtained from the regenerated plants and callus tissues have different cytotoxicity. As it follows from the obtained results, small concentrations of extracts (50 µg/ml) were non-toxic to the studied cancer cells as evidenced by their 100 % survival with the use of two studied extracts. However, as the concentration increased, the cytotoxic effect of extracts began to manifest itself. Moreover, this effect was more pronounced for plant extracts obtained from regenerated plants. For these extracts, at a concentration of 250 µg/ml, more than 40 % of cancer cells were killed and at a concentration of 500 µg/l and above the death of cancer cells was within 90–95 %. As for plant extracts obtained from their callus tissue, the cytotoxic effect was weakly expressed and the maximum death of cancer cells (23 %) was noted only at the highest extract concentrations (5000 mg/ml).

Thus, the obtained results confirm once again the fact that the synthesis of secondary compounds in callus tissue may be unlikely or absent at all. Therefore, today it is advisable to work with plant extract obtained from regenerated plants.

Использование микроорганизмов для повышения эффективности метода клонального микроразмножения картофеля

Каргаполова К. Ю.¹, Ткаченко О. В.¹, Бурыгин Г. Л.^{1,2}

¹ Саратовский государственный аграрный университет им. Н. И. Вавилова, Театральная пл., 1, Саратов, 410012, Россия, факс: +7(8452)23-47-81, тел: +7(8452)23-32-92, e-mail: kinaschchri@gmail.com

² Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, пр. Энтузиастов, 13, Саратов, 410049, Россия, факс: +7(8452)97-03-83, тел: +7(8452)97-04-44

Метод клонального микроразмножения активно используется в сельскохозяйственной биотехнологии и в семеноводстве для оздоровления микрорастений в культуре *in vitro*, а также для ускоренного размножения сортов сельскохозяйственных культур. В семеноводстве клональное микроразмножение является обязательным при производстве оздоровленного посадочного материала картофеля. Тем не менее, данный метод требует совершенствования, особенно в отношении повышения способности к адаптации микрорастений к условиям *ex vitro*. В настоящее время установлено, что ризосферные микроорганизмы обладают способностью снабжать растения питательными элементами и фитогормонами *in vivo*, а также положительно влиять на ростовые процессы растений в культуре *in vitro*. Создание растительно-микробных ассоциаций в условиях *in vitro* с целью повышения эффективности метода клонального микроразмножения картофеля на сегодняшний день изучено недостаточно.

В совместных исследованиях кафедры растениеводства, селекции и генетики ФГБОУ ВО Саратовского ГАУ и лаборатории иммунохимии ИБФРМ РАН на протяжении длительного времени ведутся исследования растительно-микробных ассоциаций микрорастений картофеля с коллекционными бактериальными штаммами и выделенными природными изолятами. Исследование 21 коллекционного штамма позволило выделить наиболее эффективные из них для инокуляции микрорастений в культуре *in vitro*. Были изучены штаммы: *Azospirillum brasilense* SR8, SR87, Sp7, SR75, SR80, SR88, S27, Sp245; *Azospirillum lipoferum* SR61, SR85, SR42, Sp59 b; *Niveispirillum irakense* KBC1; *Azospirillum halopraeferens* Au4; *Azospirillum sp.* SR38, SR64; *Azospirillum thiophilum* BV-S; *Enterobacter cloacae* K7; *Pseudomonas chlororaphis* K3; *Escherichia coli* K-12; *Achromobacter ruhlandii* LCu2; *Rhizobium radiobacter* LCu4 a. В эксперименте использовали микрорастения картофеля сорта 'Невский', культивируемые на твердой питательной среде Мурасиге-Скуга без гормонов. Изучалось влияние бактерий на ростовые показатели микрорастений в культуре *in vitro* и в условиях *ex vitro*. По результатам исследования выделили три штамма *A. brasilense* Sp245, SR80 и SR88. Данные штаммы положительно влияли в культуре *in vitro* на длину побега (превышение контроля на 9%, 12%, 24%). По длине корня отличился штамм *A. brasilense* SR88 (увеличивал длину корня на 17%). По количеству узлов не было достоверного различия между вариантами. Штамм *A. brasilense* SR80 увеличивал количество корней на 3%, и штамм *A. brasilense* SR88 на 10%. В условиях *ex vitro* тоже был обнаружен положительный эффект бактериализации.

Также нами проводилась работа по выделению аборигенных изолятов из корней растений картофеля. Данная работа проводилась в несколько этапов: выращивание растений картофеля сортов 'Невский' и 'Кондор' в полевых условиях, выделение изолятов из корней, отбор изолятов по микробиологическим характеристикам, изучение фитотоксичности и ростстимулирующего эффекта отобранных изолятов. В данном эксперименте из 170 выделенных изолятов отобрано 5 для дальнейшего использования.

Таким образом, для повышения эффективности метода клонального микроразмножения картофеля может успешно использоваться прием бактериализации растений в культуре *in vitro* как известными коллекционными штаммами ризосферных азотфиксирующих бактерий, так и природными изолятами.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ № 16-34-00720.

The use of microorganisms to increase the efficiency of the clonal micropropagation method potato

Kargapolova K. Yu.¹, Tkachenko O. V.¹, Burygin G. L.^{1,2}

¹ Vavilov Saratov State Agrarian University, 1 Theatre square, 410012, Saratov, Russian Federation, fax: +7(8452)23-47-81, tel.: +7(8452)23-32-92, e-mail kinaschchri@gmail.com

² Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms RAS, Saratov, 410049, Russian Federation, fax: +7(8452)97-03-83, tel.: +7(8452)97-04-44

The clonal micropropagation method is actively used in agricultural biotechnology and in seed production for the improvement of microplants *in vitro*, as well as for accelerated reproduction of crops varieties. In seed production, clonal micropropagation is mandatory in the production of a healthy planting stock potato. Nevertheless, this method needs improvement, especially with regard to increasing the ability to adapt microplants to *ex vitro*. It has now been established that rhizosphere microorganisms have the ability to supply plants with nutrients and phytohormones *in vivo*, and also positively influence the growth processes of plants *in vitro*. The creation of plantmicrobial associations *in vitro* to improve the efficiency of the clonal micropropagation method potato has not been sufficiently studied to date.

For a long time in the joint research of the Plant Cultivation, Selection and Genetics Department of Saratov State Agrarian University and the Immunochemistry laboratory of the IBPPM RAS. Research has been carried out into plantmicrobial associations of potato microplants with collection bacterial strains and allocate natural isolates. A study of 21 collection strains made it possible to isolate the most effective of them for inoculating microplants *in vitro*. The strains: *Azospirillum brasilense* SR8, SR87, Sp7, SR75, SR80, SR88, S27, Sp245; *Azospirillum lipoferum* SR61, SR85, SR42, Sp59 b; *Niveispirillum irakense* KBC1; *Azospirillum halopraeferens* Au4; *Azospirillum* sp. SR38, SR64; *Azospirillum thiophilum* BV-S; *Enterobacter cloacae* K7; *Pseudomonas chlororaphis* K3; *Escherichia coli* K-12; *Achromobacter ruhlantii* LCu2; *Rhizobium radiobacter* LCu4 a.

In the experiment 'Nevsky' potato microplants were cultivated on the solid nutrient medium Murasige-Skuga without hormones. Bacteria influence on growth parameters of microplants *in vitro* and *ex vitro* was studied. Based on the study results, three strains of *A. brasilense* Sp245, SR80 and SR88 were allocate. These strains had a positive effect on the escape length *in vitro* (excess of control by 9 %, 12 %, 24 %). The root length was *A. brasilense* SR88 (the root length was increased by 17 %). By the number of nodes there was no significant difference between the variants. Strain *A. brasilense* SR80 increased the number of roots by 3 %, and strain *A. brasilense* SR88 by 10 %. *Ex vitro* a positive bacterial effect was also found.

We also carried out work on isolating aboriginal isolates from the roots of potato plants. This work was carried out in several stages: the cultivation of the 'Nevsky' and 'Kondor' varieties potato plants in the field, the allocate of isolates from the roots, the selection of isolates according to microbiological characteristics, the study of phytotoxicity and the growth-stimulating effect of selected isolates. In this experiment, 5 out of 170 allocated isolates were selected for further use.

Thus, in order to increase the efficiency of the clonal micropropagation method potato, the bacterization method of plant *in vitro* with known collection strains of rhizospheric nitrogen-fixing bacteria and natural isolates can be successfully used. The work was carried out with the partial financial support of the RFBR grant No. 16-34-00720.

Введение в культуру *in vitro* фейхоа сорта 'Кулиджи'

Кастрицкая М. С.¹, Кухарчик Н. В.¹, Месхидзе А. М.²

¹ Институт плодоводства, ул. Ковалева, 2, аг. Самохваловичи, Минский район, 223013, Беларусь, e-mail: Kasmaana@yandex.ru,

² Институт фитопатологии и биоразнообразия Батумского государственного университета им. Шота Руставели, ул. Тависуплеба, Кобулету, 6200, Грузия, e-mail: a.meskhidze@mail.ru,
.....

Фейхоа получил широкое распространение как плодое и декоративное растение во влажных субтропиках Грузии, где культивируются разные сорта. Среди них одним из самых высокоурожайных является сорт 'Кулиджи' ('Кулидж'), который выведен в Калифорнии. Плоды продолговатой формы и среднего размера, с немного гофрированной кожурой. Не имеет выраженного аромата, но отличается стабильным урожаем.

Традиционно фейхоа размножают посевом семян, черенкованием и отводками. Семена растения очень мелкие и при выращивании из семян не обеспечивают сортового постоянства. Черенки слабо укореняются, даже при обработке стимуляторами ризогенеза. Сеянцы вступают в плодоношение на пятый-шестой год, укорененные черенки — на третий-четвертый. Метод культур *in vitro* позволяет в короткие сроки вегетативно размножить сорт, обеспечивая производство однородным высококачественным посадочным материалом.

Исследования проводили на базе отдела биотехнологии РУП «Институт плодоводства» Республики Беларусь в 2017–2018 гг.

Материалом для исследования служили почки и черенки сорта фейхоа 'Кулиджи'. Условия культивирования эксплантов: освещение 2,5–3,0 тыс. люкс, температура +21...+23 °С, фотопериод 16/8 ч.

Стерилизацию исходного материала проводили по следующей схеме: обработка 0,2%-м бенлатом — 30 мин.; далее в ламинар-боксе мини-черенки с узловыми сегментами обрабатывали 70%-м этанолом 1 мин., затем — 30%-й перекисью водорода 5 мин.; затем три раза промывали стерильной дистиллированной водой, содержащей 250 мг/л лимонной кислоты и 250 мг/л аскорбиновой кислоты для предотвращения окисления. Эффективность стерилизации при введении черенков в культуру *in vitro* сорта 'Кулиджи' составила 49,5 %.

В период инициации культуры *in vitro* в питательную среду МС для подавления активности ряда ферментов, присущих культуре фейхоа добавляли 0,2 % активированного угля, который также обеспечивал связывание ряда токсических веществ, в первую очередь фенольных соединений, выделяющихся в процессе выращивания. В состав питательной среды МС также добавляли: мезоинозит — 100 мг/л, биотин — 1,0 мг/л, фолевую кислоту — 1,0 мг/л, цитокинин — 2-іР (2 мг/л). Длительность нулевого пассажа культивирования — 8 недель.

Предложенный способ стерилизации и модифицированная питательная среда на этапе введения МС, позволили получить асептическую культуру растений-регенерантов фейхоа сорта 'Кулиджи'.

Initiation of *in vitro* culture of feijoa cultivar 'Coolidge'

Kastritskaya M. S.¹, Kukharchik N. V.¹, Meskhidze A. M.²

¹ Institute for Fruit Growing, 2 Kovalev st., 223013, Samokhvalovichy, Minsk region, Republic of Belarus, e-mail: Kasmanana@yandex.ru,

² Institute of Phytopathology and Biodiversity Batumi Shota Rustaveli State University, Tavisupleba st., Kobuleti, 6200, Georgia, a.meskhidze@mail.ru

.....

Feijoa is widely used as fruit and ornamental plant in humid subtropics of Georgia, where different cultivars are cultivated. Among them, one of the most high-yielding cultivar is cv. Coolidge, which was created in California. The fruits of cv. 'Coolidge' are medium in size and have oblong shape with slightly goffered peel. Fruits have no pronounced flavor, but this cultivar has a stable yield.

Traditionally feijoa is propagated by sowing of seeds, by layer and by cuttings. Seeds of feijoa are very small and when grown from seedlings do not provide varietal consistency. Cuttings weakly take roots, even when treated with stimulants of rhizogenesis. Seedlings enter fructification on fifth or sixth year, rooted cuttings enter fructification on third or fourth year. *In vitro* culture allows to propagate vegetatively cultivar in a short time, providing production with a uniform, high-quality planting material.

The research was carried out on the basis of Biotechnology Department of Institute for Fruit Growing, Belarus in 2017–2018.

The material for study was: buds and cuttings of feijoa cv. 'Coolidge'. Conditions for cultivation of explants: illumination 2,5–3,0 thousand lux, temperature +21...+23 °C, photoperiod 16/8 h.

Sterilization of explants was carried out according to the following scheme: treatment with 0.2 % benlate (30 minutes); then in laminar box mini-cuttings with nodal segments were treated with 70 % ethanol for 1 minute; treatment with 30 % hydrogen peroxide (5 minutes); washing three times in sterile distilled water containing 250 mg/l citric acid and 250 mg/l ascorbic acid to prevent oxidation. The effectiveness of sterilization at the initiation stage for cv. Coolidge using cuttings was 49.5 %.

At initiation stage, 0.2 % active coal was added to MS nutrient medium to suppress the activity of a number of enzymes inherent in feijoa culture. Active coal also ensured the binding of a number of toxic substances, especially phenolic compounds released during cultivation. Meso-inositol (100 mg/l), biotin (1.0 mg/l), folic acid (1.0 mg/l), cytokinin 2 iP (2 mg/l) were also added to the MS medium. The duration of initiation stage was 8 weeks.

The proposed method of sterilization and modified MS medium at initiation stage allowed to obtain aseptic culture of microplants of feijoa cv. 'Coolidge'.

Эффект наночастиц меди на ростовые характеристики каллусной культуры, полученной из незрелых зародышей *Triticum aestivum* L.

Кирисюк Ю. В.^{1,2,*}, Демидчик В. В.¹

¹ Белорусский государственный университет, биологический факультет, пр-т Независимости, 4, Минск, 220030, Беларусь, факс: +375(17)226-59-40, тел.: +375(17)209-59-34

² Брестский государственный университет им. А. С. Пушкина, б-р Космонавтов, 21, Брест, 224016, Беларусь, факс: (375-162) 21-70-53, тел. (+375 162) 21-71-83

* e-mail: kirysiukyuliya@gmail.com

.....

В связи с прогрессирующим использованием наночастиц в составе новых материалов и продуктов неуклонно растет и выброс металлсодержащих наночастиц в окружающую среду. По ряду некоторых оценок в развитых странах мира концентрация некоторых металлсодержащих наночастиц может достигать 8–10 мг/л на кг сырой почвы. В связи с этим встает вопрос оценки влияния металлсодержащих наночастиц на живые системы и в первую очередь на растения, как доминирующую формы жизни на планете и важнейший восполняемый природный ресурс. В представленной работе проведено исследование влияние наночастиц меди, введенных в среду культивирования, на процессы каллусогенеза в незрелых зародышах *Triticum aestivum* L.

Объектом исследования являлись растения яровой пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта 'Дарья'. Для получения каллусной ткани использовали метод культуры *in vitro* незрелых зародышей пшеницы. Данная модельная система позволяет протестировать воздействия наночастиц на рост регенеративных и защитных тканей растения. В экспериментах использовались сертифицированные медные наночастицы диаметром 38 ± 4 нм (MTI Corporation, США) и макрочастицы (балк) с диаметром частиц около 70 мкм (Sigma, США).

В ходе проведенных опытов было установлено, что введение в питательную среду медных наночастиц в концентрации свыше 100 мг/л ингибирует формирование первичного каллуса и подавляет прорастание незрелых зародышей пшеницы. Наночастицы меди значительно снижали удельную скорость роста и время удвоения биомассы каллусной культуры. Эффект наночастиц меди имел дозозависимый характер, усиливаясь при больших концентрациях их в среде. Установлено, что медный балк вызывал меньшие по силе воздействия эффекты, чем наночастицы. В результате проведенных исследований можно сделать вывод о том, что наночастицы меди обладают высокой токсичностью и могут негативно влиять на развитие регенеративных и защитных тканей растения.

The effect of copper nanoparticles on the growth characteristics of a callus culture obtained from immature embryos of *Triticum aestivum* L.

Kirysiuk Y. V.^{1,2,*}, Demidchik V. V.¹

¹ *Belarusian State University, Biological Faculty, 4 Nezavisimosti ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus, fax: +375(17)226-59-40, tel.: +375(17)209-59-34*

² *Brest State University named after A. S. Pushkin, 21 Kosmonavtov boulevard, 224016, Brest, Republic of Belarus, fax: (375-162) 21-70-53, tel.: (+375 162) 21-71-83*

* e-mail: kirysiukyuliya@gmail.com

Soil levels of metal-containing nanoparticles progressively increase. This is caused by development of nanotechnology and constantly increasing use of nanoparticles in new materials and products. Based on some estimates, the level of some metal-containing nanoparticles can reach 8–10 mg/l per kg of fresh soil in the USA and some other countries. Thus, it is important to evaluate the impact of metal-containing nanoparticles on plants, which are dominating group of organisms on our planet. Moreover, the analysis of influence of metal-containing nanoparticles on growth rate and productivity of plants has a practical importance for agriculturists and ecologists. In this study, we tested the effect of copper nanoparticles added to growing medium on callus induction from immature embryos of *Triticum aestivum* L.

In our experiments we used the method of *in vitro* culture of immature embryos of wheat. This experimental system allows you to test the effects of nanoparticles on the growth of regenerative and protective tissues of the plant. We used certified copper nanoparticles with a diameter of 38 ± 4 nm (MTI Corporation, USA) and a copper bulk with a particle diameter of about 70 μ m (Sigma, USA).

We have found that copper nanoparticles at concentrations above 100 mg/l inhibited formation of primary calluses and germination of immature wheat embryos. In the presence of copper nanoparticles (100 mg/l), callus growth rate and the doubling time of callus biomass decreased twice. Copper bulk particles, which were used in control tests, induced less pronounced inhibition of callus growth. Obtained data demonstrated that copper nanoparticles are toxic for higher plants affecting development of regenerative and protective tissues.

Элиминация контаминирующих бактерий рода *Lactobacillus* ssp. с применением различных антибиотиков и приемов культивирования

Кириянов П. С., Константинов А. В.

Институт леса НАН Беларуси, ул. Пролетарская, 71, Гомель, 246001, Беларусь,
факс: +375(232)75-73-73, тел.: +375(232)75-69-02, e-mail: PKirjanov@yandex.ru

При работе с культурами растений *in vitro* одним из основных требований является строгое соблюдение асептики. Массовое заражение живого материала приводит к уменьшению количественного выхода растений, что повышает материальные затраты на производство коммерческих партий посадочного материала. В связи с частой контаминацией микроклонального материала бактериями рода *Lactobacillus* ssp. необходима разработка методов элиминирования данных инфекций. Для опыта был отобран растительный материал, зараженный указанными бактериями, для дальнейшего субкультивирования на селективные среды разного состава. В каждом варианте опыта использовали по 10 растений в 5 повторностях, время экспозиции составило 10 суток.

Контролем послужил вариант культивирования на питательной среде WPM (G. Lloyd & V. McCown, 1980), дополненной 30,0 г·л⁻¹ сахарозы. В данном случае наблюдали рост бактерий газоном и полное зарастание питательной среды. Органогенная способность эксплантов была существенно подавлена, часть материала некротизировала.

На стандартной питательной среде WPM без сахарозы наблюдалось слабое укоренение микроклональных растений (25%), длина корней составила 8–10 мм. Отчетливо видно наличие контаминирующих бактерий, однако заражения локальны, выражаются в виде белого непрозрачного ореола вокруг растений.

Опытная группа на питательной среде WPM с добавлением 300 мг·л⁻¹ Цефотаксима (Cefotaxime) в жидкую фазу с последующим застыванием оказалась наиболее жизнеспособна. Наблюдалось 98% укоренение, длина корней 2–20 мм. Выявлены локальные колонии бактерий в виде ореола вокруг эксплантов. Внесение указанного антибиотика на поверхность застывшей питательной среды оказалось неэффективно, отмечен интенсивный сливной рост бактерий, в данных условиях выявлено значительное подавление роста растений, а длина корней варьировала в пределах от 2 до 8 мм.

Применение Цефазолина (Cefazolin) дало сходные с Цефотаксимом результаты в отношении антибактериальной активности в культуре тканей растений и позволило получить развитые микропобеги осины, однако наблюдалось их слабое укоренение, длина сформированных корней составляла всего около 3 мм.

Антибиотик Ванкомицин (Vancomycin) в концентрации 25 мг·л⁻¹ апробирован в аналогичных условиях. Установлено подавление ризогенеза (укоренение 56% растений), развитие бактериальных колоний проявлялось интенсивнее.

Интенсивное развитие бактерий не наблюдалось на растениях, культивируемых на агроперлите с добавлением раствора микро- и макросолей (в соответствии с прописью среды WPM), предварительно обработанном при 121 °С в автоклаве. Отмечено отсутствие подавления прироста биомассы растений в сравнении с контролем, длина корней составила около 10 мм.

Таким образом, наилучший результат подавления контаминирующих бактерий рода *Lactobacillus* ssp. показал антибиотик Цефотаксим при внесении его в жидкую фазу культуральной среды. Однако также существует альтернативная возможность подавления бактериального роста, которая выражается в пересадке растений на агроперлит с добавлением минеральных солей.

Elimination of contaminating bacteria of the genus *Lactobacillus* ssp. with application of various antibiotics and cultivation methods

Kiryanov P. S., Konstantinov A. V.

Institute of Forest of the National Academy of Sciences of Belarus, 71 Proletarskaya st., 246001, Gomel, Republic of Belarus, fax: +375(232)75-73-73, tel.: +375(232)75-69-02, e-mail: PKirjanov@yandex.ru

.....

When working with plant cultures *in vitro* one of the main requirements is strict adherence to asepsis. Mass contamination of living material leads to a decrease in the quantitative yield of plants, which increases the material costs of production of commercial batches of planting material. Due to frequent contamination of microclonal material by bacteria of the genus *Lactobacillus* ssp. it is necessary to develop methods to eliminate these infections. For the experiment was selected plant material that was contaminated with these bacteria, for further subcultivation on selective media of different composition. In each variant of the experiment 10 plants were used in 5 repetitions, the exposure time was 10 days.

The control was the variant of cultivation on a nutrient medium WPM (G. Lloyd and B. McCown, 1980) supplemented with 30.0 g·l⁻¹ sucrose. In this case, the growth of bacteria was observed with lawn and complete overgrowth of the nutrient medium. Organogenic ability of explants was significantly suppressed, part of the material necrotic.

On the standard nutrient medium WPM without sucrose there was a weak rooting of microclonal plants (25%), root length was 8–10 mm. Clearly shows the presence of contaminating bacteria, however, infection is local, expressed in the form of a white opaque halo around the plants.

The experimental group on WPM nutrient medium with addition of 300 mg·l⁻¹ Cefotaxime (Cefotaxime) in the liquid phase with subsequent hardening proved to be the most viable. Observed 98% rooting, root length 2–20 mm. Identified local colonies of bacteria in the form of a halo around the explants. The introduction of this antibiotic on the surface of the solidified nutrient medium was inefficient, marked by intense drain the growth of bacteria under these conditions revealed a significant suppression of plant growth and root length varied in the range of 2 to 8 mm.

The use of Cefazolin (Cefazolin) produced results similar to Cefotaxime in relation to antibacterial activity in plant tissue culture and allowed to obtain developed aspen micro-shoots, but their weak rooting was observed, the length of the formed roots was only about 3 mm.

Antibiotic Vancomycin (Vancomycin) at a concentration of 25 mg·l⁻¹ was tested under similar conditions. Suppression of rhizogenesis (rooting of 56% of plants) the development of bacterial colonies was more intense.

The intensive development of bacteria was not observed in plants cultivated on agropelrite with the addition of a solution of micro- and macrofractures (in accordance with the WPM medium), pretreated at 121 °C in the autoclave. Absence of suppression of growth of biomass of plants in comparison with control, length of roots made about 10 mm is noted.

Thus, the best result of suppression of contamination bacteria of the genus *Lactobacillus* ssp. showed antibiotic Cefotaxime when introducing it into the liquid phase of the culture medium. However, there is also the possibility of an alternative possibility of inhibiting bacterial growth, which is expressed in transplanting plants to agropelrite with the addition of mineral salts.

ИУК и АБК стимулируют прорастание *in vitro* мужского гаметофита петунии, активируя Ca^{2+} -зависимые K^+ -каналы и модулируя активность H^+ -АТФазы плазмалеммы

Ковалева Л. В.¹, Тимофеева Г. В.¹, Захарова Е. В.², Воронков А. С.¹

¹ Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, ул. Ботаническая, 35, Москва, 127276, Россия, факс: +7(499)678-54-20, тел.: +7(499)678-54-00

² Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, ул. Тимирязевская, 42, Москва, 127550, Россия, факс: +7(499)977-09-47, тел.: +7(499)976-65-44, e-mail: kovaleva_l@mail.ru

Развитие мужского гаметофита сопровождается значительными изменениями в его водном статусе. Во время заключительного периода созревания в пыльнике пыльца подвергается быстрой дегидратации. Зрелая дегидратированная пыльца может сохранять жизнеспособность в сухом состоянии в течение длительного времени и адаптироваться к изменениям влажности окружающей среды. Реактивация пыльцы осуществляется на поверхности рыльца в ходе ее гидратации. Гидратация является пусковым механизмом прорастания пыльцы, как в условиях *in vitro*, так и *in vivo*, и стимулирует рост пыльцевых трубок, который начинается сразу после набухания и включает образование новой плазмалеммы (ПМ), клеточной стенки и начало вакуолизации. Наиболее существенным регуляторным фактором процесса является транспорт воды в вегетативную клетку. Пыльца сохраняет жизнеспособность благодаря способности приспосабливать тургорное давление к изменениям внешней среды и наличию пока неустановленных молекулярных механизмов, которые помогают поддерживать водный статус пыльцы. В данной работе изучали потенциальную роль в гидратации пыльцевых зерен и прорастании пыльцевых трубок петунии двух гормонов: абсцизовой кислоты (АБК), тесно связанной с водным стрессом, и ауксина (ИУК), которому отводится центральная роль в развитии репродуктивных органов. Свежесобранную пыльцу культивировали в течение 2 ч в термостате при температуре 26 °C на среде, содержащей 0.3 М сахарозу и 1.6 мМ H_3BO_3 или 0.3 М сахарозу, 1.6 мМ H_3BO_3 , 1.3 мМ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0.9 мМ KNO_3 и 0.8 мМ MgSO_4 . 2 мг пыльцы и 2 мл среды культивирования помещали в пузырек, добавляя ИУК и АБК в концентрации 1 мМ, 1 мМ флуридон, 2,3,5-триодбензойную кислоту (1 мМ), а также ингибитор K^+ -каналов хлорид тетраэтиламмония в концентрации 20 мМ одновременно со средой культивирования. В ходе исследований установлено, что рост-стимулирующий эффект ИУК и АБК обусловлен их действием на внутриклеточный рН (pH_c), мембранный потенциал ПМ, активность H^+ -АТФазы ПМ и K^+ -каналов. Выявлены две мишени их действия в пыльцевой трубке: (1) H^+ -АТФаза ПМ, электрогенный протонный насос, ответственный за ее поляризацию, и (2) Ca^{2+} -зависимые K^+ -каналы. Полагаем, что гормон-индуцированный сдвиг pH_c вовлекается в каскад событий, включающих функционирование рН-зависимых K^+ -каналов. Полученные результаты о роли ионов K^+ в гормональном контроле движущих сил транспорта воды в пыльцевой трубке позволили сформулировать гипотезу о том, что АБК и ИУК стимулируют прорастание пыльцевых зерен и рост пыльцевых трубок, активируя K^+ -каналы.

IAA and ABA stimulate *in vitro* germination of petunia male gametophyte by activating Ca^{2+} dependent K^{+} -channels and by modulating the activity of PM H^{+} -ATPase

Kovaleva L. V.¹, Timofeeva G. V.¹, Zacharova E. V.², Voronkov A. S.¹

¹ K. A. Timiryazev Institute of Plant Physiology Russian Academy of Sciences, 35 Botanicheskaya st., 127276, Moscow, Russian Federation, fax: +7(499)678-54-20, tel.: +7(499)678-54-00

² All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, 42 Timiriazevskaya st., 127550, Moscow, Russian Federation, fax: +7(499)977-09-47, tel.: +7(499)976-65-44, e-mail: kovaleva_l@mail.ru

.....

It is known that development of male gametophyte is accompanied by considerable changes in its water status. During last period of pollen maturation in anther it undergoes rapid dehydration. Reactivation of pollen occurs on the surface of stigma in the course of its hydration. Hydration is the triggering mechanism of pollen germination both *in vivo* and *in vitro* and simultaneously the factor stimulating growth of pollen tubes which is initiated right after swelling and involved the formation of novel plasmalemma (PM), cell wall and the beginning of vacuolation. The most essential regulatory factor of the process is water transport into the vegetative cell. Pollen maintains its viability thanks to ability to fit the turgor pressure to changes of the external medium and the presence of the molecular mechanisms helping to main pollen water status. In the present work, the potential role of two phytohormones, ABA closely related to water stress and IAA playing a key role in development of plant reproductive organs, in germination of pollen tubes was investigated. Freshly collected pollen was cultivated for 2 hours in thermostat at 26 °C on the medium containing 0.3 M sucrose and 1.6 mM H_3BO_3 or 0.3 M sucrose, 1.6 mM H_3BO_3 , 1.3 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0.9 mM KNO_3 и 0.8 mM MgSO_4 . 2 mg of pollen and 2 ml of the cultivation medium were placed into flask, thereafter 1 μM IAA or ABA, 1 mM fluridone, 1 μM TIBA and 20 mM tetraethylammonia chloride (TEACL), a known inhibitor of K^{+} -channels, were added to the pollen suspension, with the last compound was added simultaneously with the cultivation medium. In the course of the studies it has been established that the growth-stimulating effect of IAA and ABA is due to their action on intracellular pH (pH_c), the membrane potential of PM, the activity of PM H^{+} -ATPase, K^{+} -channels in the same membrane. Two possible targets of the action of these compounds are revealed. These are represented by (1) PM H^{+} -ATPase, electrogenic proton pump responsible for polarization of this membrane, and (2) Ca^{2+} -dependent K^{+} -channels. The findings of the present work suggest that the hormone-induced pH_c shift is involved in cascade of the events including the functioning of pH-dependent K^{+} -channels. The results on the role of K^{+} -ions in the control of water-driving forces for transmembrane water transport allowed us to formulate the hypothesis that IAA and ABA stimulate germination of pollen tubes by activating K^{+} -channels.

Влияние наночастиц металлов на вторичный метаболизм *Silybum marianum*

Ковзунова О. В.¹, Решетников В. Н.¹, Азизбемян С. Г.²

¹ Центральный ботанический сад НАН Беларуси, ул. Сурганова, 2 в, Минск, 220012, Беларусь, факс: +375(17)284-14-64, тел.: +375(17)284-14-74, e-mail: olga-kora@mail.ru

² Институт физико-органической химии НАН Беларуси, ул. Сурганова, 13, Минск, 220072, Беларусь, тел./факс: +375(17)284-16-32

В настоящее время в медицинской практике важное место принадлежит лекарственным средствам растительного происхождения, т. к. они обладают широким спектром биологического действия. Потребность населения в фитопрепаратах удовлетворяется не полностью, и главным образом из-за дефицита сырья. Эти проблемы можно решить, используя новый вид фитосырья — биомассу лекарственных растений, получаемую биотехнологическим способом с направленным биосинтезом целевых веществ, пригодность которого не вызывает сомнений. Сырье, получаемое данным методом достаточно дорогое, поэтому остается актуальным поиск новых эффективных направлений, позволяющих снизить себестоимость. Разработка способов получения сырья методом культуры клеток и создание эффективных технологий фитопрепаратов представляет актуальную проблему, решение которой позволит внести важный вклад в развитие фармацевтической технологии и увеличить выпуск необходимых здравоохранению лекарственных средств. Силимарин — собирательное название биологически активных веществ расторопши пятнистой. На основе силимарина разработан ряд фармакологических препаратов с высоким антигепатотоксическим, иммуномодулирующим, гепатопротекторным и антихолестерологическим действием.

В качестве потенциальных регуляторов метаболизма каллусных культур *S. marianum* двух рас — красноцветкового сорта 'Золушка' белорусской селекции и белоцветкового сортообразца венгерской селекции были выбраны наночастицы меди (наномедь) и комплексный препарат наночастиц «Наноплант». Наночастицы представляют собой нерастворимые соединения, настолько малых размеров, что способны проникать через клеточную стенку и мембраны растений вместе с жидкой фазой. Они характеризуются высокой реакционной способностью и каталитической активностью.

Биологический эффект препаратов наночастиц оценивали в сравнение с каллусами (контроль) пассируемыми на среде Мурасиге-Скуга, содержащей БАП (2 мг/мл) и НУК (1 мг/мл). Было установлено, что внесение наномеди в среду увеличивало содержание флавоноидов и оксикоричных кислот (ОКК) в стеблевом и корневом каллусе 8 пассажа у исследуемых рас расторопши в 1,2 раза. В 11 пассаже сорта 'Золушка' в корневом каллусе наблюдалось уменьшение активности, а в стеблевом каллусе активность увеличилась в 1,2 раза. Такая же тенденция наблюдалась и в 24 пассаже. Однако добавление комплексного препарата «Наноплант» в корневом каллусе увеличивало содержание вторичных метаболитов в 1,5 (концентрация 0,15 мг/мл) и 1,1 (концентрация 1,5 мг/мл) раза, а в стеблевом каллусе в 1,8 и 1,9 раза соответственно. Внесение же наночастиц меди каллусным культурам венгерского сортообразца привело к увеличению активности в 11 и 24 пассажах. Так, в корневом каллусе 11 пассажа активность увеличилась в 1,9 раз, а в стеблевом в 2,7 раза, концентрация наноэлементов не имела значения. Добавление наномеди к корневым и стеблевым каллусам 24 пассажа привело к увеличению содержания флавоноидов и ОКК в 1,9 и 2,9 раза (при концентрации 0,15 мг/мл) и в 2,4 и 2,6 раза (при концентрации 1,5 мг/мл). Однако добавление препарата «Наноплант» у сортообразца венгерской селекции привело к уменьшению активности в стеблевом каллусе при концентрации 0,15 мг/мл и увеличила данный показатель в 1,2 раза при концентрации 1,5 мг/мл. На корневом каллусе наблюдалось увеличение содержания флавоноидов и ОКК в 1,2 раза. Наночастицы можно использовать в качестве модификатора метаболизма клеточными культурами расторопши пятнистой, однако уровень «ответа» зависит от вида каллуса, расы растения и концентрации наночастиц в среде.

Influence of metal's nanoparticles on *Silybum marianum* secondary metabolism

Kovzunova O. V.¹, Reshetnikov V. N.¹, Azizbekian S. G.²

¹ Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, 2v Surganova st., 220012, Minsk, Republic of Belarus, fax: +375(17)284-14-64, tel.: +375(17)284-14-74, e-mail: olga-kopa@mail.ru

² Institute of Physical Organic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, 13 Surganova st., 220072, Minsk, Republic of Belarus, tel./fax: +375(17)284-16-32

.....

Currently, in medical practice, an important place belongs to medicinal products of plant origin, as they have a wide range of biological effects. The population's need for phytopreparations is not fully met, and mainly because of a shortage of raw materials. These problems can be solved using a new type of phytocoagriculture — biomass of medicinal plants, obtained biotechnologically with targeted biosynthesis of target substances, the suitability of which is beyond doubt. The raw material obtained by this method is quite expensive, so it remains relevant to find new effective directions that allow to reduce the cost price. The development of methods for obtaining raw materials by the method of cell culture and the creation of effective technologies for phytopreparations presents an urgent problem, the solution of which will make an important contribution to the development of pharmaceutical technology and increase the production of essential medicines. Silymarin — the collective name of the biologically active substances thistle spotted. On the basis of silymarin a number of pharmacological preparations with high anti-hepatotoxic, immunomodulating, hepatoprotective and anticholesterological action was developed. As potential regulators of metabolism callus cultures *S. marianum* two races — red flowers 'Cinderella' Belarusian breeding varieties and accessions white flowers Hungarian selection were chosen copper nanoparticles and complex preparation of nanoparticles of cobalt, magnesium, copper and iron "Nanoplant". Nanoparticles of insoluble compounds are so small-sized that they are able to penetrate the cell wall and membrane plant together with the liquid phase. They are characterized by high reactivity and catalytic activity.

The biological effect of nanoparticle drugs evaluated in comparison with callus (control) replant callus on Murashige and Skoog medium containing BAP (2 mg/ml) and NAA (1 mg/ml). We have found that the introduction of nanocopper on culture medium increased the content of flavonoids and hydroxy-cinnamic acids at the stem and root callus 8 passage in the studied races thistle 1.2 times. In the 11th grade passage sort 'Cinderella' at the root callus observed a decrease in activity, and at the stem callus activity increased 1.2 times. The same trend was observed in the passage 24. However, addition of complex preparation "Nanoplant" root callus to increase the content of secondary metabolites 1.5 (concentration 0.15 mg/ml) and 1.1 (concentration of 1.5 mg/ml) once, and at the stem callus 1.8 and 1.9 times respectively. Adding a copper nanoparticles callus sort Hungarian accessions led to increased activity in the 11th and 24th passages. Thus, the root callus passage 11 Activity increased by 1.9 times, and 2.7 times the stem concentration nanoelements did not matter. Adding nanocopper to root and stem callus passage 24 led to an increase in the content of flavonoids and hydroxy-cinnamic acids 1.9 and 2.9 times (at a concentration of 0.15 mg/ml) in 2.4 and 2.6 times (at a concentration of 1.5 mg/ml). However, the addition of the drug "Nanoplant" accessions from sort Hungarian selection resulted in a decrease in the activity of the stem callus at a concentration of 0.15 mg/ml and the indicator has increased by 1.2 times at a concentration of 1.5 mg/ml. At the root callus observed increase in flavonoids and hydroxyl-cinnamic acids 1.2 times.

Nanoparticles can be used as a modifier of metabolism by cell cultures of milk thistle, spotted, but the level of "response" depends on the kind of callus, plant race and concentration of nanoparticles in the medium.

Сравнение устойчивости проростков среднеспелых сортов картофеля к хлоридному засолению в культуре *in vitro*

Ковтун И. С., Куат А. А., Мухаматдинова Е. А., Медведева Ю. В., Ефимова М. В.

Национальный исследовательский Томский государственный университет, пр-т Ленина, 36, Томск, 634050, Россия, факс: +7(3822)52-97-65, тел.: +7(3822)52-97-65, e-mail: kovtunirina2@gmail.com

Засоление почв наносит значительный урон сельскому хозяйству. Подавляющее большинство сельскохозяйственных культур относится к растениям гликофитам, механизмы солеустойчивости многих из них достаточно хорошо исследованы, в отличие от растений картофеля. В то же самое время картофель является четвертой по значимости продуктовой сельскохозяйственной культурой в мире, производство которой является определяющей для обеспечения продовольственной безопасности и социальной стабильности во многих странах. Устойчивость к хлоридному засолению сортоспецифична и может быть выявлена в культуре *in vitro*.

Нами проведена оценка устойчивости растений-регенерантов среднеспелых сортов *Solanum tuberosum* L. — ‘Накра’ и ‘Луговской’ к NaCl в диапазоне концентраций от 50 до 150 мМ. Для получения микроклонов использовали сегмент побега длиной 10 мм с боковой пазушной почкой и прилегающим листом. Культивирование микрочеренков *in vitro* осуществляли на модифицированной агаризованной безгормональной питательной среде Мурасиге-Скуга (рН = 5.8), с добавлением витаминов (тиамин, пиридоксин и никотиновая кислота) и сахарозы — контроль. Опытные варианты содержали NaCl в концентрациях 50, 75, 100, 125 и 150 мМ. Продолжительность выращивания составляла 30 суток. Степень устойчивости сортов определяли по ростовым показателям — длина осевых органов, количество ярусов, листьев, площадь листьев. Среди анализируемых физиологических показателей учитывали накопление фотосинтетических пигментов, иминокислоты пролина и интенсивность перекисного окисления липидов.

Нами показано, что растения картофеля проявляли высокую чувствительность к засолению вне зависимости от сорта. Самая низкая из анализируемых концентраций — 50 мМ незначительно активировала рост по ряду показателей. Увеличение концентрации до 75 мМ способствовало выявлению более устойчивого сорта. Растения сорта ‘Накра’ незначительно реагировали на присутствие соли, тогда как у растений сорта ‘Луговской’ наблюдалось угнетение роста. Выраженный негативный эффект для сорта ‘Накра’ отмечался только, начиная с концентрации NaCl 100 мМ.

Содержание пролина и интенсивность перекисного окисления липидов, характеризующаяся уровнем накопления малонового альдегида (МДА) оценивали в листьях, стеблях и корнях растений. Накопление МДА наблюдалось в растениях картофеля сорта ‘Луговской’ при 50 мМ NaCl. Данная концентрация соли не оказывала повреждающего воздействия на сорт ‘Накра’, что выражалось в отсутствии накопления МДА во всех анализируемых частях растений. Тенденция в сторону увеличения интенсивности перекисного окисления липидов наблюдалась, начиная с концентрации NaCl 100 мМ. Увеличение содержания пролина наблюдалось у двух сортов при действии засоления. В большей степени данный эффект выражен у растений сорта ‘Луговской’, что, по-видимому, определялось направленностью стратегии адаптации в сторону синтеза данного осмопротектора. Фотосинтетический аппарат растений анализируемых сортов картофеля проявлял высокую степень устойчивости к хлоридному засолению по сравнению с другими физиологическими показателями.

Таким образом, на основании морфометрических показателей и степени перекисного окисления липидов выявлено, что сорт ‘Накра’ характеризовался высокой степенью устойчивости к действию соли в широком диапазоне концентраций.

Исследование было поддержано грантом Российского научного фонда (РНФ) № 16-16-04057.

Comparison of medium-ripened varieties of potato regenerate resistance to chloride salinization *in vitro*

Kovtun I. S., Kuat A. A., Muhamatdinova E. A., Medvedeva Yu. V., Efimova M. V.

National Research Tomsk State University, 36 Lenin ave., 634050, Tomsk, Russian Federation, fax/tel.: +7(3822)529765, e-mail: kovtunirina2@gmail.com

.....

Salinity is a main stress factor restricting growth and productivity of agricultural crops. The overwhelming majority of agricultural crops belong to glycophytes whose mechanisms of salt tolerance are thoroughly investigated, but this is not the case for potato. At the same time, potato ranks fourth among the major world food crops and its production is very important for ensuring food security and social stability in many countries. Resistance to chloride salinity is variety-specific and can be detected in culture *in vitro*.

We carried out an assessment of sustainability plant regenerates of mid-ripened varieties of *Solanum tuberosum* — ‘Nakra’ and ‘Lugovskoi’ to NaCl in wide range of concentrations from 50 to 150 mM. Regenerated plants were produced *in vitro* from a 10 mm shoot segment with a lateral axillary bud and adjacent sheet. Cultivation of regenerates *in vitro* during 30 days was carried out on Murashige and Skoog modified agarized non-hormonal nutrient medium (pH=5.8), with addition of vitamins (thiamine, pyridoxine, nicotinic acid) and sucrose — control variant. Experimental variants contained NaCl in concentrations of 50, 75, 100, 125, 150 mM. Degree of resistance for two potato varieties was determined by growth parameters — length of axial organs, quantity of tiers, quantity and area of leaves. Also, we analyzed some physiological parameters, such as, the accumulation of photosynthetic pigments, of imino acid proline and the rate of peroxidation of lipids (POL).

It was shown that the potato plants had a great sensitivity to chloride salinity regardless of the variety. The lowest tested concentration — 50 mM NaCl activated growth reactions. Increase of concentration up to 75 mM allowed to identify the more salt-tolerant variety. Plants of cv. ‘Nakra’ slightly reacted on salt presence, while, the plants of cv. ‘Lugovskoi’ response to salinity by growth inhibition. The pronounced negative effect for the cv. ‘Nakra’ was noted only beginning with 100 mM NaCl.

The proline content and the rate of peroxidation of lipids, which determined by the content of malonic dialdehyde (MDA), was measured in leaves, shoots and roots of plant regenerates. In response to slight salinity (50 mM NaCl), plants of cv. ‘Lugovskoi’ showed an increase in MDA content. This salt concentration, it was shown, did not have a damaging effect on the cv. ‘Nakra’, which was expressed in the absence of accumulation of MDA in all analyzed plant parts. The tendency towards increasing the intensity of lipid peroxidation was observed from 100 mM concentration of NaCl. Increase of proline content in both varieties under the salt stress was noted. This effect was greatly express in cv. ‘Lugovskoi’ plants, which, apparently, was determined by the direction of the adaptation strategy towards the synthesis of this osmoprotector. The photosynthetic apparatus of the potato plants, regardless of the variety, exhibited a high degree of resistance to chloride salinity in comparison with other physiological parameters.

Thus, according to the morphometric parameters and the rate of peroxidation of lipids, it was marked that the cv. ‘Nakra’ is more tolerance to salinity.

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (project No. 16-16-04057).

Коллекция Республиканского генетического банка картофеля, поддерживаемая в культуре *in vitro*

**Козлов В. А., Анципович В. В., Семанюк Т. В., Яхонт Ю. В.,
Кондратюк А. В.**

Научно-практический центр НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству,
ул. Ковалева, 2 а, аг. Самохваловичи, Минский район, 223013, Беларусь,
факс: +375(17)506-70-01, тел.: +375(17)506-61-39, e-mail: wiko@mail.ru

Картофель относится к числу немногих сельскохозяйственных культур, размножаемых вегетативно. По этой причине сорта картофеля со временем начинают поражаться болезнями и вредителями, снижается продуктивность, биохимические показатели, ухудшается качество клубней. Поддержание сортов в культуре *in vitro*, позволяет сохранять их генетический потенциал и способствует ускоренному размножению независимо от времени года.

Коллекция Республиканского генетического банка картофеля, поддерживаемая в культуре *in vitro*, включает в себя Базисную коллекцию сортов картофеля белорусской селекции и Коллекцию диких видов и межвидовых соматических гибридов картофеля.

Введение сортов картофеля в культуру *in vitro* предусматривает отбор здоровых растений (клонов) по результатам визуальной оценки с последующим вычленением индексов и оценкой полученных из них растений на зараженность вирусными и бактериальными болезнями методом ИФА и ПЦР. Выделенные клоны используются для получения здоровых линий (клон-линия) *in vitro*. Полученные растения подвергаются завершающему комплексному тестированию методами ИФА и ПЦР для перевода в базисную коллекцию и для микроклонального размножения. Базисная коллекция сортов картофеля белорусской селекции в культуре *in vitro* включает 62 сорта.

Коллекция диких видов включает 47 видов картофеля, представленных 263 образцами. В ней сохраняются образцы картофеля, отобранные по хозяйственно ценным признакам. В коллекции выделено 20 образцов с высокой устойчивостью к черной ножке, 71 образец с высокой устойчивостью к фитофторозу, 23 образца, устойчивых к Y-вирусу, 37 образцов, устойчивых к L-вирусу, 27 образцов, устойчивых к золотистой картофельной нематоде, 30 образцов, устойчивых к бледной картофельной нематоде, и 14 образцов с высоким содержанием крахмала.

Выделенные по хозяйственно ценным признакам образцы диких видов картофеля активно используются в предварительной селекции на диплоидном уровне с последующим переводом лучших гибридов на тетраплоидный уровень методом мейотической полиплоидии. К настоящему времени в селекционный процесс вовлечено более 40 видов картофеля, и на их основе создан перспективный исходный материал для селекции сортов картофеля различного целевого назначения.

Коллекция межвидовых гибридов представлена 94 образцами 14 комбинациями слияния протопластов. Межвидовые соматические гибриды получены с не клубненосными видами *S. caripense*, *S. brevidens*, *S. etuberosum* и фитофтороустойчивыми североамериканскими видами *S. bulbocastanum*, *S. polyadenium*, *S. jamesii* и *S. cardiophyllum*, которые являются ценными селекционными образцами, но в полевых условиях плохо завязывают клубни.

Среди соматических гибридов, полученных от дикого мексиканского вида *S. bulbocastanum*, четыре гибрида имеют высокую полевую устойчивость к Y-вирусу картофеля. Все образцы данной комбинации обладают очень высокой устойчивостью к фитофторозу. Среди соматических гибридов, полученных от слияния с не клубненосными видами *S. etuberosum* и *S. brevidens*, выделены образцы с иммунитетом к Y- и L-вирусам и высокой устойчивостью к парше обыкновенной.

Соматические гибриды используются в селекции на вирусоустойчивость и фитофтороустойчивость.

Maintaining of the Republican collection of potato genebank in culture *in vitro*

Kozlov V. A., Antsipovich V. V., Semanyuk T. V., Yakhont Yu. V., Kondratiuk A. V.

Research and Practical Center of National Academy of Sciences of Belarus of Potato, Fruit and Vegetable Growing, 2 a Kovaleva st., Samokhvalovichi, Minsk region, 223013, Republic of Belarus, fax: +375(17)506-70-01, tel.: +375(17)506-61-39, e-mail: wiko@mail.ru

.....

Potatoes are one of the few vegetatively propagated agricultural crops. That is why various diseases and pests affect potato varieties, while their producing capacity, biochemical values, and tuber quality deteriorate over time. Maintaining of potato species in culture *in vitro* saves their genetic potential and promotes accelerated propagation regardless of seasons.

The Republican collection of potato gene bank in culture *in vitro* consists Basic collection of potato varieties of Belarusian breeding and the Collection of wild species and interspecific potato hybrids.

Adding healthy potato varieties in culture *in vitro* requires visual control, as well ELISA and PCR methods, for absence of viral and bacterial diseases. Then selected plants are added to the basic collection for microclonal propagation. The Basic collection of potato varieties of Belarusian breeding in culture *in vitro* consists 62 varieties.

The Collection of wild potato species includes 47 species (263 samples) with agronomic characters. The collection has 20 samples with high resistance to black stem, 71 samples with high resistance to late blight, 23 samples with resistance to potato virus Y (PVY), 37 samples with resistance to potato leafroll virus, 27 samples with resistance to golden nematode, 30 samples with resistance to potato cyst nematode and 14 samples with high level of starch.

The samples of wild potato species with agronomic characters are used in breeding on diploid level, then the best hybrids will be changed to tetraploid level by meiotic polyploidy. Above 40 potato species took part in breeding and promising initial forms were created for breeding potato varieties.

Collection of interspecific potato hybrids were created by protoplast fusion. The collection includes 94 samples 14 combinations. Interspecific potato hybrids based on nontuberiferous wild species *S. caripense*, *S. brevidens*, *S. etuberosum* and North American species with late blight resistance *S. bulbocastanum*, *S. polyadenium*, *S. jamesii*, *S. cardiophyllum*. This wild species are valuable breeding samples, but they don't have enough tuber formation in the field.

Four somatic hybrids based on wild Mexican specie *S. bulbocastanum* have high field resistance to PVY. All samples of this combination have high resistance level to late blight. Among somatic hybrids based on nontuberiferous wild species *S. etuberosum* and *S. brevidens* were indicated samples with immune resistance to PVY and with high resistance to potato scab.

Somatic hybrids are used in breeding like sources of resistance to viruses and to late blight.

Адаптация *ex vitro* растений-регенерантов жимолости синей (*Lonicera caerulea* L.)

Колбанова Е. В., Кухарчик Н. В.

Институт плодоводства, ул. Ковалева, 2, аг. Самохваловичи, Минский район, 223013, Беларусь, тел.: +375(17)506-66-84, e-mail: kolbanova@tut.by

Для адаптации *ex vitro* сортов жимолости 'Волхова', 'Крупноплодная', 'Голубое веретено', 'Павловская', укорененных *in vitro*, использовали субстраты: 1) торфяной субстрат (нестерильный) — смесь торфа «Двина» и агроперлита (3:1); 2) торфяной субстрат (стерильный) — смесь торфа «Двина» и агроперлита (3:1), прокаленный в сухожаровом шкафу при 160 °С в течение 2,5 часов; 3) агроперлит; 4) БИОНА-311. Время адаптации на этих субстратах июнь-июль. Влияние времени года (ноябрь-декабрь, январь-февраль, февраль-март, апрель-май, июнь-июль) на адаптацию растений оценивали при использовании субстрата агроперлит.

Двухфакторный дисперсионный анализ выявил влияние с высоким уровнем значимости ($p < 0,001$) как сортовых особенностей, так и субстрата и двух факторов вместе на выход адаптированных растений-регенерантов жимолости и на такие морфологические показатели растений-регенерантов как средняя длина стебля и средняя длина корней.

В среднем по всем сортам максимальный выход адаптированных растений (100%), не имеющих признаков хлороза, со средней длиной стебля $11,24 \pm 0,21$ см и средней длиной корней у растений $10,48 \pm 0,22$ см отмечен на стерильном торфяном субстрате. Высокий выход адаптированных растений (95,58%), не имеющих признаков хлороза, со средней длиной стебля $8,10 \pm 0,72$ см и средней длиной корней у растений $6,89 \pm 0,16$ см можно получать и на дешевом субстрате агроперлит. Субстрат БИОНА-311, также обеспечивающий высокий выход адаптированных растений (97,48%) и высокие морфологические показатели развития растений жимолости (средняя длина стебля $12,76 \pm 0,56$ см и средняя длина корней у растений $10,20 \pm 0,49$ см), имеет существенный недостаток — высокую стоимость по сравнению с торфяным субстратом и агроперлитом. Минимальный выход адаптированных растений наблюдали на нестерильном торфяном субстрате: 41,67% — у сорта 'Павловская', 63,89% — у сорта 'Голубое веретено', 65,76% — у сорта 'Крупноплодная' и 80,41% — у сорта 'Волхова' (в среднем по всем сортам — 62,93%).

Количество адаптированных растений в среднем на всех субстратах составило у сортов Волхова — 92,81%, Крупноплодная — 91,44%, Голубое веретено — 88,89% и Павловская — 82,84%.

Двухфакторный дисперсионный анализ не показал влияние сорта, но выявил достоверное влияние времени года ($p < 0,01$) и совместное влияние этих двух факторов ($p < 0,01$) на выход адаптированных растений-регенерантов жимолости.

Количество адаптированных растений-регенерантов сортов 'Волхова' и 'Голубое веретено' в зависимости от срока адаптации колебалось от 91,67 до 100%, но достоверных различий по сроку адаптации не наблюдалось у этих сортов. Для сортов 'Крупноплодная' и 'Павловская' достоверно ниже показатели адаптации были в январе — феврале (84,62%) и в ноябре — декабре (85,35%) соответственно, по сравнению с другими сроками, когда выход адаптированных растений у этих сортов был не менее 96–97%.

Таким образом, выход адаптированных растений по сортам в среднем по всем срокам адаптации составил: 95,17% ('Павловская'), 95,83% ('Крупноплодная'), 96,14% ('Волхова') и 97,51% ('Голубое веретено'), достоверных различий не наблюдали. По срокам адаптации в среднем по всем сортам также получены высокие результаты: не менее 92,78% в конце осени — начале зимы (ноябрь — декабрь). Максимальное количество адаптированных растений (99,46% и 98,19%) получено в конце зимы (февраль — март) — весной (апрель — май). Это дает основание сделать заключение, что процесс адаптации *ex vitro* растений-регенерантов жимолости изученных сортов можно проводить круглогодично с высоким выходом адаптированных растений (не менее 85%).

Ex vitro adaptation of microplants of blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.)

Kolbanova E. V., Kukharchyk N. V.

Institute for Fruit Growing, 2 Kovalev st., 223013, Samokhvalovichy, Minsk region, Republic of Belarus, tel.: +375(17)506-66-84, e-mail: kolbanova@tut.by

For *ex vitro* adaptation of blue honeysuckle cultivars 'Volhova', 'Krupnoplodnaya', 'Goluboe vereteno' and 'Pavlovskaya' rooted *in vitro* the following substrates were used: 1) unsterile peat substrate — a mixture of peat "Dvina" and agroperlite (3:1); 2) sterile peat substrate — a mixture of peat "Dvina" and agroperlite (3:1), sterilized in a dry-fire cabinet at 160°C for 2.5 hours; 3) agroperlite; 4) BIONA-311. The adaptation on these substrates was carried out in June-July. Influence of the season (November-December, January-February, February-March, April-May, June-July) on plant adaptation was evaluated using agroperlite substrate.

Two-way analysis of variance revealed the influence of substrate and of cultivar features on percentage of adapted honeysuckle microplants, on average stem length, on average length of roots (with high level of significance ($p < 0.001$)).

On average in all cultivars the maximum percentage of adapted plants (100 %) without chlorosis symptoms was on a sterile peat substrate (with average stem length of 11.24 ± 0.21 cm and average length of roots of 10.48 ± 0.22 cm). A high percentage of the adapted microplants (95.58 %) without chlorosis symptoms can be received also on a cheap substrate agroperlite (with an average stem length of 8.10 ± 0.72 cm and average length of roots of 6.89 ± 0.16 cm). BIONA-311 substrate provides a high percentage of adapted microplants (97.48 %) and good morphological parameters of honeysuckle (average stem length of 12.76 ± 0.56 cm and average length of roots of 10.20 ± 0.49 cm), but BIONA-311 has essential disadvantage — high cost in comparison with a peat substrate and agroperlite. The minimal percentage of adapted microplants was received on unsterile peat substrate: 41.67 % for cv. 'Pavlovskaya', 63.89 % for cv. 'Goluboe vereteno', 65.76 % for cv. 'Krupnoplodnaya' and 80.41 % for cv. 'Volhova' (on average for all cultivars — 62.93 %).

The number of adapted plants on average on all substrates was 92.81 % for cv. 'Volhova', 91.44 % for cv. 'Krupnoplodnaya', 88.89 % for cv. 'Goluboe vereteno' and 82.84 % for cv. 'Pavlovskaya'.

Two-way analysis of variance hasn't shown influence of cultivar on percentage of the adapted honeysuckle microplants. But this analysis revealed reliable influence of season ($p < 0.01$) and joint influence of these two factors (season and cultivar) ($p < 0.01$) on percentage of the adapted honeysuckle microplants.

The number of the adapted microplants of cultivars 'Volhova' and 'Goluboe vereteno' varied from 91.67 to 100 % depending on term of adaptation. Time of adaptation don't influence reliably on number of the adapted microplants of these cultivars. For cultivars 'Krupnoplodnaya' and 'Pavlovskaya' percentage of the adapted plants was reliably lower in January-February (84.62 %) and in November-December (85.35 %) respectively, in comparison with other terms of adaptation, when percentage of the adapted plants of these cultivars was not less than 96–97 %.

Thus, percentage of adapted plants on average in all terms of adaptation was: 95.17 % (cv. 'Pavlovskaya'), 95.83 % (cv. 'Krupnoplodnaya'), 96.14 % (cv. 'Volhova') and 97.51 % (cv. 'Goluboe vereteno'); reliable differences between cultivars weren't observed. On average for all cultivars were received not less than 92.78 % adapted plants at the end of fall — at the beginning of winter (November-December); the maximum number of adapted plants (99.46 % and 98.19 %) was received at the end of winter (February-March) — and in spring (April-May), respectively.

It gives the base to make conclusion that process of *ex vitro* adaptation of honeysuckle microplants of analyzed cultivars can be carried out all the year round with a high percentage of adapted plants (not less than 85 %).

Разработка методики акклиматизации микрорастений ясеня обыкновенного (*Fraxinus excelsior* L.) к условиям *ex vitro*

Константинов А. В., Пантелеев С. В., Полевикова Е. Н.

Институт леса НАН Беларуси, ул. Пролетарская, 71, Гомель, 246001, Беларусь,
факс: +375(232)75-73-73, тел.: +375(232)75-69-02, e-mail: avkonstantinof@mail.ru

Ясень относится к техническим породам, все его части востребованы промышленностью, а древесина по основным техническим характеристикам и декоративным качествам не уступает дубовой и подходит для изготовления паркета и шпона. В результате воздействия ряда неблагоприятных климатических факторов и возрастающей фитопатогенной нагрузки, связанной с инвазивными инфекциями, в последнее десятилетие отмечается процесс деградации насаждений ясеня обыкновенного в Республике Беларусь. Для эффективного хозяйственного использования, сохранения биоразнообразия и изучения генетико-селекционных особенностей ясеня перспективным направлением является получение посадочного материала от элитных генотипов биотехнологическими методами и его использование для закладки специализированных лесных плантаций.

В качестве экспериментального материала использовали микрорастения ясеня клона Fr из коллекции культур *in vitro* лаборатории генетики и биотехнологии. Укорененные микропобеги после 4 недель культивирования *in vitro* на среде $\frac{1}{2}$ MS (Murashige & Skoog, 1962), со сниженным до 10,0 г-л⁻¹ сахарозы и дополненной 0,5 мг-л⁻¹ NAA, акклиматизировали в кассетах по 20 ячеек объемом 200 мл, используя субстраты различного состава. Для приготовления почвенных смесей использовали низинный торф (контроль) или нераскисленный верховой торф в соотношении 3:1 с крупнозернистым речным песком или применяли субстрат из агроперлита, насыщенного смесью макро- и микросолей согласно прописи WPM (G. Lloyd & B. McCown, 1980) в зависимости от варианта опыта, по две повторности на каждом. Выращивание растений осуществляли под фитолампами марки OSRAM L 36W/77 FLUORA при температуре 22 ± 2 °C, освещенности 1,5–2,0 тыс. лк. и фотопериоде 16/8. Процесс акклиматизации включал 2 этапа, на первом кассеты помещали в климатическую камеру, для обеспечения относительной влажности воздуха около 90–95 % в течение 4 недель. После чего посадочный материал выращивался в сходных условиях, но без повышения влажности воздуха (45–55 %) в течение 4 недель. Для анализа адаптивной способности регенерантов к росту в нестерильных почвенных условиях *ex vitro* проводили учет приживаемости микрорастений (%), высоты (см) и диаметра (мм) стволика.

Сравнение влияния различных видов торфов на морфометрические показатели саженцев показало, что средняя высота растений опытных групп после восьми недель выращивания достоверно не отличалась ($9,7 \pm 2,1$ см и $10,4 \pm 2,8$ см на низинном и верховом торфе соответственно). Приживаемость была равна 70,0 % и 82,5 % соответственно. Наибольшая приживаемость микрорастений (97,5 %) в конце периода акклиматизации отмечена в варианте с агроперлитом, насыщенным минеральными солями для древесных растений. При этом на указанном субстрате после четырех и восьми недель культивирования средняя высота стволика саженцев превышала показатели контрольной группы ($4,1 \pm 1,4$ см и $9,7 \pm 2,1$ см) в 1,2–1,5 раза ($5,2 \pm 1,3$ см и $14,1 \pm 3,9$ см соответственно). Диаметр достоверно не отличался и составлял около $1,2 \pm 0,3$ мм. Представленные результаты, вероятно, связаны с положительным влиянием сбалансированного комплекса минеральных солей, находящихся в доступной форме, обеспечившего плавную адаптацию растений к нестерильным условиям выращивания.

Таким образом, в ходе исследования установлен оптимальный состав субстрата для использования на этапе акклиматизации микроклонально размноженных растений ясеня и дальнейшего получения посадочного материала.

Development of acclimatization methods of the common ash (*Fraxinus excelsior* L.) microplants to *ex vitro* conditions

Konstantinov A. V., Panteleev S. V., Polevikova E. N.

Institute of Forest of the National Academy of Sciences of Belarus, 71 Proletarskaya st., 246001, Gomel, Republic of Belarus, fax: +375(232)75-73-73, tel.: +375(232)75-69-02, e-mail: avkonstantinof@mail.ru

.....

Ash belongs to technical breeds, all its parts are in demand by industry, and wood according to the main technical characteristics and decorative qualities is not inferior to oak and suitable for the production of parquet and veneer. As a result of the impact of a number of unfavorable climatic conditions and the increasing phytopathogenic burden associated with invasive infections, the process of degradation of ash stands in the Republic of Belarus has been observed in the last decade. For effective economic use, conservation of biodiversity and research of genetic selection features of ash, a promising direction is to providing planting material from elite genotypes by biotechnological methods and its use for creation of forest stands.

As an experimental material, microplants of ash from clone Fr from the collection of *in vitro* cultures of the Genetics and Biotechnology Laboratory were used. Rooted microshoots after 4 weeks of *in vitro* culture on ½MS medium (Murashige & Skoog 1962), reduced to 10.0 g·l⁻¹ sucrose and supplemented with 0.5 mg·l⁻¹ NAA, were acclimatized in cassettes of 20 cells with a volume of 200 ml, using substrates of different composition. For the preparation of soil mixtures, low-moor peat (control) or non-oxidized high-moor peat was used in a ratio of 3:1 with coarse-grained river sand, or a substrate from agropperlite was used saturated with a mixture of macro- and microsalts according to WPM (G. Lloyd & B. McCown, 1980) in depending on the variant of the experiment, two replication on each. Cultivation of plants was carried out under phytolamps of OSRAM L 36W/77 FLUORA brand at a temperature of 22±2 °C, illumination of 1,5–2,0 thous. lux. and photoperiod 16/8. The process of acclimatization included 2 stages, on the first one cassette was placed in a climatic chamber to provide relative air humidity of about 90–95 % for 4 weeks. After that, the planting material was grown under similar conditions, but without increasing the humidity of the air (45–55 %) for 4 weeks. To analyze the adaptive ability of regenerants for growth in non-sterile soil conditions *ex vitro* before planting in substrates, after cultivation in climatic chambers and at the end of the acclimatization period, establishment of microplants, the height (cm) and diameter (mm) of the stem were measured.

Comparison of the influence of different types of peat on the morphometric parameters of seedlings showed that the average plant height of the experimental groups after eight weeks of growth did not differ significantly (9.7±2.1 cm and 10.4±2.8 cm on low-moor and high-moor peat, respectively). Seedling establishment were 70.0 % and 82.5 %, respectively.

The highest establishment of microplants (97.5 %) at the end of the acclimatization period was noted in the variant with agropperlite, saturated with mineral salts for forest tree species. In this case, after the four and eight weeks of cultivation, the average height of the stem of the seedlings exceeded the parameters of the control group (4.1±1.4 cm and 9.7±2.1 cm) by 1.2–1.5 times (5.2±1.3 cm and 14.1±3.9 cm, respectively). The diameter of the plants was not significantly different and was about 1.2±0.3 mm. The results are probably related to the positive effect of a balanced complex of mineral salts in an accessible form, which provided a smooth adaptation of plants to non-sterile growing conditions.

Thus, during the study, the optimal composition of the substrate was established for use in the acclimatization stage of microclonal propagated ash plants and further obtaining planting material.

Клональное микроразмножение и доращивание посадочного материала ольхи черной (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.)

Константинов А. В., Кулагин Д. В., Полевикова Е. Н., Емельянова О. В.

Институт леса НАН Беларуси, ул. Пролетарская, 71, Гомель, 246001, Беларусь, факс: +375(232)75-73-73, тел.: +375(232)75-69-02, e-mail: avkonstantinof@mail.ru

Массовое воспроизводство селекционно отобранных форм древесных растений с применением методов лесной биотехнологии для повышения качественного состава лесонасаждений за счет использования клоновых растений, характеризующихся повышенной биологической устойчивостью к фитопатогенам, вредителям и техногенным факторам среды, позволяет сохранять лесные генетические ресурсы, создавать сырьевые и лесосеменные плантации и получать товарную древесину без существенных нарушений лесных экосистем. Ускоренное получение генетически улучшенного посадочного материала в существенной мере зависит от эффективности технологий акклиматизации микроклональных регенерантов и разработки оптимальных циклов их доращивания в условиях теплиц и лесных питомников.

Работу проводили на базе лаборатории генетики и биотехнологии Института леса и постоянного лесного питомника ГЛХУ «Гомельский лесхоз». Опыты ставили с использованием микро-растений ольхи черной (6 клонов) из коллекции культур *in vitro*. Укорененные микропобеги получали в течение трех недель после черенкования исходного материала на модифицированную безгормональную питательную среду, включающую макросоли WPM (G. Lloyd & B. McCown, 1980), макросоли и витамины MS (Murashige & Skoog, 1962), 30 г/л-1 сахарозы и 7 г/л-1 микробиологического агара («Conda», Испания). Акклиматизировали материал в поддонах 50×35×10 см по 80 шт. на субстратах из низинного торфа с агроперлитом в соотношении 3:2 по объему или из агроперлита, насыщенного смесью макро- и микросолей по прописи WPM в двух повторностях для каждого варианта. Высадку растений осуществляли в две ротации 1. адаптация в марте-апреле с последующей пересадкой в смесь верхового торфа песка и перлита (3:1:1) двухмесячного адаптированного материала в теплицах в пакеты для рассады объемом 700 мл, 2. адаптация в мае-июне, пересадка саженцев в кассеты по 20 ячеек объемом 200 мл в торфоперлитный субстрат аналогичного состава и транспортировка в теплицы для доращивания и зимней передержки до нового сезона. Условия лабораторного этапа акклиматизации: температура 22±2 °С, освещенность 1,5–2,0 тыс. лк. фитолампами марки OSRAM L 36 W /77 FLUORA, фотопериод 16/8. На первом этапе кассеты помещали в климатическую камеру с высокой относительной влажностью воздуха (90–95 %) на 4 недели, далее второй этап проводили в сходных условиях освещения и температуры, но при влажности воздуха около 45–55 % в течение 4 недель.

В результате экспериментов показано, что приживаемость регенерантов на субстрате из агроперлита оказалась на 13,1 % выше, чем на смеси торфа и агроперлита (92,5 % и 79,4 % соответственно). Средняя высота стволиков саженцев в данных вариантах в конце лабораторного этапа акклиматизации составляла 11,3±2,8 см и 9,8±3,4 см соответственно (выше в 1,2 раза). Доращивание в течение вегетационного сезона позволило получить достаточно однородные по высоте саженцы (36,2±9,4 см и 33,4±7,2 см после адаптации на перлитном и торфяном субстрате соответственно).

Опытная группа, высаженная для акклиматизации позже достигла значения указанного показателя равного 10,6±4,3 см (приживаемость 82,5 %), а после доращивания в ячейках в течение трех месяцев (до октября) — 19, 3±6,7 см. После зимней передержки сохранилось 88,6 % растений. Полученный микроклональный посадочный материал был высажен в лесные культуры на территории ГЛХУ «Гомельский лесхоз».

В результате работы нами была отработана методика размножения, акклиматизации и доращивания саженцев ольхи черной для создания лесных плантаций.

Micropropagation and production of planting material of black alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.)

Konstantinov A. V., Kulagin D. V., Polevikova E. N., Emelyanova O. V.

Institute of Forest of the National Academy of Sciences of Belarus, 71 Proletarskaya st., 246001, Gomel, Republic of Belarus, fax: +375(232)75-73-73, tel.: +375(232)75-69-02, e-mail: avkonstantinof@mail.ru

.....

Mass reproduction of selected forms of woody plants using forest biotechnology methods could improve the qualitative composition of forest stands. This affect could be reached due to the clonal plants characterized by increased biological resistance to phytopathogens, pests and technogenic factors of the environment. All of this makes it possible to preserve forest genetic resources, to establish seed orchards and highly productive forest plantations for obtaining marketable timber without significant harm for natural forest ecosystems. Important step of accelerated production of genetically improved planting material is *ex vitro* acclimatization of clonally propagated regenerants and their growing in conditions of forest nurseries. Thus appropriate technologies need to be developed.

The research was carried out on the basis of the Genetics and Biotechnology Laboratory of the Institute of Forest and the nursery of Gomel Forestry Enterprise. The experiments were performed using microplants of six *in vitro* clones of black alder. Rooting of microplants were obtained within three weeks on a hormone-free nutrient medium comprising macro-salts of WPM (G. Lloyd & B. McCown, 1980), micro-salts and vitamins of MS (Murashige & Skoog, 1962). Sucrose and microbiological agar (Conda, Spain) were added to concentrations 30 g·l⁻¹ and 7 g·l⁻¹ respectively. The microplants were acclimatized in pallets (50×35×10 cm, 80 pcs. per one pallet) on substrates consisting of lowland peat with agropelrite in a ratio of 3:2 by volume or of agropelrite saturated with a mixture of inorganic salts according to WPM. The conditions of the acclimatization stage are temperature 22±2 °C, illumination 1,5–2,0 thousand lux (OSRAM L 36W / 77 FLUORA lamps used), photoperiod 16/8. At the first stage the pallets were placed in a climatic chamber with a high relative humidity (90–95 %) for 4 weeks. The second 4 weeks acclimatization stage was conducted under air humidity of about 45–55 %. The planting material were grown in two ways: 1. Acclimatization during March and April followed by their transfer to 700 ml pots with a mixture of peat, sand and perlite (ratio 3:1:1 respectively); 2. Acclimatization during May and June followed by a transfer to 200 ml pots (20 pots are in one cassette) with the same substrate mixture. The pots with plants were transported to greenhouse for rearing and winter overexposure. There were two replicates regenerants for each variant.

It was shown that the survival rate of regenerants during acclimatization on the agropelrite substrate was 13.1 % higher than on peat and agropelrite mixture (92.5 % and 79.4 %, respectively). The average height of seedlings in these variants at the end of acclimatization was 11.3±2.8 cm and 9.8±3.4 cm, respectively (15.3 % higher). Growing during vegetation season made it possible to obtain sufficiently uniform seedlings (36.2±9.4 cm and 33.4±7.2 cm after adaptation on perlite and peat substrate respectively).

The average size of the above-ground part of plants from the experimental group planted for acclimatization later reached 10.6±4.3 cm (survival rate 82.5 %) after acclimatization and 19.3±6.7 cm after growing in greenhouse for three months. After winter overexposure 88.6 % of plants were preserved. The resulting microclonal planting material was planted in forest plantations on the territory of the Gomel Forestry Enterprise.

As a result of the work, we developed the technique of reproduction, acclimatization and growing of black alder seedlings for the establishment of forest plantations.

Изучение эффективности стерилизации растительного материала *Tilia parvifolia* Ehrh. ex Hoffm. для инициации асептических культур

Константинов А. В., Каган Д. И., Петров Г. В.

Институт леса НАН Беларуси, ул. Пролетарская, 71, Гомель, 246001, Беларусь,
факс: +375(232)75-73-73, тел.: +375(232)75-69-02, e-mail: avkonstantinof@mail.ru

Микроорганизмы, ассоциированные с культурой растительных тканей, оказывают отрицательное влияние на ростовые процессы культур *in vitro*, повреждая ткани непосредственно или изменяя химические параметры среды посредством выделения метаболитов. В результате наблюдается снижение регенерационной способности клеточных суспензий и каллусов, угнетается морфоорганоогенез микропобегов, что затрудняет клональное микроразмножение или вызывает гибель эксплантов. На начальных этапах культивирования *in vitro* важной задачей выступает правильный подбор концентраций стерилизующих агентов, времени экспозиции и режима промывания первичных эксплантов, что позволяет элиминировать эпифитные микроорганизмы и получить высокий выход стерильного материала, минимизируя возможное повреждающее действие.

Для инициации культур *in vitro* использовали зеленые побеги липы мелколистной, полученные в сентябре с вегетирующих однолетних саженцев с закрытой корневой системой, выращенных в условиях теплицы лесного питомника. Стерилизацию проводили в два этапа, вначале материал промывали раствором детергентов и антисептиков «AOS», «Хлороцид», «Domestos», перекись водорода (концентрации 5 %, 0,4 %, 1 %, 10 % соответственно), ополаскивали 30 мин. проточной водопроводной водой. В ламинар-боксе обрабатывали побеги 70 % этанолом (1 мин.), 0,1 % сулемой (HgCl₂, 3 или 6 мин.) и трехкратно ополаскивали стерильной дистиллированной водой. В зависимости от варианта опыта апробировали следующие схемы обработки: 1. «AOS» + перекись + этанол + сулема (3 мин.); 2. «AOS» + «Хлороцид» + перекись + спирт + сулема (3 мин.); 3. «AOS» + «Хлороцид» + перекись + спирт + сулема (6 мин.); 4. «AOS» + «Domestos» + «Хлороцид» + перекись + спирт + сулема (3 мин.); 5. «AOS» + «Domestos» + «Хлороцид» + перекись + спирт + сулема (6 мин.). Для каждого варианта опыта использовали по 30 шт. эксплантов без учета генотипа. Субкультивировали материал для пролиферации в индивидуальные культуральные сосуды объемом 10 мл в соответствии с общепринятыми методиками (Р. Г. Бутенко, 1964) на стандартную питательную среду MS (Murashige & Skoog, 1962), содержащую 30 г·л⁻¹ сахарозы и 8 г·л⁻¹ микробиологического агара, дополненную регуляторами роста цитокининовой (6-BAР, 1,0 мг·л⁻¹), ауксиновой (NAA, 0,1 мг·л⁻¹) и гиббереллиновой (GA3, 0,5 мг·л⁻¹) природы. Контроль контаминации провели через 3 недели.

В связи с высокой зараженностью древесные растения являются одним из наиболее трудных объектов для культивирования *in vitro*. Контаминированными оказались от 86,7 % (стерилизация по схеме № 1 без применения хлорсодержащих препаратов) до 53,3 % (схема № 4 с совместным использованием «Хлороцид» и «Domestos»). Для 27,3–52,6 % эксплантов была отмечена смешанная инфекция плесневыми грибами и бактериями. Увеличение времени экспозиции в растворе сулемы с 3 до 6 мин. на выход стерильного материала существенно не влияло, однако снижало жизнеспособность тканей, повышался процент некротизирующих эксплантов: 23,3 %, 36,7 % (схемы № 2 и № 3 соответственно), 43,3 %, 53,3 % (схемы № 4 и № 5). Тем не менее, максимальный выход пригодного для культивирования материала (30,0 %) отмечен в случае применения схемы стерилизации № 4.

Таким образом, были апробированы различные стерилизующие агенты для поверхностной обработки эксплантов липы мелколистной и подобраны условия стерилизации с целью получения первичных асептических культур.

Study of the effectiveness of sterilization of *Tilia parvifolia* Ehrh. ex Hoffm. plant material for the aseptic cultures initiation

Konstantinov A. V., Kagan D. I., Petrov G. V.

Institute of Forest of the National Academy of Sciences of Belarus, 71 Proletarskaya st., 246001, Gomel, Republic of Belarus, fax: +375(232)75-73-73, tel.: +375(232)75-69-02, e-mail: avkonstantinof@mail.ru

.....

Microorganisms associated with plant tissue cultures have a negative effect on the growth processes of cultures *in vitro*, damaging tissues directly or by changing the chemical parameters of the medium through the release of metabolites. As a result, the regenerative capacity of cell suspensions and callus is reduced, the morphogenesis of microplants is inhibited, which makes clonal micropropagation difficult or causes death of explants. At the initial stages of *in vitro* cultivation, it is important to correctly select the concentrations of sterilizing agents, exposure time in their solutions and the mode of washing the primary explants. This allows eliminating epiphytic microorganisms, obtaining a high yield of sterile material, minimizing the possible damaging effect.

As a starting material for the initiation of cultures *in vitro*, green shoots of linden obtained in September from vegetating annual saplings grown under the conditions of a greenhouse nursery were selected. Sterilization was carried out in two stages. First, the shoots were washed with a solution of detergents and antiseptics: "AOS", "Chlorocide", "Domestos", hydrogen peroxide (concentrations of 5%, 0.4%, 1%, 10%, respectively), rinsed for 30 minutes with running water. Then in the laminar box, the material was treated with 70% ethanol (1 minute), 0.1% by weight of mercuric chloride (HgCl₂, 3 or 6 minutes) and rinsed three times with sterile distilled water. Depending on the variant of the experiment, the following treatment schemes were tested: 1. "AOS" + peroxide + ethanol + HgCl₂ (3 min); 2. "AOS" + "Chlorocide" + peroxide + alcohol + HgCl₂ (3 minutes); 3. "AOS" + "Chlorocide" + peroxide + alcohol + HgCl₂ (6 minutes); 4. "AOS" + "Domestos" + "Chlorocide" + peroxide + alcohol + HgCl₂ (3 minutes); 5. "AOS" + "Domestos" + "Chlorocide" + peroxide + alcohol + HgCl₂ (6 minutes). It was used for 30 pcs. explants for each variant of the experiment, the plant genotype was not taken into account. The material for proliferation was subcultured in 10 ml individual culture vessels according to standard procedures (R. G. Butenko, 1964) on a standard nutrient medium MS (Murashige & Skoog, 1962) containing 30 g·l⁻¹ sucrose, 8 g·l⁻¹ microbiological agar supplemented with growth regulators of cytokinin (6-BAP, 1.0 mg·l⁻¹), auxin (NAA, 0.1 mg·l⁻¹) and gibberellin (GA3, 0.5 mg·l⁻¹). The contamination was monitored after 3 weeks.

Due to the high contamination by microorganisms, woody plants are one of the most difficult objects for *in vitro* cultivation. Contaminated were from 86.7% (sterilization scheme No. 1 without using chlorine-containing drugs) to 53.3% (scheme number 4 with the joint use of "Chlorocide" and "Domestos"). A mixed infection with mold fungi and bacteria was noted for 27.3–52.6% of explants. An increase in the time of exposure in a solution of mercuric chloride from 3 to 6 minutes did not significantly affect the yield of the sterile material, however, the tissue viability was reduced, the percentage of necrotic explants was increased: 23.3%, 36.7% (schemes No. 2 and No. 3, respectively), 43.3%, 53.3% (schemes Nos. 4 and 5). Nevertheless, the maximum yield of a material suitable for cultivation (30.0%) was noted in the case of application of the sterilization scheme No. 4.

As a result of the experiments, various sterilizing agents were tested for the surface treatment of linden explants and the sterilization conditions were selected for the purpose of obtaining aseptic cultures.

Гидропонный способ адаптации пробирочных микрорастений земляники садовой

Корнацкий С. А.

Российский университет дружбы народов, ул. Миклухо-Маклая, 6, Москва, 117198, Россия, тел.: +7(916)201-51-60, e-mail: vitrolab@rambler.ru

Земляника садовая одна из культур, биотехнологические приемы размножения которой освоены наиболее успешно. В зарубежной и в отечественной практике накоплен значительный положительный технологический опыт на всех этапах клонального микроразмножения. Как правило, этап введения в культуру успешно решен во всех случаях. Собственно микроразмножение в большинстве своем, также не представляет проблем. Однако, в ходе длительного субкультивирования, по сообщениям ряда исследователей, отдельные сорта проявляют специфические требования к уровням факторов окружающей среды, минеральному и гормональному составу питательных сред. При микроразмножении земляники весьма полезным является этап элонгации. В течение 3–4 недель из конгломератов удается получить микророзетки высотой 3–5 см, которые более удобны для работ по последующему их укоренению. Вопрос использования ауксинов на стадии ризогенеза у земляники остается дискуссионным, поскольку имеет место спонтанное и достаточно эффективное корнеобразование у микрорастений на этапе пролиферации в присутствии низких концентраций цитокининов. Это свидетельствует о неочевидности применения на этой стадии ауксинов, хотя укоренение в их присутствии начинается и протекает быстрее. Однако, качественные показатели корней, индуцированных экзогенным ауксином, абсолютно уступают, сформированным спонтанно или на безгормональной среде, тем более что жизнеспособность последних сохраняется до 2–3 мес. без разрушения первичной структуры, что неизбежно происходит на среде с ауксинами.

Состояние корневой системы, безусловно, определяет возможности успешной последующей адаптации микрорастений к нестерильным условиям. Известные традиционные схемы адаптации являются весьма трудоемкими, поскольку предполагают предварительную стерилизацию почвенного субстрата, на который проводится высадка микрорастений. Также при этом принимаются превентивные меры против распространения почвенных патогенов и обеспечивается близкая к 100 % влажность воздуха в зоне надземной части растений. Проблемы усугубляются, если требуется массовое производство растений.

В ходе исследований нами был разработан и испытан безсубстратный способ адаптации микрорастений земляники, основанный на природной способности культуры к быстрому формированию придаточных корней во влажной среде. Для адаптации микрорастений использовали пластиковые поддоны размером 0,5×0,3 м и высотой 3,5 см, на поверхности которых предварительно фиксировали равнозначный по площади поддона кусок лутрасила № 17 или 30, который заранее перфорировали посадочными отверстиями. Микрорастения извлекали из пробирок и подготавливали к посадке путем отмывки корневой системы от агаризованной питательной среды. Посадку проводили непосредственно в теплице. Корни микрорастений через посадочные отверстия погружали в антисептический раствор перманганата калия (0,01 %) для предотвращения размножения бактерий таким образом, чтобы микророзетки оставались над поверхностью лутрасила. Для сохранения жизнеспособности увлажнение поверхности листьев поддерживали за счет периодического мелкодисперсного верхнего полива, а вода, поступающая в поддон, обеспечивала циркуляцию во внутреннем объеме и исключала развитие патогенов.

При приживаемости микрорастений на уровне 95–96 %, в обоих вариантах в течение 1 месяца после высадки трудоемкость выполнения работ в разработанном способе оказалась более чем в 2 раза ниже, так как полностью отсутствовала потребность в субстрате, и, соответственно, затратах электроэнергии на его автоклавирование.

Hydroponic method of adaptation test-tube microplants of strawberry

Kornatskiy S. A.

Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), 6 Miklukho-Maklaya st., 117198, Moscow, Russian Federation, tel.: +7(916)201-51-60, e-mail: vitrolab@rambler.ru

.....

Strawberry is one of the crops, the biotechnological methods of reproduction which are mastered most successfully. In foreign and in domestic practice accumulated significant positive technological experience at all stages of clonal micropropagation. As a rule, the stage of introduction into culture was successfully solved in all cases. Actually micropropagation in the majority, also does not represent problems. However, in the course of prolonged subculture, according to a number of researchers, certain varieties exhibit specific requirements to the levels of environmental factors, to the mineral and hormonal composition of nutrient media.

A stage of elongation is very useful for micropropagation of strawberries. From conglomerates it is possible to obtain microplantlets 3–5 cm high within 3–4 weeks, which are more convenient for work on their subsequent rooting. The use of auxins in the stage of rhizogenesis in strawberries remains controversial, as there is a spontaneous and sufficiently effective root formation in microplants at the stage of proliferation in the presence of low concentrations of cytokinins. This indicates that the auxins are not obvious at this stage, although rooting in their presence begins and proceeds more quickly. However, the qualitative indices of the roots induced by exogenous auxin are completely inferior, formed spontaneously or on the hormone-free medium, especially since the viability of the latter persists to 2–3 months, without destroying the primary structure, which inevitably occurs in a medium with auxins.

The state of the root system, of course, determines the possibility of successful subsequent adaptation of micro-plants to non-sterile conditions. The well-known traditional adaptation schemes are very laborious, as they presuppose a preliminary sterilization of the soil substrate on which microplants are planted. Also, preventive measures are taken against the spread of soil pathogens and close to 100 % air humidity in the zone of the aboveground part of plants. Problems are exacerbated if mass production of plants is required.

In the course of the research, we developed and tested a non-substrate method for the adaptation of strawberry microplants, based on the natural ability of the crop to rapidly form accessory roots in a humid environment. For the adaptation of micro-plants, plastic pallets measuring 0.5 x 0.3 m and 3.5 cm high were used, on the surface of which a piece of lutrasil No. 17 or 30, equivalent to the tray area, was previously fixed on the surface, which was pre-punched with planting holes. The microplants were removed from the test-tubes and prepared for planting by washing the root system from the agar medium. Planting was carried out directly in the greenhouse. The roots of microplants through the planting holes were immersed in an antiseptic solution of potassium permanganate with a concentration of 0.01 % to prevent bacterial growth in such a way that the microplantlets remained above the surface of lutrasil. To maintain viability, moistening of the leaf surface was maintained by periodic fine-dispersed top irrigation, and the water entering the tray provided circulation in the internal volume and eliminated of the development of pathogens.

With the survival rate of microplants at the level of 95–96 %, in both cases within 1 month after planting, the laboriousness of performing the work in the developed method turned out to be more than 2 times lower, since there was no need for a substrate, and therefore, the cost of electricity for its autoclaving.

Проблемы адаптации представителей рода *Phalaenopsis Blume* при их переносе из изолированных условий *in vitro* в *in vivo*

Корнеева Г. И.

Институт рыбного хозяйства, Научно-практический центр НАН Беларуси по животноводству, ул. Стебенева, 22, Минск, 220024, Беларусь, тел.: +375(29)331-43-26, тел./факс: +375(17)365-96-02, e-mail: domryb@tut.by

Наряду с подбором необходимых культуральных сред и эксплантов для выращивания представителей рода *Phalaenopsis Blume in vitro*, для их дальнейшего эффективного культивирования важное значение имеет создание оптимальных условий среды после их переноса в условия *in vivo*. Культивирование *in vitro* характеризуется максимальной стерильностью среды и исходного растительного материала. На этапе переноса в нестерильные условия потери растений составляют более 50 %.

Перенос орхидей из изолированных условий *in vitro* в *in vivo* сопровождается для них стрессом. При культивировании орхидей в *in vitro* их развитие происходит за счет элементов питательной среды посредством гетеротрофного питания. Перенос *Phalaenopsis* в условия *in vivo* сопровождается повышенной нагрузкой на листья и корни, как фотосинтезирующие органы. Растениям необходимо перейти к автотрофному питанию. Способность к фотосинтезу в условиях *in vitro* не реализуется из-за наличия углеводов в питательном субстрате и низкой концентрации углерода. В данный период адаптации *Phalaenopsis* трудности перехода к фотосинтезу связаны с низкой активностью ферментов, фиксирующих углерод. Некоторые растения рекомендуют последние две недели перед переносом в нестерильные условия *in vivo* выдерживать при повышенном освещении (10 000–15 000 лк) и выращивать в открытых сосудах. Новые листья, которые развиваются в таких условиях, частично способны к активному фотосинтезу. Особенностью *Phalaenopsis* является наличие у него воздушных корней, способных не только к поглощению воды, но и к фотосинтезу. Это повышает способность адаптации орхидеи к нестерильным условиям, что важно для *Phalaenopsis* как медленно растущего растения.

Перенесенные в нестерильные условия орхидеи уже имеют первичные листья и корни, но анатомическое строение их тканей отличается от взрослых растений. Они подвержены воздействию окружающей среды в значительно большей степени, чем взрослые растения. Высокая степень транспирации способствует обезвоживанию наружных тканей и повреждению мембран. Взрослые растения *Phalaenopsis* характеризуются высокой водоудерживающей способностью. Они обладают рядом анатомических структур, способствующих удержанию воды. Молодые растения, в отличие от них, имеют тонкий слой кутикулы и устьица еще не способны достаточно функционировать. Это связано с тем, что у молодого листа дифференциация замыкающих и околоустьичных клеток, так же как и всех остальных, выражена слабо. У взрослых растений замыкающие и околоустьичные клетки расположены на одном уровне с клетками эпидермиса и окружены с обеих сторон слоем кутикулы, которая является для них защитой. У первичного листа из-за тонкого слабо развитого слоя кутикулы устьица расположены практически на поверхности листа, что повышает степень их уязвимости. Положительным является то, что для фаленопсиса характерно малое количество устьиц. На 1 мм² поверхности абаксиальной стороны листа количество устьиц варьирует от 15 до 20 у разных образцов. Это близко к минимальным величинам, характерным для растений с низкой интенсивностью транспирации в листьях.

Для снижения транспирации при переносе орхидей в нестерильные условия в тепличных сооружениях применяют ряд приспособлений для увлажнения воздуха, поддержания необходимой температуры и освещения. Следует отметить, что именно для культуры *Phalaenopsis* как эпифитной орхидеи одним из важнейших факторов микроклимата является обеспечение достаточного воздухообмена. Недостаток движения воздуха или его застой чаще всего приводит к возникновению и распространению грибных и других инфекций и гибели всей группы перенесенных для адаптации в нестерильную среду орхидей.

Problems of adaptation of representatives of the genus *Phalaenopsis Blume* when transferred from isolated *in vitro* conditions *in vivo*

Karneyeva H. I.

*Institute of Fisheries, Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Livestock, 22 Stebeneva st., 220024, Minsk, Republic of Belarus,
tel.: +375(29)331-43-26, tel./fax: +375(17)365-96-02, e-mail: domryb@tut.by*

Along with the selection of the necessary culture media and explants for the growth of *Phalaenopsis Blume in vitro* representatives, it is very important to create optimal environmental conditions after their transfer to *in vivo* conditions for their further effective cultivation. Cultivation *in vitro* is characterized by maximum sterility of the medium and the original plant material. At the stage of transfer to non-sterile conditions, plant losses amount to more than 50 %.

The transfer of orchids from isolated *in vitro* conditions to *in vivo* is accompanied by stress for them. When cultivating orchids *in vitro*, their development occurs due to elements of the nutrient medium by means of heterotrophic nutrition. The transfer of *Phalaenopsis* to *in vivo* conditions is accompanied by an increased load on the leaves and roots, like photosynthetic organs. Plants need to switch to autotrophic nutrition. The ability to photosynthesize under *in vitro* conditions is not realized due to the presence of carbohydrates in the nutrient substrate and a low concentration of carbon. In this period of adaptation of *Phalaenopsis*, the difficulties of transition to photosynthesis are associated with low activity of enzymes fixing carbon. Sometimes it is recommended to expose plants to intensive light (10,000–15,000 lux) and move them to the open pots two weeks before transferring them to non-sterile conditions *in vivo*. New leaves that develop under such conditions are partially capable of active photosynthesis. The peculiarity of *Phalaenopsis* is the presence of air roots, which are capable not only of water absorption, but also of photosynthesis. This increases the ability to adapt the orchid to non-sterile conditions, which is important for *Phalaenopsis* as a slow-growing plant.

The orchids transferred to non-sterile conditions already have primary leaves and roots, but the anatomical structure of their tissues differs from adult plants. They are exposed to the environment much more than adult plants. A high degree of transpiration promotes dehydration of external tissues and damage to membranes. Adult *Phalaenopsis* plants are characterized by high water retention ability. They have a number of anatomical structures that promote water retention. Young plants, unlike them, have a thin layer of cuticles and the stomata are not yet able to function as efficiently. This is due to the fact that the young leaf differentiation of the closing and perostochial cells, as well as all the others, is poorly expressed. In adult plants, the closing and parasitic cells are located on the same level as the cells of the epidermis and are surrounded on both sides by a cuticle layer, which is a protection for them. At the primary leaf, due to a thin, weakly developed layer of the cuticle, the stomata are located practically on the surface of the leaf, which increases the degree of their vulnerability. The positive is that *phalaenopsis* is characterized by a small number of stomata. At 1 mm² of the surface of the abaxial side of the leaf, the number of stomata varies from 15 to 20 in different specimens. This is close to the minimum values typical for plants with a low transpiration intensity in leaves.

To reduce transpiration during the transfer of orchids to non-sterile conditions in greenhouse facilities, a number of devices are used to humidify the air, maintain the necessary temperature and illumination. It should be noted that one of the most important factors for the favorable microclimate for the *Phalaenopsis* culture, as an epiphytic orchid, is the provision of sufficient air exchange. The lack of air movement or its stagnation often leads to the emergence and spread of fungal and other infections and the death of the entire group of orchids transferred to the non-sterile environment.

Изучение морфогенеза в культуре клеток и тканей *in vitro* генетически маркированных линий *Helianthus annuus* L.

Костина Е. Е., Ткаченко О. В., Лобачев Ю. В.

Саратовский государственный аграрный университет им. Н. И. Вавилова,
Театральная пл., 1, Саратов, 410012, Россия, факс: +7(845)223-47-81,
тел.: +7(845)226-16-28, e-mail: kostinaee@yandex.ru

Для ускорения и повышения эффективности селекционного процесса в настоящее время активно используют методы культуры клеток и тканей растений *in vitro*. У многих сельскохозяйственных растений эти методы применяют для создания новых сортов и гибридов с улучшенными признаками. Применение биотехнологических методов для улучшения характеристик подсолнечника ограничивается слабой регенерационной способностью большинства генотипов в культуре клеток и тканей *in vitro*. Эффективность каллусогенеза и частота регенерации *in vitro* у подсолнечника зависит от типа использованного экспланта, генотипа растения-донора и состава питательной среды.

В культуре соматических клеток и тканей *in vitro* изучен морфогенетический потенциал короткостебельных линий подсолнечника и линий с нестандартной окраской язычковых цветков в зависимости от наличия агар-агара в питательной среде. Консистенция питательной среды и эффект генотипа оказали достоверное влияние на каллусогенез и регенерацию в культуре соматических тканей *in vitro* подсолнечника. Отмечено несколько путей морфогенеза: каллусогенез, прямой органогенез и соматический эмбриогенез из клеток каллуса. На жидкой питательной среде происходило активное деление клеток без дифференциации и формирование массы неокрашенных активно пролиферирующих каллусных клеток. На агаризованной среде наблюдалась преимущественно прямая регенерация побегов из клеток эксплантов, при этом образовывался плотный меньшего объема каллус. Достоверное повышение эффективности каллусогенеза и регенерации в культуре тканей *in vitro* установлено у короткостебельных линий КЛ-1, КЛ-3, КЛ-5, КЛ-6, КЛ-7 и КЛ-10. Введение в генофонд линии ЮВ-28В рецессивных аллелей l, la, o, pa повышало эффективность каллусогенеза. Существенный положительный эффект на регенерацию почек и побегов отмечен для трех изученных рецессивных аллелей генов l, la, pa.

Изучены этапы морфогенеза в культуре пыльников *in vitro* генетически маркированных линий подсолнечника. Установлено, что в процессе андрогенеза могут быть реализованы два пути морфогенеза: формирование эмбриодов и органогенез почек, листьев и корней. Определено влияние углеводов в составе индукционной питательной среды и фитогормонов в среде для регенерации. Использование сахарозы по сравнению с мальтозой в среде для культивирования пыльников повышает эффективность каллусогенеза. Отмечено повышение способности к морфогенезу тканей подсолнечника на питательной среде Мурасиге-Скуга с добавлением 1 мг/л кинетина, 0,1 мг/л ИУК и 10 мг/л AgNO₃. Скрининг десяти линий с генами короткостебельности на двух вариантах питательных сред показал, что эффект генотипа достоверно превышает влияние концентрации сахарозы в питательной среде культивирования на показатели андрогенеза в культуре пыльников *in vitro* подсолнечника. Наибольшее количество корней и листовидных структур формировалось на каллусах линии с геном l.

Проведенные исследования позволяют расширить знания о регуляции процессов морфогенеза клеток и тканей *in vitro* подсолнечника.

Study of morphogenesis in culture of cells and tissues *in vitro* of genetically marked *Helianthus annuus* L. lines

Kostina E. E., Tkachenko O. V., Lobachev Yu. V.

Vavilov Saratov State Agrarian University, 1 Theatre square, 410012, Saratov, Russian Federation,
fax: +7(845)223-47-81, tel.: +7(845)226-16-28, e-mail: kostinaee@yandex.ru

Nowadays the plant cells and tissues culture techniques *in vitro* are actively used in order to accelerate and improve the efficiency of the breeding process. In many crop plants, these methods are used to create new varieties and hybrids with improved features. The use of biotechnological methods improving the characteristics of sunflower is limited by weak regenerative capacity of most genotypes in tissues culture *in vitro*. The efficiency of callus formation and frequency of regeneration *in vitro* in sunflower depends on the type of explant, plant genotype of the donor and the composition of culture medium.

Studied in the culture of somatic cells and tissues *in vitro* the morphogenetic potential of sunflower dwarf lines and lines with non-standard color ray flowers depending on the presence of agar-agar in the culture medium. The consistency of a culture medium and the effect of genotype had a significant effect on callusogenesis and regeneration in the somatic tissues culture *in vitro* of sunflower. There were several ways of morphogenesis: callus formation direct organogenesis and somatic embryogenesis of callus cells. On the liquid medium an active cell division without differentiation and the formation of mass unpainted actively proliferating callus cells was marked. On agar medium it was observed primarily direct regeneration of sprouts from explants of cells. Significant increase in the effectiveness of callusogenesis and regeneration in the tissues culture *in vitro* was set in dwarf lines КЛ-1, КЛ-3, КЛ-5, КЛ-6, КЛ-7 и КЛ-10. Introduction to the gene line ЮВ-28Б recessive alleles l, la, o, pa improved the efficiency of callus formation. The three studied recessive alleles of genes l, la, and pa significantly and positively effects on the regeneration of buds and sprouts.

Studied the morphogenesis in anther culture *in vitro* genetically marked lines of sunflower. It is established that the process of androgenesis *in vitro* can be realized in two morphogenesis pathways: formation of embryoids or organogenesis of shoots, leafs and roots. The influence of carbohydrates in induction medium and growth hormones in the regeneration medium. The use of sucrose as compared with maltose in the culture medium for anther increases the efficiency of callusogenesis. Increased ability to morphogenesis of tissues of sunflower seeds on a nutrient medium of Murashige and Skoog medium with the addition of 1 mg/l of kinetin, 0.1 mg/l IAA and 10 mg/l AgNO₃. Screening of ten lines with short-stalked genes dw it has been revealed that the effect of genotype was showed greater than the influence of sucrose concentration in a nutrient culture medium on androgenes parameters in anther culture *in vitro* of sunflower. The greatest number of roots and leaf type forms were formed on the callus lines with gene l.

The conducted research allows to expand our knowledge about the regulation of the processes of morphogenesis of cells and tissues *in vitro* of sunflower.

Использование клиноптилолита и БИОНА-111, как компонентов субстратов для адаптации растений винограда к условиям *ex vitro*

Красинская Т. А.^{1,2}, Остапчук И. Н.¹, Косандрович С. Ю.³, Солдатов В. С.³

¹ Институт плодородия, ул. Ковалева, 2, аг. Самохваловичи, Минский район, 223013, Беларусь, тел.: +375(17)506-61-40

² Международный государственный экологический институт им. А. Д. Сахарова БГУ, ул. Долгобродская, 23, Минск, 220070, Беларусь, тел.: +375(29)680-25-38

³ Институт физико-органической химии НАН Беларуси, ул. Сурганова, 13, Минск, 220072, Беларусь, тел.: +375(17)284-16-32, e-mail: krasinskaya@tut.by

Для снижения степени влияния абиотических и биотических факторов, для ускорения и улучшения адаптационных процессов на этапе адаптации к условиям *ex vitro* используют различные субстраты для адаптации, которые не только улучшат морфофизиологические параметры адаптированных растений, но и будут экономически перспективными при производстве оздоровленного посадочного материала.

Цель исследования — изучить влияние клиноптилолита и ионообменного субстрата БИОНА-111, как составляющих компонентов субстрата для адаптации, на морфофизиологические показатели растений-регенерантов сорта винограда 'Mars' на этапе адаптации к условиям *ex vitro*.

Объекты исследований — субстраты для адаптации: субстрат 1 — клиноптилолит : 25 % БИОНА-111; субстрат 2 — агроперлит; субстрат 3 — торфяной субстрат «Двина» : агроперлит — смешанный субстрат в объемных частях 3:1; субстрат 4 — БИОНА 111; субстрат 5 — агроперлит : 7,4 % БИОНА 111; субстрат 6 — торфяной субстрат «Двина» : агроперлит 3:1 : 3 % БИОНА-111; субстрат 7 — торфяной субстрат «Двина» : агроперлит 3:1 : 2,5 % субстрат 1. Длительность этапа адаптации — 12 недель.

Статистический анализ полученных данных позволил отметить, что изучаемые субстраты для адаптации высоко достоверно ($p < 0,001$) оказывали влияние на морфологические и биохимические показатели.

Максимальный показатель доли адаптированных растений отмечался на чистом перлите (100 %) и на субстрате 7, в составе которого 2,5 % смеси клиноптилолита с субстратом БИОНА (93,9 %). Минимальный показатель доли адаптированных растений отмечался на субстрате 1 и субстрате 6 (66,7 и 65,0 % соответственно).

Активный рост растений отмечался на торфяном субстрате с добавлением субстрата 1 (субстрат 7), длина стебля достигала 52,9 см, среднее количество междоузлий 19,7 шт., в то время как на самом субстрате 1 длина стебля составила 11,5 см, среднее количество междоузлий 13,5 шт. Развитие корневой системы так же определялось субстратом, на котором проводили адаптацию. Влияние субстратов отмечалось на накопление фотосинтетических пигментов (хлорофиллов а и в, каротиноидов) в растениях винограда, а так же на содержание сахаров и фенольных соединений.

Таким образом, использование клиноптилолита и БИОНА-111 в качестве компонентов адаптационного субстрата (торфяного субстрата и перлита) приводило к активации морфогенеза растений винограда сорта 'Mars' к условиям *ex vitro*.

The using of clinoptilolite and BIONA-111 as components in adaptation substrates for *ex vitro* adaptation of grape plants

Krasinskaya T. A.^{-1,2}, Ostapchuk I. N.¹, Kosandrovich S. U.³, Soldatov V. S.³

¹ Institute for Fruit Growing, 2 Kovalev st., 223013, Samokhvalovichy, Minsk region, Republic of Belarus, tel.: +375(17)506-61-40

² International Sakharov Environmental Institute of BSU, 23 Dolgobrodskaya st., 220070, Minsk, Republic of Belarus, tel.: +375(29)680-25-38

³ Institute of Physical Organic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, 13 Surganova st., 220072, Minsk, Republic of Belarus, tel.: +375(17)284-16-32, e-mail: krasinskaya@tut.by

.....

To reduce the influence of abiotic and biotic factors and to improve and accelerate adaptation processes during the stage of adaptation to *ex vitro* conditions, various substrates for adaptation are used, which not only will improve the morphophysiological parameters of adapted plants, but also will be economically perspective in production of virus-free planting material.

The aim of research was to study the influence of clinoptilolite and ion-exchange substrate BIONA-111 (as components of adaptation substrate) on morphophysiological parameters of grape microplants cv. 'Mars' at the adaptation stage to *ex vitro* conditions.

The objects of research — adaptation substrates: substrate stage 1 — clinoptilolite : 25 % BIONA-111; substrate 2 — agroperlite; substrate 3 — peat substrate 'Dvina' : agroperlite 3:1; substrate 4 — ion-exchange substrate BIONA-111; substrate 5 — agroperlite : 7.4 % BIONA-111; substrate 6 — peat substrate 'Dvina' : agroperlite 3:1 : 3 % BIONA-111; substrate 7 — peat substrate 'Dvina' : agroperlite 3:1 : 2.5 % substrate 1.

The duration of the adaptation phase was 12 weeks.

Statistical analysis of obtained data made it possible to note that studied adaptation substrates with high reliability ($p < 0.001$) had effect on morphological and biochemical parameters.

The maximal number of adapted plants was observed on pure agroperlite (100 %) and on substrate 7, which contain 2.5 % of mixture of clinoptilolite with BIONA-111 substrate (93.9 % of adapted plants). The minimal number of adapted plants was observed on substrate 1 and substrate 6 (66.7 and 65.0 %, respectively).

The active growth of plants was observed on substrate 7 (peat substrate 'Dvina' : agroperlite 3:1 : 2.5 % substrate 1), the stem length reached 52.9 cm, the average number of internodes was 19.7. While on substrate 1 the length of the stem was 11.5 cm, the average number of internodes — 13.5. The development of root system was also determined by substrate on which adaptation was carried out.

The substrates influenced on accumulation of photosynthetic pigments (chlorophylls a and b, carotenoids) in grape plants, as well as on the content of sugars and phenolic compounds.

Thus, the use of clinoptilolite and ion-exchange substrate BIONA-111 as components of adaptation substrate (the main components — peat substrate and/or agroperlite) leads to activation of grape plant morphogenesis at the *ex vitro* adaptation stage.

Влияние абиотических факторов на микрклональное размножение *Galanthus lagodechianus* Kem.-Nath. (Amaryllidaceae) и *Viscaria alpina* (L.) G. Donf. (Caryophyllaceae)

Криницына А. А., Чурикова О. А.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, биологический факультет,
Ленинские горы, д. 1, стр. 12, Москва, 119234, Россия, тел.: +7(495)939-40-83,
e-mail: ochurikova@yandex.ru

Абиотические факторы окружающей среды имеют большое значение в жизни растений, существенным образом влияют на распространение видов и определяют их ареал. Наиболее важно для растений влияние температуры, влажности и света. Для каждого вида растений в зависимости от его особенностей и, главным образом, от географического происхождения, необходимы определенные температурные границы, в которых возможно протекание ростовых процессов. Для роста и развития ряда растений характерна реакция на периодическую смену повышенной и пониженной температуры в течение суток (термопериодизм), сохраняющаяся, по-видимому, и в культуре *in vitro*.

Viscaria alpina и *Galanthus lagodechianus* — виды, занесенные в региональные Красные книги. Разработка технологии микрклонального размножения посредством прямого морфогенеза важна для оценки возможностей последующего сохранения их в коллекции *in vitro*, а также восстановления популяций в природных местообитаниях путем реинтродукции полученных растений-регенерантов.

В природе *Viscaria alpina* встречается на территории тундры и лесотундры Скандинавии, восточной части Гренландии и Северной Америки, а также в горнотундровом и альпийском поясе Европы. *Galanthus lagodechianus* (эндемик Кавказа) имеет ограниченный ареал, который частично находится на территории России: на северном Кавказе, а также на территории Грузии и Азербайджана. Материалом для введения в стерильную культуру послужили зеленые черенки растений смолки альпийской, собранные в Хибинах, горно-тундровом поясе, на хребте Куки-свумчорр и луковицы подснежника лагодехского из коллекции дендрария Ботанического сада МГУ имени М. В. Ломоносова.

Узлы побегов смолки культивировали на питательной среде MS с добавлением 1,5 мг/л 2-иР, а фрагменты луковичных чешуй подснежника — на среде Selby с добавлением 0,5–1,0 мг/л ВАР и 0,1 мг/л NAA. Часть эксплантов инкубировали на холодном белом свете при стандартном фотопериоде 16 часов день/8 часов ночь, освещении 3500 люкс при температуре 21–23 °С. Вторую часть помещали в климакамеру с выраженным перепадом дневной и ночной температур (18/8 °С) и нейтральным днем. На указанной среде у смолки при 21–23 °С происходило развитие многочисленных с укороченными междоузлиями побегов из пазушных почек нижних листьев эксплантов и формирование конгломератов побегов; базальная часть многих из них бурела и отмирала со временем. Спустя 4 месяца культивирования в климакамере отмечали большую высоту вполне жизнеспособных развивающихся побегов нормальной морфологии без признаков отмирания листьев. У подснежника при суточных перепадах температур в среднем развивалось в два раза больше лукович, чем при 21–23 °С. Для обоих видов — представителей разных таксономических групп, но сходных в своих местообитаниях (растут в горном поясе) — наиболее оптимальным было помещение полученных в ходе размножения растений в климакамеру с выраженным перепадом дневной и ночной температур, что положительно сказывалось на их состоянии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-50-00029 (направление «Растения»)).

The influence of abiotic factors on microclonal propagation of *Galanthus lagodechianus* Kem.-Nath. (Amaryllidaceae) and *Viscaria alpina* (L.) G. Donf. (Caryophyllaceae)

Krinitcina A. A., Churikova O. A.

M. V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 1-12 Leninskie Gory, 119234, Moscow, Russian Federation, tel.: +7(495)939-40-83, e-mail: ochurikova@yandex.ru

Abiotic factors of the environment are of great significance in plants life. They essentially influence over spreading of species and determine their natural habitat. The most important for plants is the influence of temperature, humidity and light. For every plant species depending on its features and, mainly on geographical origin, the definite temperature limits for leakage of growth processes are necessary. For growth and development of some plants the reaction on periodical alteration of high and lower temperature during the day (termoperiodism), which apparently remains in *in vitro* culture as well, is of characteristic.

Viscaria alpina and *Galanthus lagodechianus* — are the species put down on regional Red books. Working out of the technology of microclonal propagation via direct morphogenesis is important for the appreciation of their further conservation in *in vitro* collection and restoration of populations in nature habitats by means of reintroduction of regenerated plants as well.

In nature *Viscaria alpina* is found in tundra and forest tundra of Scandinavia, in east part of Greenland and North America and in alpine tundra zone of Europe. *Galanthus lagodechianus* (endemic of Caucasus) has limited natural habitat, which is situated partly in Russia: in north Caucasus, and in Georgia and Azerbaijan as well. For initiation of sterile culture green grafts of campion from Khibiny mountains, alpine tundra zone, Kukisvumchorr crest and bulbs of snowdrop from the collection of MSU Botanical garden arboretum were used.

Shoot nodes of campion were cultured on MS plant medium supplemented with 1.5 mg/l 2-iP, and fragments of snowdrop bulb scales — on Selby plant medium with 0.5–1.0 mg/l BAP and 0.1 mg/l NAA. One part of explants was incubated under cool white light with standard photoperiod 16 hours day /8 hours night, 3500 lux light and temperature 21–23 °C. The second part of explants was placed in climate chamber with marked day/night temperature difference and neutral day. On above-mentioned medium in 21–23 °C one mentioned the development of numerous campion shoots with short internodes from axillar buds of lower leaves of explants. The basal part of many shoots became brown and died out in course of time. After 4 months of cultivation in climate chamber more high viable shoots of normal morphology without some features of leaves dying out were mentioned. In snowdrop explants which were cultured in the conditions of daily temperature difference twice more bulbs developed compared with 21–23 °C. For both plant species from different taxonomical groups but similar in their natural habitats (mountain zone) placing of propagated plants in climate chamber with marked day/night temperature difference was the most optimal and influenced positively on their state.

The present contribution is supported by the Russian Science Foundation (RNF, grant 14-50-00029).

Морфогенез *Rhododendron luteum* Sweet, интродуцированных сортов *Vaccinium corymbosum* L., *Vaccinium vitis-idaea* L. в зависимости от состава питательных сред

Кутас Е. Н., Веевник А. А., Титок В. В.

Центральный ботанический сад НАН Беларуси, ул. Сурганова, 2 в, Минск, 220012, Беларусь,
факс: +375(17)284-14-84, тел.: +375(17)284-15-89, e-mail: E.Kutas@cbg.org.by

Вопросу морфогенеза в культуре клеток и тканей посвящена обширная литература. Ее анализ позволяет прийти к выводу, что морфогенез — сложный и многофакторный процесс, зависящий от типа и физиологического состояния экспланта, состава питательной среды, т. е. компонентов, содержащихся в ней (макро- и микроэлементов, витаминов, углеводов, гормональных добавок), а также от pH среды, условий культивирования и целого ряда других факторов.

Изучение морфогенеза интродуцированных сортов голубики высокой, брусники обыкновенной, рододендрона желтого на различных модификациях питательных сред позволит определить оптимальный состав питательной среды для протекания этого физиологического процесса в условиях *in vitro*.

Объектами исследования служили интродуцированные сорта голубики высокой 'Elizabeth', брусники обыкновенной 'Ammerland', 'Red Pearl', рододендрон желтый. Эксперименты были поставлены на трех типах питательных сред: MS, WPM, Андерсена, представленных 9 различными модификациями.

В качестве эксплантов использовали микрочеренки, интродуцированных сортов голубики высокой 'Elizabeth', брусники обыкновенной 'Ammerland', 'Red Pearl', рододендрона желтого (*Rhododendron luteum*), введенных в стерильную культуру, а также эпикотиль, гипокотиль, семядоли, корешок, листья ювенильных проростков рододендрона желтого, полученных нами ранее в асептических условиях на модифицированной питательной среде Андерсена. Стерильные экспланты высаживали на питательные среды: Мурасиге-Скуга, WPM и Андерсена в колбы одинакового объема по 15 мл среды в каждой. Высаженный материал культивировали при температуре 26 °С, влажности воздуха 56 %, фотопериоде 16 ч, освещенности 4000 лк. Повторность опытов трехкратная. Учитывалось количество побегов на эксплант (шт.), каллусообразование (мг) спустя 45 дней с момента высадки эксплантов на питательную среду. Статистическая обработка данных проведена исходя из 20 эксплантов на повторность.

По истечении четырех недель культивирования из одного микрочеренка образовалось в среднем от 1 до 13 микропобегов в зависимости от состава питательной среды. У эксплантов рододендрона желтого (эпикотили, гипокотили, семядолей, корешка, листьев) через 5–6 недель культивирования образовался органогенный каллус с последующей регенерацией из него вегетативных побегов. При этом следует отметить, что образование органогенного каллуса и дальнейшая регенерация побегов характерны для эксплантов (корешка, эпикотили, гипокотили, семядолей, листьев), полученных из свежесобранных семян.

Как показал анализ результатов экспериментальных исследований, полученных по изучению морфогенеза интродуцированных сортов голубики высокой, брусники обыкновенной, рододендрона желтого, на девяти модификациях питательных сред, различающихся по содержанию макро- и микроэлементов, гормональных добавок, лучшими для морфогенеза изученных растений оказались среды 8-й и 9-й модификаций, содержащие в своем составе макро- и микроэлементы по WPM и Андерсену, а также гормональные добавки: 4 мг/л индолилуксусной кислоты и 15 мг/л изопентениладенина. На средах 8-й и 9-й модификаций в сравнении с такими 1-й, 2-й, 3-й, 4-й, 5-й, 6-й и 7-й получено максимальное количество побегов на эксплант от 6 до 13 в зависимости от сорта и вида растения.

Morphogenesis of *Rhododendron luteum* Sweet, introduced varieties of *Vaccinium corymbosum* L., *Vaccinium vitis-idaea* L., depending on the composition of the nutrient media

Kutas E. N., Veyevnik A. A., Titok V. V.

Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, 2v Surganova st., 220012, Minsk, Republic of Belarus, fax: +375(17)284-14-84, tel: +375(17)284-15-89, e-mail: E.Kutas@cbg.org.by

An extensive literature is devoted to the question of morphogenesis in cultured cells and tissues. Its analysis allows us to conclude that the morphogenesis is a complex and multifactorial process, depending on the type and physiological state of explants, composition of nutrient medium, i. e., components, contained in it (macro- and microelements, vitamins, carbohydrates, hormonal supplements), and on the pH of the medium, conditions of cultivation and many other factors.

The study of the morphogenesis of introduced varieties of high bush blueberry, red bilberry ordinary, rhododendron yellow on various modifications of nutrient media will allow to determine the optimal composition of the nutrient medium for the development of this physiological process under conditions *in vitro*.

The objects of study were introduced varieties of high bush blueberry 'Elizabeth', red bilberry ordinary 'Ammerland', 'Red Pearl', rhododendron yellow. Experiments were carried out on three types of nutrient media: MS, WPM, Anderson, submitted by the 9 different modifications.

As explants were used micrografts of introduced varieties high bush blueberry 'Elizabeth', red bilberry ordinary 'Ammerland', 'Red Pearl', rhododendron yellow, entered into a sterile culture, and epicotyl, hypocotyl, cotyledons, root, leaves of juvenile seedlings of rhododendron yellow, obtained previously under aseptic conditions on a modified nutrient medium of Anderson. Sterile explants were planted on nutrient media: Murashige and Skoog, WPM and Anderson into flasks of equal volume of 15 ml medium in each. Planted material was cultured at 26°C, 56% of humidity, 16 hours photoperiod, illuminance 4,000 lux. Repetition of the experiments is three times. There were considered the number of shoots per explant (pcs.), callus formation (mg) after 45 days of planting of the explants on nutrient medium. Statistical analysis was carried out on the basis of 20 explants on repetition.

After four weeks of cultivation from one micrograft was formed in average from 1 to 13 microshoots depending on the composition of the nutrient medium. In explants of rhododendron yellow (epicotyl, hypocotyl, cotyledon, root, leaves) 5–6 weeks of cultivation was formed organogenic callus with followed regeneration of the vegetative shoots from him. It should be noted, that the formation of organogenic callus and subsequent regeneration of shoots are characteristic for explants (root, epicotyl, hypocotyl, cotyledons, leaves), derived from freshly collected seeds.

The analysis of the experimental results, obtained by the study of the morphogenesis of introduced varieties of highbush blueberry, red bilberry ordinary, rhododendron yellow, on nine modifications of nutrient media, differing in the content of macro- and microsalts, hormonal supplements showed that the best for morphogenesis of studied plants were medium of 8th and 9th modifications, which contain in the composition macro- and microelements for WPM and Anderson, and also hormonal supplements: 4 mg/l indoleacetic acid, and 15 mg/l isopenteniladenine. On media of 8th and 9th modifications in comparison to those 1st, 2nd, 3rd, 4th, 5th, 6th and 7th was obtained by the maximum number of shoots per explant from 6 to 13 depending on the plant species and varieties.

Влияние различных типов эксплантов на регенерационную способность интродуцированных видов рододендронов (*Rhododendron L.*) *in vitro*

Кутас Е. Н., Веевник А. А., Титок В. В.

Центральный ботанический сад НАН Беларуси, ул. Сурганова, 2 в, Минск, 220012, Беларусь, факс: +375(17)284-14-84, тел.: +375(17)284-15-89, e-mail: E.Kutas@cbg.org.by

Одним из факторов, оказывающих немаловажное значение на процесс клонального микро-размножения растений, является эксплант, его физиологическое состояние, которое тесным образом связано с возрастом материнского растения, органом, из которого вычленен эксплант, а также со временем года. Стадия развития экспланта имеет первостепенное значение в регенерационном процессе, протекающем в культуре клеток и тканей.

На наш взгляд, большой интерес представляет изучение регенерационной способности различных типов эксплантов у интродуцированных видов рододендронов. Исследование этого вопроса позволит определить тип экспланта, обладающего высокой регенерационной способностью, дающего максимальный выход растений-регенерантов и рекомендовать его в качестве основного для культуры *in vitro*.

Целью работы явилось изучение регенерационной способности различных типов эксплантов у интродуцированных видов рододендронов в условиях стерильной культуры.

В опыте эксплантами служили части растения из вегетативных и генеративных органов и различные по возрасту: ювенильные и зрелые.

Для вычленения ювенильных эксплантов использовали стерильные проростки 6 видов рододендронов: японского, Смирнова, кэтевбинского, короткоплодного, понтийского, разноцветного. Эпикотиль, гипокотиль, стебелек, корешок, семядоли, апексы проростков высаживали на агаризованную питательную среду Андерсена, содержащую 4 мг/л ИУК, 15 мг/л 2-иП, дополненную 80 мг/л аденина сульфата, 1 мг/л тиамин и культивировали при температуре 25 °С, освещенности 4000 лк, фотопериоде 16 ч. Расчет производили исходя из 10–15 эксплантов для каждого вида.

Анализ полученного материала дает основание считать, что для каждого типа экспланта характерен определенный регенерационный потенциал, зависящий от видовой принадлежности растения и степени его зрелости, т. е. физиологического состояния экспланта. У исследованных видов рододендронов максимальным регенерационным потенциалом обладает апекс проростка. Так, лидером по количеству регенерантов на эксплант (апекс проростка) следует считать рододендрон японский (12 шт.), затем понтийский (10 шт.), разноцветный (9 шт.), Смирнова (8 шт.), кэтевбинский (7 шт.), короткоплодный (6 шт.). Промежуточное положение по данному показателю занимают семядоли, апикальные и латеральные почки, вычлененные с неодревесневших побегов. У рододендрона японского получено 6 регенерантов на эксплант из семядолей, 9 — из апикальных и 6 — из латеральных почек, у Смирнова — 5, 5 и 3, у кэтевбинского — 4, 5 и 4, разноцветного — 4, 4 и 3, понтийского — 3, 4, и 3, короткоплодного — 1, 3 и 2 соответственно.

Совершенно другую картину наблюдали у корешка, стебелька, эпикотили, гипокотили. У этих эксплантов регенерационный потенциал равен нулю для подавляющего числа видов. Аналогичный результат получен для почек из одревесневших побегов и частей цветка.

Отсутствие способности к регенерации у данных эксплантов подтверждает общепризнанный факт, что разные части одного и того же растения обладают неодинаковой способностью к морфогенезу. Изучение регенерационной способности различных типов эксплантов у 6 интродуцированных видов рододендронов позволило нам определить тип экспланта, обладающего высокой регенерационной способностью, дающего максимальный выход растений-регенерантов на один эксплант и рекомендовать его в качестве основного для клонального микро-размножения исследованных видов рододендронов.

The effect of different types of explants on the regenerative capacity of introduced rhododendron species (*Rhododendron* L.) *in vitro*

Kutas E. N., Veyevnik A. A., Titok V. V.

Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, 2v Surganova st., 220012, Minsk, Republic of Belarus, fax: +375(17)284-14-84, tel.: +375(17)284-15-89, e-mail: E.Kutas@cbg.org.by

One of the factors that has a great influence on the process of plant micropropagation is an explant, his physiological state. The physiological state of explant closely is related with the age of the mother plant, the organ, from which explant was isolated, and also is related with the time of year. Stage of development of explant has priority importance in the regeneration process, occurring in the culture of cells and tissues.

In our opinion, of great interest is the study of the regenerative capacity of different types of explants from introduced species of rhododendrons. The study of this question will allow to determine the type of explants, having high regenerative capacity and giving the maximum output of regenerated plants and to recommend it as a primary for culture *in vitro*.

The aim of investigation was to study the regenerative capacity of different types of explants from introduced species of rhododendrons under conditions of sterile culture.

In the experiment explants were parts of the plant from vegetative and generative organs and various by age: juvenile and mature.

For the isolation of juvenile explants were used sterile seedlings of 6 species of rhododendrons: *Rhododendron brachycarpum* D. Don. (Syn. *Azalea brachycarpa* D. Don), *Rhododendron ponticum* L., *Rhododendron discolor* Franch., *Rhododendron catawbiense* Michaux, *Rhododendron japonicum* (A. Gray) Suring), *Rhododendron smirnowii* Trautv. Epicotyl, hypocotyl, stem, root, cotyledons, apexes of seven-day sterile seedlings and also sterile apical and lateral buds were planted on agar nutrient medium Anderson, containing 4 mg L⁻¹ IAA, 15 mg L⁻¹ of 2-ip supplemented with 80 mg L⁻¹ adenine sulfate, 1 mg L⁻¹ thiamine and cultivated at 25° C, illuminance 4000 lux, 16 hour photoperiod. The calculation was made on the basis of 10–15 explants for each species.

An analysis of the obtained material, gives grounds to assume that for each type of explant is characterized by a certain regeneration potential, depending on the species of plant and its degree of maturity, that is of physiological state of explant. At studied species of rhododendrons apex of seedling has maximum regenerative potential. Thus, the leader in the number of regenerants per explant (apex of seedling) should be considered as *Rhododendron japonicum* (12 pcs.), then the *R. ponticum* (10 pcs.), *R. discolor* (9 pcs.) *R. smirnowii* (8 pcs.), *R. catawbiense* (7 pcs.), *R. brachycarpum* (6 pcs.). An intermediate position on this indicator occupy the cotyledons, apical and lateral buds, isolated from not lignified shoots. At *R. japonicum* was received 6 regenerants per explant from cotyledons, 9 — from the apical buds and 6 — from lateral buds, at *R. smirnowii* — 5, 5 and 3, at *R. catawbiense* — 4, 5 and 4, *R. discolor* — 4, 4 and 3, *R. ponticum* — 3, 4 and 3 *R. brachycarpum* — 1, 3 and 2, respectively.

An entirely different picture was observed in root, stem, epicotyl, hypocotyl. Regeneration potential of these explants is zero for the vast number of species. A similar result was obtained for the buds from not lignified shoots and parts of the flower.

The lack of ability to regeneration of these explants confirms the generally recognized fact, that different parts of the same plant have unequal ability to morphogenesis. Study of the regenerative capacity of different types of explants in 6 introduced species rhododendrons allowed us to determine the type of explants, having high regenerative capacity, giving the maximum output of the plants regenerated per explant and recommend it as a primary for micropropagation studied species of rhododendrons.

Коллекции ягодных культур *in vitro* как исходный материал для маркерной и геномной селекции

**Лебедев В. Г.¹, Субботина Н. М.¹, Киркач В. В.¹, Видягина Е. О.¹,
Поздняков И. А.², Шестибратов К. А.³**

¹ Пушчинский государственный естественно-научный институт, пр-т Науки, 3, Пушкино, 142290, Московская область, Россия, тел.: +7(496)773-26-79

² ООО НПП «Микроклон», а/я 1671, Пушкино, 142290, Московская область, Россия, тел.: +7(495)587-14-11

³ Филиал Института биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, пр-т Науки, 6, Пушкино, 142290, Московская область, Россия, тел.: +7(496)773-17-19, факс: +7(496)733-05-27, e-mail: vglebedev@mail.ru

Классическая селекция, в которой отбор растений ведется по фенотипу, представляет собой весьма длительный и трудозатратный процесс. Достижения молекулярной биологии позволили внедрить в практику селекционеров такие методы, как маркерная и геномная селекция. С их помощью можно значительно ускорить создание новых сортов, так как отбор ведется по молекулярным маркерам, связанных с генами, кодирующими хозяйственно-ценные признаки. Важное значение при этом имеют генетические коллекции, выступающие в качестве доноров различных признаков.

Коллекции растений *in vitro* обладают рядом преимуществ, в частности, компактностью и возможностью использования в любое время года. Для выполнения работ по маркерной селекции ягодных культур на улучшение пищевых свойств и устойчивости к биотическим стрессам были созданы коллекции *in vitro* малины (около 40 сортов) и земляники садовой (около 30 сортов). С целью расширения генетического разнообразия и исследования полиморфизма последовательностей целевых генов растений, которые в дальнейшем могут выступать в качестве молекулярных маркеров селекционного процесса, в коллекцию были включены сорта различного происхождения, выведенные в России, Европе и США на протяжении последних ста лет. Для депонирования данных коллекций был разработан протокол длительного хранения, основанный на культивировании растений при низких положительных температурах.

Для создания технологии молекулярно-генетической идентификации сортов малины и земляники, представленных на российском рынке, были 13 микросателлитных локусов для малины и 15 — для земляники. Оценка встречаемости выбранных локусов была проведена для наиболее популярных 17 сортов малины, 2 сортов ежевики, 4 сортов малино-ежевичных гибридов и 14 сортов земляники. Было показано, что среди 13 микросателлитных локусов малины 12 представлены у всех исследуемых сортов малины, а локус FJ194450 в них отсутствует, но амплифицируется у всех исследуемых сортов ежевики и малино-ежевичных гибридов. Полученные результаты в дальнейшем будут использованы для разработки молекулярных маркеров, ассоциированных с хозяйственно-ценными признаками малины и земляники садовой.

Работы выполнены при финансовой поддержке Минобрнауки РФ (проект № 14.574.21.0149, уникальный идентификатор проекта RFMEFI57417X0149).

Collections of berry crops *in vitro* as initial material for marker and genomic selection

**Lebedev V. G.¹, Subbotina N. M.¹, Kirkach V. V.¹, Vidyagina E. O.¹,
Pozdnyakov I. A.², Schestibratov K. A.³**

¹ Pushchino State Institute of Natural Sciences, 3 Science ave., 142290, Pushchino, Moscow Region, Russian Federation, tel.: +7(496)773-26-79

² SPE "Microklon" Ltd, P. O. Box 1671, 142290, Pushchino, Moscow Region, Russian Federation, tel.: +7(495)587-14-11

³ Branch of Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry Russian Academy of Sciences, 6 Science ave., 142290, Pushchino, Moscow Region, Russian Federation, tel.: +7 (4967) 73-17-19, fax: +7(496)733-05-27, e-mail: vglebedev@mail.ru

.....

Classical breeding based on phenotype selection is a very long and labor-intensive process. The achievements of molecular biology allow the use of marker and genomic selection methods. Application of molecular markers linked to genes encoding economically valuable traits significantly accelerates the creation of new cultivars. Genetic collections in this case act as donors of different traits.

Plant collections *in vitro* occupy limited space and can be used year-round. Collections *in vitro* of raspberry (about 40 cultivars) and strawberry (about 30 cultivars) were created for marker selection for improved food properties and resistance to biotic stresses. In order to increase genetic diversity and to study the polymorphism of the target genes the cultivars from Russia, Europe and USA, have been included in the collections. The protocols of *in vitro* storage at low temperature were developed.

13 microsatellite loci for raspberries and 15 for strawberries were chosen for molecular genetic identification of cultivars. They were evaluated on raspberry (17 cultivars), blackberry (2), raspberry-blackberry hybrids (4) and strawberry (14). It was shown that 12 raspberry loci are presented in all raspberry cultivars, and the FJ194450 locus is amplified in blackberry and raspberry-blackberry hybrids only. Our results will be used for development of molecular markers linked with economically valuable traits of berry crops.

This work was financially supported by the Ministry of Education and Science of Russian Federation (Project 14.574.21.0149, unique identifier RFMEFI57417X0149).

Широкомасштабное клональное микроразмножение древесных лесных пород для закладки лесных плантаций

Лебедев В. Г., Шестибратов К. А.

Филиал Института биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, пр-т Науки, 6, Пущино, 142290, Московская область, Россия, тел.: +7(496)773-17-19, факс: +7(496)733-05-27, e-mail: vglebedev@mail.ru

.....

В последние десятилетия в мире все большее значение приобретают лесные плантации: если в 1990 г. они занимали 4 % всех лесных площадей, то в 2015 г. — уже 7 %. Благодаря высокой продуктивности с них сейчас получают около трети всего промышленного круглого леса. В условиях России требованиям к видам для лесных плантаций отвечают береза, осина и ива. Для сохранения генетических свойств посадочный материал должен быть получен вегетативным способом, однако классические методы размножения не всегда пригодны.

Цель работы заключалась в широкомасштабном получении посадочного материала ряда генотипов *Populus*, *Betula* и *Salix* путем клонального микроразмножения для закладки лесных плантаций в различных почвенно-климатических зонах России. В процессе работы были оптимизированы этапы мультипликации и укоренения в условиях *in vitro*, адаптации к нестерильным условиям, а также различные аспекты доращивания растений с закрытой корневой системой. В результате удалось добиться коэффициента мультипликации не менее 5, частоты укоренения и акклиматизации не менее 90 и 80 % соответственно для всех выращиваемых генотипов. Выход саженцев, пригодных для высадки на постоянное место, путем выращивания в кассетах с мини-ячейками мог достигать сотен шт./м². Всего было выращено свыше 1 млн растений, которые были использованы для 316 га лесных плантаций в Вологодской, Воронежской, Кировской областях, Республиках Татарстан и Марий Эл.

В настоящее время ведутся работы по снижению себестоимости посадочного материала, предназначенного для дальнейшего расширения лесных плантаций и исследования по оценке влияния генотипа и условий окружающей среды на скорость роста и устойчивости к заболеваниям в полевых условиях.

Large-scale clonal micropropagation of forest trees for short-rotation plantations

Lebedev V. G., Shestibratov K. A.

Branch of Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry Russian Academy of Sciences, 6 Science ave., 142290, Pushchino, Moscow Region, Russian Federation, tel.: +7(496)773-17-19, fax: +7(496)733-05-27, e-mail: vglebedev@mail.ru

.....

In recent decades, the importance of forest plantations in the world is increasing important: in 1990 they occupied 4 % of all forest areas but in 2015 — already 7 %. Now its provide about one third of the global industrial roundwood production due to high productivity. In Russia as species for forest plantations are birch, aspen and willow. The planting material for plantations must be obtained through vegetative propagation, but the classical methods of reproduction are not always suitable.

In this study we developed technology for large-scale production of *Populus*, *Betula* and *Salix* planting material through clonal micropropagation for establishment of forest plantations in various soil and climatic zones of Russia. We optimized proliferation and rooting *in vitro* stages, adaptation to non-sterile condition and growing containerized plants. As a result, a multiplication coefficient of at least 5, rooting and acclimatization frequencies of at least 90 and 80 %, respectively, for all genotypes were achieved. The yield of saplings suitable for planting to the field could reach hundreds of pieces/m² due to using mini-plug containers. In total, over 1 million plants were grown and used for establishment of 316 hectares of plantations in the Vologda, Voronezh and Kirov Regions, the Republics of Tatarstan and Mari El.

Now we work at reducing cost of micropropagated planting material for the further expansion of forest plantations and assessment of growth and disease resistance of plants under field conditions.

Митотическое удвоение хромосом в культуре *in vitro* с целью вовлечения в селекцию ценного генофонда дикого вида картофеля *Solanum stoloniferum*

Левый А. В., Ермишин А. П., Полюхович Ю. В.

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, ул. Академическая, 27, Минск, 220072, Беларусь, тел./факс: +375(17)284-19-17, e-mail: a30413@mail.ru

Ценный для селекции дикий аллотетраплоидный вид картофеля из Мексики *Solanum stoloniferum* используют в скрещиваниях с культурным картофелем только в качестве материнской формы из-за односторонней несовместимости. Это приводит к получению исходного материала, характеризующегося мужской стерильностью, связанной с цитоплазмой дикого вида, что существенно ограничивает возможности его применения в селекции.

Привлечение для гибридизации с *S. stoloniferum* специально созданных диплоидных SvSv-линий (F2 *S. tuberosum* × *S. verrucosum*) позволяет, с одной стороны, решить проблему односторонней несовместимости, с другой стороны, позволяет получать межвидовые гибриды, имеющие «фертильную» цитоплазму (Yermishin et al, 2017). Однако триплоидные гибриды между SvSv-линиями и *S. stoloniferum* стерильны из-за несбалансированного генома, что делает практически невозможным их беккроссирование культурным картофелем. Для вовлечения в селекцию ценного генофонда *S. stoloniferum* нами предложено два подхода, основанных на применении метода митотического удвоения хромосом с помощью обработки колхицином пробирочных растений SvSv-линий или названных выше триплоидных гибридов. Первый способ предполагает гибридизацию митотически удвоенных SvSv-линий (4x, 4EBN) с *S. stoloniferum* (4x, 2EBN) и последующее беккроссирование полученных гибридов (4x, 3EBN) сортами *S. tuberosum* (4x, 4EBN). Второй способ заключается в получении с помощью митотического удвоения хромосом гексаплоидных форм триплоидных гибридов SvSv-линии × *S. stoloniferum* (6x, 4EBN), которые далее беккроссируют культурным картофелем до достижения тетраплоидного уровня.

Митотическое удвоение хромосом у SvSv-линий и триплоидных гибридов проводили путем замачивания выращиваемых *in vitro* растений (по 10 растений каждого генотипа) в 0,025 % водном растворе колхицина в течение 72 час. Накануне обработки применяли трехкратное попеременное выдерживание растений (по 12 ч.) на свету при комнатной температуре и в темноте при 4°C. Перед замачиванием растений колхицином прижигали у них верхушки, чтобы стимулировать развитие пазушных почек. По завершении обработки растения промывали дистиллированной стерилизованной водой и проводили их черенкование. После 1–2 циклов размножения *in vitro* растения высаживали в грунт. Для отбора полиплоидных форм подсчитывали число хлоропластов в замыкающих клетках устьиц у пробирочных растений, полученных из обработанных почек, и у растений после высадки в грунт. В качестве удвоенных клонов рассматривали растения с числом хлоропластов в паре замыкающих клеток устьиц более 20 (исходные SvSv-линии и гибриды имели 12–14 хлоропластов).

Опыление митотически удвоенных SvSv-линий (4x) пыльцой *S. stoloniferum* оказалось неэффективным из-за различий балансового числа эндосперма (EBN) родителей (получено два не-всхожих семени, эффективность гибридизации 0,13 семян/опыление). Митотическое удвоение хромосом у триплоидных гибридов позволило получить высоко фертильные гексаплоиды, которые завязывали ягоды при самоопылении, содержащие жизнеспособные семена (всхожесть 93 %). Удвоенные гибриды удалось вовлечь в скрещивания как с диплоидами, так и тетраплоидами культурного картофеля.

Таким образом, показана высокая эффективность методики митотического удвоения хромосом триплоидных межвидовых гибридов посредством колхицинирования пробирочных растений, что позволило интрогрессировать ценные гены устойчивости к фитофторозу и PVY от *S. stoloniferum* в геном культурного картофеля.

Mitotic chromosome doubling in *in vitro* culture aimed at involvement into breeding of valuable germplasm of wild potato species *Solanum stoloniferum*

Levy A. V., Yermishin A. P., Polyukhovich Yu. V.

Institute of Genetics and Cytology of National Academy of Sciences of Belarus, 27 Akademicheskaya st., Minsk, 220072, Republic of Belarus, tel./fax: +375(17)284-19-17, e-mail: a30413@mail.ru

Solanum stoloniferum, valuable for breeding wild allotetraploid potato species from Mexico, is only crossed to cultivated potatoes if it is used as a female parent because of unilateral incompatibility. This is resulted in production of initial material which is characterized by male sterility associated with a cytoplasm of wild species that limits its use in breeding.

Application of specially developed SvSv-lines (F2 *S. tuberosum* × *S. verrucosum*) in crosses with *S. stoloniferum* made it possible, on the one hand, to decide an issue of unilateral incompatibility and, on the other hand, to produce interspecific hybrids having “fertile” cytoplasm (Yermishin et al. 2017). However, triploid hybrids between SvSv-lines and *S. stoloniferum* are sterile because of unbalanced genome, that makes practically useless their back-crossing with cultivated potatoes. In this research we had tested two approaches for involvement into breeding the of valuable gene pool of *S. stoloniferum*, that based on deployment of the method of mitotic chromosome doubling by means of colchicine treatment of *in vitro* plants of SvSv-lines and afore-mentioned triploid hybrids. The first approach stipulated hybridization of chromosome doubled SvSv-lines (4x, 4EBN) with *S. stoloniferum* (4x, 4EBN) and following back-crossing of produced hybrids (4x, 3EBN) by varieties of *S. tuberosum* (4x, 4EBN). Another approach included generation by means of mitotic chromosome doubling of hexaploid clones of triploid hybrids SvSv-lines × *S. stoloniferum* (6x, 4EBN), that further would be back-crossed by cultivated potatoes till the attainment of tetraploid level.

Mitotic chromosome doubling in SvSv-lines and triploid hybrids was induced by soaking *in vitro* plants (10 tubes for each genotype) in 0.025 % colchicine aqueous solution for 72 hours. Prior to colchicine treatment, plants were alternately exposed to light at room temperature for 12 hours followed by 12 hours in the dark at 4 °C three times. In addition, plant apices were physically damaged to stimulate axillary bud formation. After colchicine treatment, plants were rinsed in sterile distilled water and propagated by one bud cuttings. *In vitro* plants were bedded into greenhouse after 1–2 cycles of micropropagation. To select polyploids we calculated the number of chloroplasts in stomatal closing cells in *in vitro* plants and bedded plants. Those ones that had more than 20 chloroplasts were considered to be chromosome doubled clones (initial SvSv-lines and hybrids had 12–14).

Pollination of 4x SvSv-lines with the pollen of *S. stoloniferum* were inefficient because of the difference in balance endosperm number (EBN) of parents: two seeds were produced that were not able to germinate (hybridization efficacy was 0.13 seeds/pollination). Mitotic chromosome doubling of triploid hybrids made it possible to obtain highly fertile hexaploids that were able to set numerous berries from selfing with viable seeds (germination rate was 93 %). We succeeded in crossing the doubled hybrids with diploid, as well as tetraploid clones of cultivated potatoes.

Thus, it was demonstrated the high efficiency of used method of mitotic chromosome doubling of triploid interspecific hybrids by means of colchicine treatment of *in vitro* plants. It enabled us to introgress the valuable genes of late blight and PVY resistance from *S. stoloniferum* into genome of cultivated potatoes.

Размножение плетистых роз сортов 'Pale Royal', 'Camelot' и 'Nahema' в культуре *in vitro*

Леконцева Т. Г., Худякова А. В., Федоров А. В.

Удмуртский федеральный исследовательский центр УрО РАН, отдел интродукции и акклиматизации растений, ул. Татьяны Барамзиной, 34, Ижевск, 426067, Россия, тел: +7(341)250-82-00, e-mail: t.lekontseva@yandex.ru

Биотехнологический способ размножения растений имеет массу преимуществ по сравнению с традиционными вегетативными способами: высокий коэффициент размножения, посадочный материал свободен от различного рода патогенов и проходит стадию реювенилизации, миниатюризация всех этапов, выпуск материала к определенному сроку, отпадает необходимость содержания маточных растений и туманообразующей установки и т. д.

В качестве объекта исследований были выбраны микрочеренки плетистых повторноцветущих роз сортов 'Pale Royal', 'Camelot' и 'Nahema'. Изучали успешность размножения в зависимости от концентрации в питательной среде цитокинина 6-бензиаминопурина (6-БАП) и размера микрочеренка.

Исследования проводились на базе биотехнологической лаборатории Отдела интродукции и акклиматизации растений УдмФИЦ УрО РАН. Микроразмножение проводили на агаризованной питательной среде Мурасиге-Скуга в биологических пробирках (ПБ — 21–200) в условиях светокomнаты при продолжительности фотопериода 16 часов и температуре 25°C. В каждом варианте для биометрического анализа брали по 10 пробирок в трехкратной повторности. Продолжительность субкультивирования — 30 дней. Статистическая обработка данных проводилась по общепринятым методикам (Доспехов, 1985).

Коэффициент пролиферации на среде с содержанием 6-БАП 1 мг/л для сортов 'Pale Royal', 'Camelot' и 'Nahema' был равен 2,8, 2,9 и 3,6 шт./черенок, при увеличении в среде цитокинина до 2,0 мг/л — 4,0, 3,5 и 3,7 шт./черенок соответственно при НСР05=1,85. В среднем для трех сортов на средах с концентрацией 6-БАП 1,0 и 2,0 мг/л успешность размножения была 3,1 и 3,7 шт./черенок, существенных различий между вариантами опыта не выявлено (НСР05=1,07).

Наибольший потенциал размножения на двух питательных средах был у сорта 'Nahema', 3,6 шт./черенок, отмечена тенденция снижения коэффициента размножения на 0,2 и 0,4 шт. у сортов 'Pale Royal', 'Camelot' (НСР05=0,6).

Среда с содержанием цитокинина 1 мг/л способствовала существенному увеличению высоты микрочеренков по сравнению со средой 2,0 мг/л, в среднем 31,8 и 29,1 мм соответственно (НСР05=0,6). Высота микрочеренков сорта 'Pale Royal' была 36,7 мм, 'Camelot' и 'Nahema' составляла 28,1 и 26,6 мм при НСР05=2,2.

Был проведен анализ зависимости коэффициента пролиферации от первоначального размера микрочеренка. На среде с 6-БАП 1 мг/л коэффициент корреляции для сортов 'Pale Royal', 'Camelot' и 'Nahema' был равен 0,37, 0,39 и 0,45 соответственно, т. е. наблюдалась средняя корреляционная зависимость между признаками. Сильная корреляционная зависимость была выявлена на среде с 6-БАП 2,0 мг/л для сорта 'Camelot', коэффициент корреляции равен 0,75, для двух других сортов — средняя.

Таким образом, оптимальная концентрация цитокинина 6-БАП в составе питательной среды для сортов 'Pale Royal', 'Camelot' и 'Nahema' была 1,0 мг/л, при увеличении цитокинина до 2,0 мг/л наблюдалась тенденция увеличения коэффициента пролиферации. Выявлена положительная средняя корреляционная зависимость между такими признаками, как размер черенка и коэффициент пролиферации, исключением являлся сорт 'Camelot', где коэффициент корреляции на среде с 6-БАП 2,0 мг/л составил 0,75.

Propagation of climbing roses of 'Pale Royal', 'Camelot' and 'Nahema' sorts *in vitro*

Lekontseva T. G., Khudyakova A. V., Fedorov A. V.

*Udmurt Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences,
Department of Introductions and Acclimatization of Plants, 34 T. Baramzinoj st., Izhevsk, 426067,
Udmurt Republic, Russian Federation, tel.: +7(341)250-82-00, e-mail: t.lekontseva@yandex.ru*

The biotechnological method of plant propagation has many advantages compared to traditional vegetative methods: high propagation factor, miniaturization of all phases, release of material by a certain date. Also the planting material doesn't contain various pathogens and passes the phase of rejuvenation. There is no need to growth of parent plants and foggin plant etc.

Micro-grafts of reccurent flowered climbing roses of 'Pale Royal', 'Camelot' и 'Nahema' sorts were selected as the object of research. The success of propagation was studied depending on the concentration of cytokinin 6-benzylaminopurine (6-BAP) in the nutrient medium and the size of the micro-graft.

The researhes were carried out on the basis of the biotechnological laboratory of Department of Introductions and Acclimatization of Plants of Udmurt Federal Research Center of the Ural Branch of the RAS. Micropropagation was carried out on an agarized MS medium in biological test-tubes (PB-21 h200) under light-room conditions with a photoperiod duration of 16 hours and 25°C temperature. There were taken 10 test-tubes in triplicate for biometric analysis in each variant. The subculturing duration is 30 days. Statistical processing of data was carried out according to generally accepted methods (B. A. Dospekhov, 1985).

The proliferation factor in a medium containing 6-BAP 1 mg/l for 'Pale Royal', 'Camelot' and 'Nahema' sorts was 2.8, 2.9, and 3.6 pcs/graft, with an increase in the cytokinin to 2.0 mg/l was 4.0, 3.5 and 3.7 pcs/graft, respectively, with LSD05 = 1.85. On average, for three sorts on media with a concentration of 6-BAP of 1.0 and 2.0 mg/l, the success of propagation was 3.1 and 3.7 pcs /graft, there were no significant differences between trial variants (LSD05 = 1.07).

The greatest propagation potential in two nutrient media was in the 'Nahema' sort, it was 3.6 pcs/graft. There was the tendency of the reproduction coefficient decrease by 0.2 and 0.4 pieces of 'Pale Royal', 'Camelot' sorts (LSD05 = 0.6).

A medium with a 1 mg/l cytokinin conduced to a significant increase in the height of micro-grafts compared to 2.0 mg/l, an average of 31.8 and 29.1 mm, respectively (LSD05 = 0.6). The micro-grafts height of Pale Royal sort was 36.7 mm, 'Camelot' and 'Nahema' sorts were 28.1 and 26.6 mm for LSD05 = 2.2.

There was an analysis of the dependence of the proliferation factor on the initial size of the micro-graft. On a medium with 6-BAP 1 mg/l, the correlation factor for 'Pale Royal', 'Camelot' and 'Nahema' sorts was 0.37, 0.39 and 0.45 respectively, that is there was an average correlation dependence between the features. A strong correlation dependence was observed in the medium with 6-BAP 2.0 mg/l for Camelot sorts, the correlation factor was 0.75, for the other two sorts was the average.

Thus, the optimal concentration of cytokinin 6-BAP in the nutrient medium for 'Pale Royal', 'Camelot' and 'Nahema' sorts was 1 mg/l, with an increase in cytokinin up to 2 mg/l, there was the tendency to increase the proliferation factor. A positive average correlation was found between such features as the size of the graft and the proliferation factor, except for the 'Camelot' sort, where the correlation factor on the medium with 6-BAP 2.0 mg/l was 0.75.

Влияние светодиодного освещения разного спектрального состава на морфогенез и вторичный метаболизм *Catharanthus roseus* (L.) в условиях *in vitro* и закрытого грунта

**Лёшина Л. Г.¹, Молчан О. В.², Булко О. В.¹, Пушкарева Н. А.¹,
Кирпа-Несмиян Т. Н.¹, Запрудская Е. В.², Кучук Н. В.¹**

¹ Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, акад. Заболотного, 148, Киев, 03143, Украина, тел./факс: +380(44)526-71-04

² Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси, ул. Академическая, 27, Минск, 220072, Беларусь, факс: +375(17)284-18-53, тел.: +375(17)284-20-12, e-mail: llioshina@ukr.net

Использование светодиодного (СД) освещения при выращивании растений имеет ряд преимуществ по сравнению с другими вариантами освещения. Помимо безопасности, экологичности, высокой световой отдачи, длительного срока службы важным фактором является возможность комбинации света различного спектрального состава, и это может быть использовано для оптимального роста и стимулирования тех или иных процессов в растительном организме. Целью представленной работы было изучение влияния СД-освещения с разным спектральным диапазоном на фотоморфогенез и вторичные процессы в *Catharanthus roseus* (L.) G. Don — лекарственном растении, источнике индольных алкалоидов, выращиваемого в условиях *in vitro* и *in vivo* в закрытом грунте. В условиях *in vitro* катарантус инкубировали в банках со стеклянными крышками под СД-освещением с уровнем ППФ 320 мкмоль•м⁻²•с⁻¹ и соотношением квантов синий:красный (С:К) — 1:1,3; 1:2,5; 1:4, а также под СД монохромного красного, синего и СД натурального белого света с цветовой температурой 6000К. В закрытом грунте использовали люминесцентное (контроль) и СД-освещение всех длин волн с соотношением С:К — 1:1,3; 1:2,5; 1:4 и ППФ — 200 или 500 мкмоль квантов м⁻²•с⁻¹ на уровне верхней точки роста растений. Определение индольных алкалоидов — аймалицина, виндолина, катарантина, винбластина и винкрестина проводили методом ВЭЖХ в сочетании с тандемной масс-спектрометрией с использованием жидкостного хроматографа Agilent 1200 и тандемного масс-спектрометра Agilent 6410 Triple Quad.

Установлено, что культивирование катарантуса в условиях *in vitro* под красным СД-освещением и вариантами С:К 1:1,3 и 1:4 стимулирует ризогенез. Красное, белое освещение и соотношение С:К 1:2,3 вызывают увеличение размера листьев. АОА повышается лишь под белым СД освещением, при этом количество СОД меньше контрольных показателей во всех вариантах, кроме белого. Также во всех вариантах уменьшается количество хлорофиллов и каротиноидов. Синтез флавоноидов повышается только при освещении С:К 1:2,3. При освещении монохромным синим наблюдается укорочение междоузлий и увеличение побего- и корнеобразования, что потенциально может быть использовано для мультипликации растений методом микроклонального размножения и при выращивании рассады в условиях закрытого грунта. При выращивании в закрытом грунте показано, что при освещении с соотношением С:К равным 1:1,3 (200 мкмоль•м⁻²•с⁻¹) замедляются ростовые процессы растений, снижается интенсивность цветения и накопления сухой массы. Однако этот режим оказался эффективным для стимуляции процессов биосинтеза и накопления алкалоидов в листьях и корнях, а также фенольных соединений в надземной части растений. Максимальный синтез и накопление виндолина, катарантина и винбластина наблюдался при освещении с ППФ 500 мкмоль • м⁻²•с⁻¹ и соотношением С:К 1:2,5, а соотношение С:К — 1:4 стимулировало синтез аймалицина.

Полученные результаты целесообразно использовать для проведения исследования регуляции биосинтеза первичных и вторичных метаболитов в хозяйственно-ценных растениях как в условиях *in vitro* так и в закрытом грунте.

LED lighting of different spectral composition and its effect on the morphogenesis and secondary metabolism of *Catharanthus roseus* (L.) *in vitro* and in greenhouses

**Lioshyna L. G.¹, Molchan O. V.², Bulko O. V.¹, Puchkareva N. A.¹,
Kyrpa-Nesmijan T. N.¹, Zaprudskaja E. V.², Kuchuk M. V.¹**

¹ Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine,
148 Akademika Zabolotnoho st., 03143, Kyiv, Ukraine, tel./fax: +380(44)526-71-04

² Institute of Experimental Botany V. F. Kuprevich National Academy of Sciences of Belarus,
27 Akademicheskaya st., Minsk, 220072, Republic of Belarus,
fax: +375(17)284-18-53, tel.: +375(17)284-20-12, e-mail: llioshina@ukr.net

The use of LED lighting for growing plants has several advantages over other lighting options. In addition to safety, environmental friendliness, high light output, long service life, an important factor is the possibility of combining light of different spectral composition, and this can be used for optimal growth and stimulation of various processes in the plant organism. The purpose of this study was to investigate the effect of LED lighting with different spectral range on photomorphogenesis and secondary processes in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (a medicinal plant and a source of indole alkaloids) under *in vitro* and *in vivo* conditions.

Under *in vitro* conditions, *C. roseus* were incubated in container with glass covers under LED lighting with a PPF level of 320 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and a ratio of quanta blue: red (B:R) -1: 1.3; 1: 2.5; 1: 4, as well as under the LED monochrome red, blue and LED natural white light with a color temperature of 6000K. Under the conditions of the greenhouse, a fluorescent (control) and LED illumination of all wavelengths with a B:R ratio of 1:1.3; 1:2.5; 1:4 was used; and PPF — 200 or 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at the level of the top point of plant growth. The determination of indole-alkaloids — aymalycin, vindolin, cataratine, vinblastine and vincristine was carried out by HPLC in combination with tandem mass spectrometry using an Agilent 1200 liquid chromatograph and a tandem Agilent 6410 Triple Quad mass spectrometer.

Incubation *in vitro* plants under illumination of red CD and variants B:R 1:1.3 and 1:4 improves root growth. Under red, white and at a ratio B:R 1:2.3, the size of the leaves increases. Antioxidant activity increases only with white LED lighting, and the amount of superoxide dismutase is less than all options except white. Also in all variants, the amount of chlorophylls and carotenoids decreases. The synthesis of flavonoids increases only under illumination B: R 1: 2.3. Lighting with monochrome blue causes a decrease in internodes and an increase in the formation of shoots and roots, this can potentially be used for propagation of plants by the method of microclonal propagation and when growing seedlings in greenhouse conditions.

Growing in a greenhouse showed that under illumination with the ratio B:R equal to 1: 1.3 (200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), the growth processes of plants are slowed down, the intensity of flowering and accumulation of dry mass is reduced. However, this regimen proved to be effective for stimulating the processes of biosynthesis and accumulation of alkaloids in leaves and roots, as well as phenolic compounds in the aerial part of plants. The maximum synthesis and accumulation of vindolin, cataratin and vinblastine was observed under illumination with 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and a B:R ratio of 1: 2.5, and a B:R -1: 4 ratio stimulated the synthesis of aymalycin.

It is expedient to use the obtained results to study the regulation of the biosynthesis of primary and secondary metabolites in economically valuable plants both *in vitro* and *in vivo* under conditions of a greenhouse.

Микроклональное размножение межродового гибрида *Festulolium* морфотипа овсяницы тростниковой (*Festuca arundinacea*)

Мазур Т. В., Кондрацкая И. П., Чижик О. В.

Центральный ботанический сад НАН Беларуси, ул. Сурганова, 2 в, Минск, 220012, Беларусь,
тел./факс: +375(17)284-14-84, e-mail: chizhikolga17@gmail.com

В настоящее время большое значение приобретают новые виды кормовых культур, отличающиеся более высокой и стабильной урожайностью, высокой энергетической и протеиновой питательностью по сравнению с традиционными видами. Значительный интерес для кормового использования в семеноводстве имеют сорта межродовых гибридов фестулолиума. Создание нетрадиционных видов и сортов многолетних злаковых трав с целью увеличения их урожайности и повышения качества получаемого корма является важным резервом улучшения состояния кормопроизводства республики.

Для введения в культуру *in vitro* 8 линий (Fla 1, Fla 2, Fla 3, Fla 4, Fla 5, Fla 6, Fla 7, Fla 8) межродового гибрида фестулолиума морфотипа овсяницы тростниковой использовали семена, которые стерилизовали 0,1 %-м раствором AgNO_3 (10 мин.). Введенные в культуру *in vitro* растения выращивали на среде МС. Для микроклонального размножения фестулолиума был использован метод активации пазушных меристем. Для активации побегообразования культивирование проводили на средах МС, содержащих различные концентрации БАП (0,5, 1, 2 и 3 мг/л). В качестве контроля использовали среду, не содержащую регуляторов роста. Спустя 6 недель культивирования учитывали число побегов, образовавшихся на каждом экспланте. Исходя из полученных результатов, было определено, что исследуемые линии фестулолиума неодинаково реагируют на присутствие БАП в среде культивирования. Таким образом, наиболее эффективными оказались среды с добавлением БАП в концентрации 0,5 и 1 мг/л. Максимальные значения частоты побегообразования при культивировании на среде МС с добавлением БАП в концентрации 0,5 мг/л наблюдали у линий Fla 7 — $5,8 \pm 0,9$ и Fla 3 — $4,25 \pm 1,16$ побегов/эксплант. У линий Fla 1, Fla 5 и Fla 2 частота побегообразования на данной среде была $3,28 \pm 0,6$, $3,0 \pm 0,8$ и $2,9 \pm 0,8$ побегов/эксплант, соответственно. Наименьшее количество побегов/эксплант наблюдали у линий Fla 6 — $2,77 \pm 0,4$, Fla 8 — $2,3 \pm 0,4$ и Fla 4 — $2,13 \pm 0,6$. Максимальное побегообразование у линий Fla 6 и Fla 8 наблюдали на среде МС с добавлением БАП в концентрации 1 мг/л — $3,65 \pm 0,4$, $3,47 \pm 0,4$, соответственно. Увеличение концентрации цитокинина в среде культивирования до 2 мг/л вызывало снижение активности побегообразования и ингибирование роста побегов при концентрации 3 мг/л.

В результате проведенных исследований было установлено, что культивирование побегов фестулолиума предпочтительно проводить на средах МС с добавлением БАП в концентрации 0,5 мг/л для линий Fla 1, Fla 2, Fla 3, Fla 5, а для линий Fla 6 и Fla 8 на среде с добавлением БАП 1 мг/л.

Такой подход к культивированию позволяет быстро размножить хозяйственно ценные линии растений фестулолиума морфотипа овсяницы тростниковой.

Microclonal propagation of an intergeneric hybrid of *Festulolium* of a morphotype of reed fescue (*Festuca arundinacea*)

Mazur T. V., Kandratskaya I. P., Chizhik O. V.

Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, 2v Surganova st., 220012, Minsk, Republic of Belarus, tel./fax: +375(17)284-14-84, e-mail: chizhikolga17@gmail.com

Now great value take the new forms of forage crops differing in higher and stable productivity, high power and protein nutritiousness in comparison with traditional types. For fodder use in seed farming grades of intergeneric *Festulolium* hybrids have the considerable interest. Creation of nonconventional types and grades of long-term cereal herbs for the purpose of increase in their productivity and upgrading of the received forage is an important reserve of improvement of a condition of forage production of the republic.

For introduction to *in vitro* culture of 8 lines (Fla 1, Fla 2, Fla 3, Fla 4, Fla 5, Fla 6, Fla 7, Fla 8) of an intergeneric hybrid of a *Festulolium* of a morphotype of fescue reed used seeds which sterilized 0.1% AgNO₃ solution (10 min.). Injected into *in vitro* culture plants, grew up on the MS medium. For microclonal propagation of *Festulolium* the method of activation of axillary meristems was used. For forthputting activation cultivation was carried out on the MS media containing various concentration BAP (0.5, 1, 2 and 3 mg/l). As monitoring used medium, free of growth regulators. 6 weeks of cultivation later considered number of shoots formed on each explant. Proceeding from the received results, it was defined that the explored lines of a *Festulolium* unequally react to presence 6-BAP in the culture medium. Thus, culture media with addition BAP in concentration of 0.5 and 1 mg/l were the most efficient. The maximal values of frequency of forthputting at cultivation on the MS medium with addition BAP in concentration of 0.5 mg/l observed at the Fla 7 lines — 5.8 ± 0.9 and Fla 3 — 4.25 ± 1.16 escapes / explant. The Fla 1, Fla 5 and Fla 2 lines forthputting frequency on this medium had 3.28 ± 0.6 , 3.0 ± 0.8 and 2.9 ± 0.8 escapes / explant, respectively. The least number of escapes / explant observed at the Fla 6 lines — 2.77 ± 0.4 , Fla 8 — 2.3 ± 0.4 and Fla 4 — 2.13 ± 0.6 . The maximal forthputting at the Fla 6 and Fla 8 lines observed on the MS medium with addition BAP in concentration 1 mg/l — 3.65 ± 0.4 , 3.47 ± 0.4 , respectively. Increase in concentration of a cytokinin the medium of cultivation up to 2 mg/l caused decrease of the activity of forthputting and inhibition of body height of escapes at concentration of 3 mg/l.

As a result of the conducted researches it was established that cultivation of escapes of a *Festulolium* it is preferable to carry out on the MS media with addition BAP to concentration 0.5 mg/l for the lines Fla1, Fla2, Fla 3, Fla 5, for the Fla 6 and Fla 8 lines on the medium with addition of BAP 1 mg/l.

Such approach of cultivation allows to multiply quickly agricultural lines of plants of a *Festulolium* of a morphotype of a fescue reed.

Редокс-регуляция ионного транспорта в растущей пыльцевой трубке

Максимов Н. М., Брейгина М. А.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра физиологии растений, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, Москва, 119234, Россия, тел.: +7(495)939-12-09, e-mail: nmmaksimow@gmail.com; pollen-ions@yandex.ru

Сифоногамия — процесс доставки неподвижных мужских гамет к яйцеклетке — одна из ключевых особенностей, позволивших растениям в полной мере освоить наземно-воздушную среду обитания. Зрелые пыльцевые зёрна большинства семенных растений сильно дегидратированы и находятся в состоянии покоя. При попадании на рыльце пестика (у покрытосеменных) или в оплодотворительную каплю (у голосеменных) происходит регидратация, возобновление метаболических процессов и прорастание, связанное с установлением механизмов, обеспечивающих полярный и направленный к яйцеклетке рост. К числу таких механизмов относятся: полярные ионные токи Ca^{2+} , $\text{Cl}^-/\text{NO}_3^-$, H^+ , K^+ , обеспечивающие формирование ионных градиентов Ca^{2+} , H^+ , $\text{Cl}^-/\text{NO}_3^-$ в цитоплазме. Очевидно функциональное значение градиента Ca^{2+} , являясь важнейшим вторичным мессенджером, данный ион обеспечивает характерную для пыльцевых трубок организацию цитоскелета, а также стимулирует экзоцитоз и секрецию материала клеточной стенки в апексе растущей трубки. Недавно высказано предположение и о роли градиента анионов ($\text{Cl}^-/\text{NO}_3^-$), который согласно модели может служить для осмофоретического продвижения везикул к апексу. Другим важным аспектом, связанным с полярной организацией ионных токов, является латеральный градиент мембранного потенциала, наличие которого показано в нашей группе сначала на пыльцевых трубках табака (*Nicotiana tabacum* L.), а затем на пыльцевых трубках лилии (*Lilium longiflorum* Thumb.) и ели (*Picea pungens* Engelm.). Вход катионов (H^+ , K^+) в апексе и их выход в базальных частях трубки обеспечивают деполяризацию апекса по сравнению с основной частью трубки. Такое распределение мембранного потенциала, по-видимому, может также стимулировать экзоцитоз везикул исключительно в апексе растущей трубки.

Важная роль в регуляции работы ионных каналов и других ион-транспортных систем отводится активным формам кислорода (АФК). Так, АФК-чувствительные катионные Ca^{2+} -проводящие каналы обеспечивают установление градиента Ca^{2+} . Кроме того, обнаружены ионные токи K^+ , которые также модулируются АФК. Подобные токи обнаружены на различных объектах электрофизиологическими методами. В том числе и в нашей лаборатории выявлены данные токи на протопластах из пыльцевых зерен однодольного растения — лилии (*Lilium longiflorum* Thumb.). Полученные результаты по АФК-регуляции ионного транспорта и данные о мембранном потенциале дополняют цитофизиологические представления о полярном росте пыльцевой трубки.

Настоящая работа была поддержана РФФИ (проект № 18-34-00979).

Redox-regulation of ion transport during pollen tube growth

Maksimov N. M., Breygina M. A.

M. V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 1-12 Leninskie Gory, 119234, Moscow, Russian Federation, tel.: +7(495)939-12-09, e-mail: nmmaksimow@gmail.com, pollen-ions@yandex.ru

.....

Siphonogamy — transfer immobile male gametes to the egg via a pollen tube is one of the key innovations of seed plants for diversification and master of terrestrial habitat. Mature pollen grains of most seed plants are strongly dehydrated and metabolic inactive. When pollen grain reach stigma (angiosperms) or fertilization drop (gymnosperms) rehydration and reactivation of metabolic processes occur. After this pollen germinates and establish machinery that ensure an egg-directed polar growth. The key component of this cell machinery is polar Ca^{2+} , $\text{Cl}^-/\text{NO}_3^-$, H^+ , K^+ currents, which provide the formation of Ca^{2+} , H^+ , $\text{Cl}^-/\text{NO}_3^-$ gradients in the cytoplasm. Ca^{2+} provides the organization of the cytoskeleton and also stimulates the exocytosis for secretion of the cell wall material in the apex of the growing tube. According to the recent model an anion gradient ($\text{Cl}^-/\text{NO}_3^-$) could promote vesicle osmophoresis for trafficking vesicles to the apex. Another important aspect related to the polar ion currents is the lateral gradient of the membrane potential. The presence of stable membrane potential gradient was shown in our group first on the pollen tubes of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) and after this on the pollen tubes of the lily (*Lilium longiflorum* Thumb.) and spruce (*Picea pungens* Engelm.). The entry of cations (H^+ , K^+) in the apex and their exit in the basal parts of tube ensure depolarization of the apex in comparison with the shank of the tube. This distribution of the membrane potential can also stimulate the exocytosis of the vesicles exclusively in the apex of the growing tube.

Reactive oxygen species (ROS) plays important role in the regulation of pollen tube growth via control transmembrane ion transport. ROS-sensitive cation Ca^{2+} -permeable channels contribute to the formation of cytoplasm Ca^{2+} gradient. K^+ current also modulated by the ROS. Different ROS-controlled currents were detected at various objects by electrophysiological methods. In our laboratory, these currents were studied on lily pollen grain protoplasts. Obtained results on the ROS-regulation of ion transport and data on the membrane potential complements our knowledge on cytophysiological mechanisms of the polar growth of the pollen tube.

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (Project No. 18-34-00979).

Использование биотехнологических методов для сохранения редких видов растений

Малаева Е. В.^{1,2}, Молканова О. И.³

¹ Волгоградский региональный ботанический сад, пос. Металлургов, 68, Волгоград, 400007, Россия, +7(844)227-39-37, e-mail: e.malaeva@mail.ru

² Волгоградский государственный социально-педагогический университет, пр-т Ленина, 27, Волгоград, 400066, Россия

³ Главный ботанический сад им. Н. В. Цицина РАН, ул. Ботаническая, 4, Москва, 127276, Россия, тел.: +7(499)977-91-45, e-mail: molkanova@mail.ru

Наряду с традиционными методами сохранения растений *ex situ* применение культуры изолированных тканей и органов становится все более и более актуальным. Цель наших исследований — совершенствование технологии клонального микроразмножения, изучение морфогенетических процессов, происходящих при этом и создание банка стерильных культур редких видов растений. Разработка эффективных методов микроклонального размножения является основой работ по сохранению генофонда растений. На основе массового скрининга были разработаны высокоэффективные технологии клонального микроразмножения различных таксономических групп растений для более 1000 генотипов, 120 видов, 45 семейств. Способность к органогенезу зависела от таксономической принадлежности и существенно отличалась между семействами, видами и сортами.

На основе этих исследований создан крупнейший в России банк стерильных растений.

Особое внимание уделяется применению биотехнологических методов для сохранения исчезающих видов растений. Наиболее представительными в банке меристем редких видов Главного ботанического сада являются семейства *Orchidaceae*, *Iridaceae*, *Liliaceae*, *Paeoniaceae*, *Rosaceae*, *Amaryllidaceae*, *Araliaceae*.

Работа по созданию коллекции *in vitro* Волгоградским региональным ботаническим садом ведется с 2005 г. На данный момент коллекция редких растений *in vitro* содержит 50 видов, относящихся к 19 семействам.

В коллекции *in vitro* Волгоградского регионального ботанического сада наиболее представлены редкие виды растений следующих семейств: *Fabaceae*, *Brassicaceae*, *Caryophyllaceae*, *Liliaceae*, *Hyacinthaceae*, *Iridaceae*.

Были подобраны оптимальные условия для длительного хранения меристем в генетическом банке стерильных культур ($t = 3-5^{\circ}\text{C}$). Первостепенное значение при создании генетического банка *in vitro* уделяется репрезентативности и сохранению генетической чистоты. На модельных объектах для оценки стабильности образцов, хранящихся в банке *in vitro*, проведен RAPD-анализ. Хранение *in vitro* ценных форм растений является высокоэффективным и полезным способом для содержания коллекций растений и сохранения биологического разнообразия.

Application of biotechnological methods for conservation of rare species plant

Malaeva E. V.^{1,2}, Molkanova O. I.³

¹ Volgograd Regional Botanical Garden, Volgograd, set. Metallurgov, 68, 400007, Volgograd, Russian Federation, +7(844)227-39-37, e-mail: e.malaeva@mail.ru

² Volgograd State Social & Pedagogical University, 27 Lenin ave., Volgograd, 400066, Russian Federation

³ Main Botanical Garden named after N. V. Tsitsin of Russian Academy of Sciences, 4 Botanical st., 127276, Moscow, Russian Federation, tel.: +7(499)977-91-45, e-mail: molkanova@mail.ru

.....

Equally with traditional methods of plant conservation *ex situ* application of isolated tissue and organ cultures has become more and more actual. The purpose of our research is to improve the clonal micropropagation technology, to investigate the morphogenetic processes in the course of propagation and to create the bank of sterile cultures of rare plant species. The development of effective microclonal reproduction methods to constitute the basis for the work on preserving the plant gene bank. The highly efficient technologies of clonal micropropagation of various taxonomic group of plants have been elaborated and improved on the basis of mass screening for more than 1000 plant genotypes attributed to 120 genera and 45 families. The ability for organogenesis depended on plant taxon and differed essentially between families species and cultivars. On the basis of these researches the largest in Russia bank of sterile plants is created.

Application of biotechnological methods for preservation of rare plant species the special attention is given. *Orchidaceae*, *Iridaceae*, *Liliaceae*, *Paeoniaceae*, *Rosaceae*, *Amaryllidaceae*, *Araliaceae* families are the most representative in bank of rare plant species of Main Botanical Garden.

Work on creating of *in vitro* collection as the Volgograd regional botanical garden is conducted since 2005. The collection *in vitro* of rare species of Volgograd regional botanical garden 50 species and 19 families. *Fabaceae*, *Brassicaceae*, *Caryophyllaceae*, *Liliaceae*, *Hyacinthaceae*, *Iridaceae* families are the most representative in bank of rare plant species of Volgograd regional botanical garden.

The optimum storage conditions in the genetics bank of aseptic cultures have been found for 3–5°C. At creation of gene bank *in vitro* primary importance is given to representative and preservation of genetic stability. For model species RAPD-analysis has been carried out to control the genetic stability of the items kept in bank *in vitro*. Hence the storage *in vitro* of valuable plant forms is a highly efficient and useful way for maintenance of plant collections and conservation of plant biodiversity.

Возможные пути увеличения биосинтеза рекомбинантных белков в культурах клеток высших растений

Маренкова Т. В.¹, Пермякова Н. В.¹, Сидорчук Ю. В.¹, Загорская А. А.¹,
Белавин П. А.¹, Уварова Е. А.¹, Розов С. М.¹, Фоменков А. А.²,
Носов А. В.², Дейнеко Е. В.¹

¹ Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, пр-т акад. Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090, Россия, факс: +(383)333-12-78, тел.: +7(383)363-49-63 *3204

² Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, ул. Ботаническая, 35, Москва, 127276, Россия, тел.: +7(499)678-53-91, e-mail: deineko@bionet.nsc.ru

В настоящее время большое число белков медицинского назначения получают не из природных источников, а синтезируют их рекомбинантные аналоги в различных системах экспрессии (*E. coli*, дрожжи, клетки животных и др.). Перспективными для этих целей являются культуры клеток высших растений, характеризующиеся низкой стоимостью производства, способностью синтезировать сложные белки, а также отсутствием патогенов человека и животных. Несмотря на успешность использования суспензионных клеточных культур растений для коммерческого получения фармбелков, в этом направлении все еще остается достаточно много нерешенных проблем, наиболее важной среди которых является недостаточно высокий выход рекомбинантного белка. В целом, решение проблемы повышения выхода рекомбинантного белка в растительных клетках решается за счет оптимизации генетических конструкций, включающих целевой ген, оптимизации условий культивирования растительных клеток, а также отбора наиболее «благоприятных» событий интеграций трансгена в растительный геном при его случайном характере распределения по геному. Как один из возможных путей увеличения биосинтеза рекомбинантных белков в культурах клеток высших растений рассматривается поиск в растительном геноме районов, в которых экспрессия собственных генов растения наиболее активна и постоянна. С применением технологии геномного редактирования такие районы могут послужить мишенями для адресной доставки в них целевого гена. Наибольшей транскрипционной активностью в геноме всех эукариотических организмов обладает ядрышковый организатор — область генома, содержащая от сотен до десятков тысяч tandemно повторенных копий генов рРНК. Гены рРНК транскрибируются конститутивно и с высокой интенсивностью, замолкая только на время деления клетки. В случае встраивания целевого гена в область генов рРНК можно ожидать высокого уровня его транскрипции и значительного выхода целевого белка. В качестве модели для оценки вклада района-мишени в выход целевого белка использованы быстрорастущие суспензионные культуры клеток *A. thaliana*, полученные в Институте физиологии растений РАН (г. Москва), которые по активности пролиферации не уступают широко известной линии клеток табака ВУ-2. На основании результатов биоинформационного анализа в качестве наиболее привлекательного района для встраивания целевых генов, требующих высокого уровня транскрипции, выбран транскрибируемый участок 5' ETS, в дальнейшем вырезаемый при процессинге 45S транскрипта. Создан генно-инженерный инструментарий для геномного редактирования, а также для случайной интеграции *gfp*-гена в геном *A. thaliana*. Созданы две серии моноклональных клеточных линий, одна из которых представлена линиями с адресной доставкой *gfp*-гена в район-мишень межгенного спейсера ядрышкового организатора и вторая — линиями со случайной интеграцией *gfp*-гена в геном. По результатам RT-PCR отобраны линии с одной инсерцией трансгена на геном. Проведен сравнительный анализ моноклональных клеточных линий по транскрипционной активности *gfp*-гена и по уровню накопления целевого белка.

Работа поддержана грантом РФФ:17-14-01099.

Possible ways to increase the biosynthesis of recombinant proteins of cells culture of higher plants

Marenkova T. V.¹, Permyakova N. V.¹, Sidorchuk Yu. V.¹, Zagorskaya A. A.¹, Belavin P. A.¹, Uvarova E. A.¹, Rozov S. M.¹, Fomenkov A. A.², Nosov A. V.², Deineko E. V.¹

¹ Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, 10 Academician Lavrentiev ave., 630090, Novosibirsk, Russian Federation⁶ fax: +(383)333-12-78, tel.: +(383)363-49-63 * 3204

² K. A. Timiryazev Institute of Plant Physiology Russian Academy of Sciences, 35 Botanicheskaya st., 127276, Moscow, Russian Federation, tel.: +(499)678-53-91, e-mail: deineko@bionet.nsc.ru

Currently, a large number of medical proteins are obtained not from natural sources, but synthesize their recombinant analogs in various expression systems (*E. coli*, yeast, animal cells, etc.). Promising for this purpose are the cultures of cells of higher plants, characterized by low cost of production, the ability to synthesize complex proteins, as well as the absence of human and animal pathogens. Despite the success of the use of suspension cell cultures of plants for the commercial production of pharmaceutical proteins, there still remain many unresolved problems in this direction, the most important of which is the insufficiently high yield of the recombinant protein. In general, the solution of the problem of increasing the yield of recombinant protein in plant cells is solved by optimizing the genetic constructs including the target gene, optimizing the conditions for culturing plant cells, and selecting the most "favorable" events of transgene integration into the plant genome, with its random distribution by genome. As one of the possible ways to increase the biosynthesis of recombinant proteins in plant cell cultures of higher plants, a search is considered in the plant genome of regions in which the expression of the plant's own genes is the most active and constant. Using the technology of genomic editing, such areas can serve as targets for targeted delivery of the target gene in them. The nucleotide organizer is the most transcription activity in the genome of all eukaryotic organisms — the genome region, containing from hundreds to tens of thousands of tandem copies of rRNA genes. The rRNA genes are transcribed constitutively and with high intensity, silencing only at the time of cell division. If the target gene is inserted into the region of rRNA genes, one can expect a high level of its transcription and a significant yield of the target protein. As a model for assessing the contribution of the target region to the yield of the target protein, fast-growing suspension cultures of *A. thaliana* cells obtained at the Institute of Plant Physiology of the Russian Academy of Sciences (Moscow) were used, which are not inferior to the well-known BY-2 tobacco cell line in proliferation activity. Based on the results of bioinformatics analysis, the transcribed 5'ETS region is selected as the most attractive region for the insertion of target genes requiring a high level of transcription, which is later excised when processing the 45S transcript. Genetically engineered tools for genomic editing, as well as for the random integration of the *gfp* gene into the genome of *A. thaliana*, were created. Two series of monoclonal cell lines have been created, one of which is represented by lines with the targeted delivery of the *gfp* gene to the target region of the intergenic spacer of the nucleolar organizer and the second to lines with the random integration of the *gfp* gene into the genome. By results of RT-PCR, lines with one insertion of the transgene into the genome were selected. A comparative analysis of monoclonal cell lines on the transcription activity of the *gfp* gene and the level of accumulation of the target protein was carried out.

The work was supported by the grant of the RNF: 17-14-01099.

Вариабельность экспрессии *gfp*-гена в моноклональных клеточных линиях *Arabidopsis thaliana*

Маренкова Т. В.¹, Сидорчук Ю. В.¹, Носов А. В.², Фоменков А. А.²,
Загорская А. А.¹, Мурсалимов С. Р.¹, Кузнецов В. В.¹, Дейнеко Е. В.¹

¹ Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, пр-т акад. Лаврентьева, 10,
Новосибирск, 630090, Россия, факс: +7(383)333-12-78, тел.: +7(383)363-49-80,
e-mail: sidorch@bionet.nsc.ru

² Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, ул. Ботаническая, 35, Москва,
127276, Россия, факс: +7(499)678-54-20, тел.: +7(499)678-54-00

Суспензионные культуры растительных клеток представляют собой перспективную систему экспрессии для получения рекомбинантных белков, в том числе фармацевтически ценных. Однако в этом направлении все еще остается достаточно много нерешенных проблем, наиболее важной среди которых является недостаточно высокий выход рекомбинантного белка. Одним из подходов для решения этой проблемы, при случайном характере интеграции трансгенов в растительный геном, является отбор наиболее «благоприятных» событий, характеризующихся высоким выходом рекомбинантного белка.

Методом агробактериальной трансформации получено 22 моноклональных клеточных линий *A. thaliana* со случайными сайтами встраивания в геном *gfp*-гена под управлением CaMV35S-промотора. На основании цитологического анализа клеточных линий по интенсивности флюоресценции клеток и морфологии клеточных агрегатов, исследуемые линии разделили на 4 группы. Первую группу составили клеточные линии, состоящие из агрегатов мелких округлых клеток с высокой интенсивностью GFP-флюоресценции, вторую группу — клеточные линии со средней интенсивностью флюоресценции агрегатов, состоящих из удлинённых клеток. Третья группа была представлена клеточными линиями с низкой интенсивностью флюоресценции и четвертая — с полным отсутствием флюоресценции.

Методом RT-PCR оценено число инсерций *gfp*-гена на геном и для дальнейшей работы отобраны одно- и двух копийные по трансгену клеточные линии. На примере двух моноинсерционных однокопийных клеточных линий показано, что пролиферативная активность суспензионных культур в течение 6 пассажей субкультивирования не отличалась от контроля — нетрансгенной клеточной линии *A. thaliana*, что свидетельствовало о том, что инсерции трансгена в этих линиях не попали в районы расположения функционально важных генов *A. thaliana*. Все 22 исследуемые моноклональные клеточные линии были охарактеризованы по транскрипционной активности *gfp*-гена, а также по накоплению GFP-белка.

Анализ числа копий *gfp*-гена и его сопоставление с данными по уровню экспрессии и накоплению рекомбинантного белка не выявили каких-либо закономерностей. По результатам анализа нуклеотидного состава районов растительной ДНК, прилежащих к инсерциям *gfp*-гена, для отдельных клеточных линий идентифицированы районы встраивания трансгенов в геномную ДНК.

В целом изменчивость по уровню экспрессии и накоплению рекомбинантного белка, вероятно, отражает особенности случайного характера распределения инсерций Т-ДНК в растительном геноме.

Variability in the *gfp*-gene expression in the monoclonal cell lines of *Arabidopsis thaliana*

**Marenkova T. V.¹, Sidorchuk Yu. V.¹, Nosov A. V.², Fomenkov A. A.²,
Zagorskaya A. A.¹, Mursalimov S. R.¹, Kuznetsov V. V.¹, Deineko E. V.¹**

¹ Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, 10 Academician Lavrentiev ave., 630090, Novosibirsk, Russian Federation, fax: +7(383)333-12-78, tel: +7(383)363-49-80, e-mail: sidorch@bionet.nsc.ru

² K. A. Timiryazev Institute of Plant Physiology Russian Academy of Sciences, 35 Botanicheskaya st., 127276, Moscow, Russian Federation, fax: +7(499)678-54-20, tel: +7(499)678-54-00

.....

Suspension cultures of plant cells are promising expression system for the production of recombinant proteins, including pharmaceutically valuable proteins. However, there are still many unresolved problems in this field, the most important of which is the insufficient yield of the recombinant proteins. One approach to solve this problem, under the random nature of the transgenes integration into the plant genome, is to select the most “favorable” events, characterized by a high yield of the recombinant proteins.

22 monoclonal *A. thaliana* cell lines with the random insertions into the genome of the *gfp*-gene under the control of the CaMV35S promoter were obtained by agrobacterial transformation. Based on the cytological analysis the cell lines were divided into 4 groups on the intensity of GFP fluorescence and the morphology of cellular aggregates. The first group included the cell lines with aggregates consisting of small rounded cells and high fluorescence intensity. The second group combined the cell lines with aggregates consisting of elongated cells and average fluorescence intensity. The third group was represented by cell lines with low fluorescence intensity and the fourth group consist of cell lines with the complete absence of fluorescence.

The number of *gfp*-gene insertions into the plant genome was estimated by RT-PCR. The transgenic cell lines with one or two insertions per genome were selected for further work. Using two monoinsertional single-copy cell lines as the example, it was shown that the proliferative activity of the suspension cultures during 6 subculture passages did not differ from the control represented by non-transgenic *A. thaliana* cell line. This indicated that the transgene insertion in the above-mentioned lines did not affect the sites of functionally important genes of *A. thaliana*. All 22 monoclonal cell lines examined were characterized by the transcription activity of the *gfp*-gene, as well as the accumulation of the GFP protein.

Comparison of the number of inserts with the level of transgene expression and the recombinant protein accumulation did not reveal any patterns. An analysis of the nucleotide composition of plant DNA regions adjacent to insertions of the *gfp*-gene made it possible to identify the regions of transgenes incorporation into genomic DNA for several cell lines.

In general, the variability in expression level and in the accumulation of recombinant protein reflects probably the random nature of T-DNA distribution in the plant genome.

Сравнительная оценка состава биологически активных соединений и антирадикальной активности трансгенных растений *Ruta graveolens* L.

Матвеева Н. А.¹, Шутова А. Г.², Шиш С. Н.², Дробот Е. А.¹,
Ратушняк Я. И.¹, Дуплий В. П.¹, Шабуня П. С.³, Бриндза Я.⁴

¹ Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины

² Центральный ботанический сад НАН Беларуси, ул. Сурганова, 2 в, Минск, 220012, Беларусь,
e-mail: anna_shutova@mail.ru, +375(17)284-14-64

³ Институт биоорганической химии НАН Беларуси

⁴ Словацкий сельскохозяйственный университет в Нитре, Словакия

Проведена сравнительная оценка состава биологически активных соединений и антирадикальной активности (АРА) в культуре «бородатых» корней и культивируемых *in vitro* и в полевых условиях растениях *Ruta graveolens*.

Биологически активные вещества руты душистой извлекали двукратной экстракцией 96 % этанолом, с последующим гидролизом части экстракта 2М соляной кислотой. Содержание биологически активных веществ в экстрактах определяли методом ВЭЖХ на хроматографе Agilent 1200 с диодно-матричным и масс-селективным детектором.

Обнаружено присутствие псоралена и ксантотоксина как в трансформированных корнях и листьях культивируемых *in vitro* трансгенных растений, так и в растениях, выращенных на опытном участке. Также во всех исследованных образцах руты присутствовал бергаптен. Отличительной особенностью интактных растений руты являлось высокое содержание рутина. При этом экстракты «бородатых» корней и растений *in vitro* характеризовались его следовым количеством. Все изученные линии содержали гексозиды рутаретина, присутствие которых помимо характерных масс-спектров подтверждал тот факт, что в образцах после кислотного гидролиза значительно возросло содержание свободного рутаретина. Также кислотный гидролиз приводил к исчезновению на хроматограммах пиков, относящихся к рутину. Спиртовой экстракт из «бородатых» корней руты отличался присутствием рутакридона, характерного для корней *R. graveolens*. Также на хроматограммах для экстракта «бородатых» корней было отмечено увеличение размеров пика вещества с m/z 247⁺, предположительно изопимпинеллина. В экстрактах интактных растений и растений *in vitro* это вещество обнаруживалось в следовых количествах.

Определение АРА экстрактов руты производилось в модельной системе с катион-радикалами АБТС. АРА спиртовых экстрактов, полученных из трансформированных корней и листьев растений руты, выращенных *in vitro*, была приблизительно одинаковой и составляла спустя 60 с после начала реакции 0,86–0,10 и спустя 280 с — 0,11 ммоль тролокс/г.

Анализ восстановительной активности (по восстановлению Fe³⁺ до Fe²⁺) экстрактов из контрольных растений, «бородатых» корней и трансгенных растений, полученных путем регенерации из «бородатых» корней, выявил значительное снижение активности в экстрактах из трансгенных образцов (как корней, так и растений) по сравнению с контролем. Так, активность экстрактов из трансгенных растений и «бородатых» корней была соответственно в 1,4 и 1,6 раза ниже, чем экстрактов из контрольных растений.

Таким образом, трансформация привела к изменениям количественного состава флавоноидов, в частности, к уменьшению количества рутина, характерного для интактных растений руты. Результатом трансформации стало также снижение восстановительной активности экстрактов.

В работе представлены результаты исследований, выполненных при поддержке БРФФИ, стипендиальной программы SAIA (Словацкая Республика) при участии исследователей международного общества AgroBioNet и как часть программы «Agricultural biodiversity to improve nutrition, health and quality of life» проекта ITEBIO-ITMS 26220220115 «Support of technologies innovation for special bio-food products for human healthy nutrition».

Comparative study of biologically active compounds accumulation and antiradical activity of *Ruta graveolens* L. transgenic plants

Matvieieva N. A.¹, Shutava H. G.², Shysh S. N.², Drobot K. A.¹,
Ratushnyak Ya. I.², Duplij V. P.¹, Shabunya P. S.³, Bindza J.⁴

¹ Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine

² Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, 2v Surganova st., 220012, Minsk, Republic of Belarus, tel.: +375(17)284-14-64, e-mail: anna_shutova@mail.ru,

³ Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus

⁴ Slovak Agricultural University in Nitra, Slovak Republic

The comparative assessment of biologically active compounds composition and the antiradical activity of *in vitro* cultivated plants, “hairy” roots and field-grown *Ruta graveolens* plants was carried out.

The biologically active substances of *Ruta graveolens* were extracted with 96% ethanol. Portion of extract was hydrolyzed in the presence of 2M hydrochloric acid. The HPLC analysis of *Ruta graveolens* extracts was carried out on Agilent 1200 chromatograph with diode-array and mass-selective detectors.

The presence of psoralen, xanthotoxin in both the transformed roots and leaves of *in vitro* cultivated transgenic plants, and in plants grown on the experimental field was observed. Bergapten was also detected in all studied samples of *Ruta graveolens*. A high content of rutin was distinctive feature of intact plants. The extracts of “hairy” roots and *in vitro* plants were characterized by its trace amount. All the lines contained hexosides of rutaretin, the presence of which, besides the characteristic mass-spectra, was confirmed by the fact that in the samples after acid hydrolysis the content of free rutaretin increased significantly. Also acid hydrolysis led to the disappearance of peaks related to rutin on the chromatograms. The ethanol extract from “hairy” roots differed from others by the presence of rutacridone, which is one of the characteristic substances for *R. graveolens* roots. Also on the chromatograms of the “hairy” roots extract there was an increased peak with m/z 247⁺ that presumably belongs to isopimpinelline. This substance was found in trace amounts in extracts from intact and *in vitro* plants.

The determination of the antiradical activity (ARA) of *Ruta graveolens* extracts was carried out in the model system with the cation-radicals of ABTS. The ARA of the alcohol extracts obtained from the transformed roots and leaves of *Ruta graveolens* plants grown *in vitro* was approximately the same and was 0.86–0.10 and 0.11 mmol of trolox/g after 60 and 280 s of the reaction.

Analysis of the reduction activity (the reduction of Fe³⁺ to Fe²⁺) of extracts from control plants, “hairy” roots and transgenic plants obtained by regeneration from “hairy” roots, revealed significant decrease in the activity of extracts from transgenic samples (both roots and plants) as compared with control. In particular, the activity of extracts from transgenic plants and “hairy” roots was 1.4 and 1.6 times lower, respectively, than in extracts from control plants.

Thus, the transformation led to significant changes in the quantitative composition of the flavonoids, in particular, to decreased amount of flavonoid rutin, which is typical for the intact plants. Decreased reduction activity of extracts was also observed as the result of the transformation.

The study was carried out with the support of the BRFFR (Republic of Belarus), the scholarship program SAIA (Slovak Republic) with the participation of the researchers from the International Society AgroBioNet and as a part of the “ITEBIO-ITMS” project 26220220115 “Support of technologies innovation for special bio-food products for human healthy nutrition”.

Получение *in vitro* культур жимолости синей сортов 'Лазурная', 'Аврора', 'Камчадалка', 'Ленинградский великан'

Махонина О. И., Ластенко И. И., Черноусова И. А., Балковская А. В., Филипеня В. Л.

Центральный ботанический сад НАН Беларуси, ул. Сурганова, 2 в, Минск, 220012, Беларусь, тел./факс: +375(17)284-14-84, e-mail: olga.mahonina.67@gmail.com

В настоящее время для расширения разнообразия и качества продуктов питания все чаще используются малораспространенные ягодные культуры. Среди них особое место занимает жимолость синяя, главное достоинство которой — раннее созревание и богатый биохимический состав плодов. Ягоды жимолости могут пополнить ассортимент витаминной продукции весной и ранним летом. Успешная интродукция новых форм растений и их последующее распространение определяется наличием эффективного способа размножения. Перспективным методом размножения жимолости синей является размножение *in vitro*.

Нами были проведены работы по получению асептической культуры жимолости синей сортов 'Лазурная', 'Аврора', 'Камчадалка' и 'Ленинградский великан'. В качестве эксплантов использовали черенки молодых активно растущих побегов длиной 1,5–2,0 см с 1 или 2 пазушными почками. Стерилизацию растительного материала проводили в 10 %-м растворе гипохлорита кальция. После стерилизации экспланты помещали на питательную среду МС, содержащую БАП в концентрации 0,5 мг/л, 1,0 мг/л, 1,5 мг/л или 2,0 мг/л.

В результате эксперимента установлено, что эффективность морфогенеза у жимолости синей на этапе получения асептической культуры зависит от генотипа. Так оптимальной для инициации асептической культуры жимолости сорта 'Аврора' является среда с добавлением 1,0 мг/л БАП (коэффициент размножения — 3,0; высота побегов — 2,5 см). У сортов 'Камчадалка', 'Ленинградский великан' и 'Лазурная' максимальные значения исследуемых показателей отмечены на среде, содержащей БАП в концентрации 2,0 мг/л. На этой среде коэффициент размножения для сорта 'Камчадалка' составил 3,0, 'Ленинградский великан' — 3,4, 'Лазурная' — 7,2 при длине побегов 3,2 см, 4,5 см и 6,7 см, соответственно. На побегах сортов 'Лазурная' и 'Ленинградский великан' активизировались как апикальные, так и пазушные почки, сортов 'Камчадалка' и 'Аврора', главным образом, пазушные.

На этапе стабилизации проведено сравнение эффективности регенерации побегов в зависимости от концентрации БАП (0,5 и 1,0 мг/л) в питательной среде. При культивировании эксплантов на среде с более высокой концентрацией регулятора роста у сорта 'Лазурная' отмечено удлинение междоузлий до 2 см, что, привело к значительному увеличению длины побегов (3,8 см и 7,7 см, соответственно). Коэффициент размножения составил 4,6 и 6,8, соответственно. У сортов 'Камчадалка' и 'Аврора' на обоих тестируемых вариантах сред коэффициент размножения был одинаковым (3,0).

В результате проведенных исследований оптимизированы условия получения асептических культур 4-х сортов жимолости синей, выявлены особенности культивирования эксплантов жимолости на этапах инициации и стабилизации в зависимости от гормонального состава питательных сред и генотипа растений, получены асептические культуры с высоким морфогенетическим потенциалом.

Initiation of blue honeysuckle *in vitro* cultures of 'Lazurnaya', 'Aurora', 'Kamchadalka', 'Leningrad Giant' cultivars

Mahonina O. I., Lastenko I. I., Chernousova I. A., Balkovskaya A. V., Filipenia V. L.

Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, 2v Surganova st., 220012, Minsk, Republic of Belarus, tel./fax: +375(17)284-14-84, e-mail: olga.mahonina.67@gmail.com

At present to expand the variety and quality of food products, nontraditional berry crops are used more widely. Among them honeysuckle have a special place, characterized by early ripening and rich biochemical composition of fruits. Honeysuckle berries can add the range of vitamin products during spring and early summer. Successful introduction of new plants and their following distribution is determined by the existence of an effective reproduction method. A perspective method of blue honeysuckle reproduction is *in vitro* propagation.

We have conducted works on blue honeysuckle (for cv. 'Lazurnaya', 'Aurora', 'Kamchadalka' and the 'Leningrad Giant') aseptic culture initiation. The young active growing shoots 1.5–2.0 cm long with one or two axillary buds were used as explants. We had sterilized the plant material in the 10% calcium hypochlorite solution. After sterilization the explants were placed on MS medium containing BA at a concentration of 0.5 mg/l, 1.0 mg/l, 1.5 mg/l, or 2.0 mg/l.

As a result of the experiment it was determined that the efficiency of honeysuckle morphogenesis at the stage of aseptic culture development depends on the genotype. Thus the optimal for the initiation of the blue honeysuckle aseptic culture of 'Aurora' is the medium with the adding of 1.0 mg/l BA (multiplication rate — 3.0; length of shoots — 2.5 cm). The maximum values of the studied characteristics of 'Kamchadalka', 'Leningrad Giant' and 'Lazurnaya' cv. are noted on the medium containing BA at the concentration of 2.0 mg/l. On this medium the multiplication rate for the 'Kamchadalka' cultivar was 3.0, for 'Leningrad Giant' — 3.4, for 'Lazurnaya' — 7.2, while the length of shoots was 3.2 cm, 4.5 cm and 6.7 cm respectively. Both apical and axillary buds were actively initiated on the shoots of the cv. 'Lazurnaya' and 'Leningrad Giant', while 'Kamchadalka' and 'Aurora' shoots were characterized only axillary buds were active.

Comparison of the shoot regeneration efficiency depending on BA concentration (0.5 and 1.0 mg/l) in the nutrient medium at the stage of stabilization was performed. Increasing of the length of the internode up to 2 cm was stated at cultivating explants on the medium with higher concentration of the growth regulator for 'Lazurnaya', which contributed to increasing of total shoot length (3.8 cm and 7.7 cm, respectively). The multiplication rate was recorded as 4.6 and 6.8, respectively. 'Kamchadalka' and 'Aurora' cultivars' multiplication rate was the same in the both tested media (3.0).

As a result of the studies the conditions for the obtaining aseptic cultures of blue honeysuckle 4 cultivars were optimized. The features of blue honeysuckle's explants cultivation at the stages of initiation and stabilization depending on the hormonal composition of nutrient media and plant genotype were stated, aseptic cultures with a high morphogenetic potential were obtained.

Использование вертикальной культуры корневых проростков *in vitro* для анализа воздействия стрессовых агентов и фитогормонов на рост и развитие корневой системы высших растений

Мацкевич В. С., Самохина В. В., Кузнецова Н. А., Войтехович М. А., Демидчик В. В.

Белорусский государственный университет, биологический факультет, кафедра клеточной биологии и биоинженерии растений, ул. Курчатова, 10, Минск, 220030, Беларусь, тел.: +375(17)209-59-12, факс: +375(17)209-58-08, e-mail: dzemidchyk@bsu.by

Введение. Рутинная высоко статистическая регистрация изменений роста корней в ответ на регуляторные и токсичные агенты являются одной из проблем для экспериментальной растительной биологии. Классические тесты на прорастание, когда семена высаживают на среде с анализируемым веществом, позволяют измерять модификацию роста корней, но они включают эффект на ранних стадиях развития корней, которые более восприимчивы к стрессам. Поэтому испытания на прорастание не являются адекватными для определения влияния тестируемой обработки на удлинение корня. Существуют также проблемы в мониторинге роста корней и получения высококачественных изображений из-за низкой прозрачности агаровых сред. В данной работе мы предлагаем методы оценки роста корней с использованием техники замены среды, при которой корни не подвергаются дополнительному механическому стрессу.

Материалы и методы исследования. Стерильная культура *in vitro* целых растений *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. выращивались вертикально в течении 4 сут на среде, содержащей питательную среду Мурасиге-Скуга, сахарозу и фитагель. При этом использовался небольшой объем среды (20 мл на чашку Петри диаметром 10 см). На 5 сут 2/3 среды ниже кончиков корней вырезалась в стерильных условиях и заменялась на слегка охлажденную среду, содержащую тестируемый агент. Ежедневно в течении 6 сут регистрировался прирост корней при помощи линейки, приложения ImageJ или специализированного программного обеспечения, разработанного в нашей лаборатории.

Результаты и их обсуждение. С использованием техники ростовых тестов с заменой среды был протестирован широкий диапазон токсических и регуляторных агентов, а также охарактеризованы реакции различных природных экотипов и трансгенных линий арабидопсиса. Данные результаты имели существенные отличия от данных, полученных с использованием тестов на прорастание. Растения были значительно менее чувствительны к NaCl, Ni²⁺, Al³⁺, аскорбату, H₂O₂, окислительно-му и другим абиотическим стрессам. Например, концентрация 200 ммоль/л NaCl была летальной в тестах на прорастание, в то время как в тестах с заменой среды она вызывала снижение скорости роста корней лишь на 10-15%. Мы также исследовали реакции некоторых важных мутантов, таких как *gork1-1*, лишенных наружу-выпрямляющего K⁺-канала GORK. Техника замены среды позволила вывести толерантность *gork1-1* к NaCl и окислительному стрессу, что ранее не было установлено. Интересные данные были получены с L-аскорбиновой кислотой. Низкие концентрации аскорбата (10–100 мкмоль/л) стимулировали рост корней, в то время как более высокие (0,3–3 ммоль/л) ингибировали рост основного корня, а также уменьшали диаметр корня и длину зоны роста растяжением. Также техника замены среды может быть использована для скрининга эффекта тяжелых металлов и алюминия. Большая статистика и обширные реплики были доступны при компьютерном анализе изображений. Таким образом, разработанная техника ростовых тестов с заменой среды продемонстрировала высокую эффективность для анализа роста корней и других параметров. Предварительные данные показывают, что данная система может быть использована для изучения эффектов основных стресс-факторов, таких как засоление, высокие уровни Al³⁺, тяжелых металлов Ni²⁺ и Cu²⁺, а также потенциально сигнальных агентов (L-аскорбиновой кислоты).

The use of the vertical root *in vitro* culture in analysis of the effect of stress agents and phytohormones on the growth and development of the root system of higher plants

Mackievic V. S., Samokhina V. V., Kuzniatsova N. A., Vaitsiakhovich M. A., Demidchik V. V.

Belarusian State University, Biological Faculty, Department of Plant Cell Biology and Bioengineering, 10 Kurcatava st., 220030, Minsk, Republic of Belarus, tel.: +375 (17) 209-59-12, fax: +375 (17) 209-58-08, e-mail: dzemidchyk@bsu.by

.....

Introduction. Routine high-statistics measurements of root growth changes in response to regulatory and toxic agents is one of the major challenges for the experimental plant biology. Germination tests, when seeds are planted on medium with tested agent, allow to measure root growth modification but they include effect on early stages of root development, which are more susceptible to stresses. Therefore, germination tests are not adequate for determination of effects on root elongation. Here, we propose techniques for root growth assessment using medium exchange, when roots are not disturbed.

Materials and methods. The *in vitro* culture of *Arabidopsis thaliana* was grown vertically during four days on a surface of sterilized gel medium, which contained Murashige and Skoog (MS) medium, sucrose and Phytigel. Then 2/3 of the medium below the level of root tips was cut out and replaced with a medium containing regulatory or toxic agents. Daily increment of root length was measured during 6 days by ruler (human), ImageJ and software developed in the lab using computer vision algorithms, object tracking and cauterization.

Results and discussion. Using medium exchange technique, we tested wide range of toxic and regulatory agents and characterized reactions of various *Arabidopsis* ecotypes and transgenic lines. Medium exchange analyses were compared with germination tests. This showed significant difference in results. Plants were much less susceptible to NaCl, Ni²⁺, Al³⁺, ascorbate, H₂O₂, oxidative and other abiotic stresses. For example, 200 mM NaCl was lethal in germination tests while in medium exchange experiments it slowed down root growth only by 10–15%. We have also tested some important mutants, such as *gork1-1*, lacking K⁺ efflux channels. Using medium exchange allowed to determine *gork1-1* tolerance to NaCl, H₂O₂, heavy metals and other stresses, which has not been reported previously. Higher statistics and extensive replicates were available with computer vision analysis that allowed to test effects of wider range of agents and concentrations.

Коллекция *in vitro* как инструмент для получения посадочного материала и создания плантационных культур лиственных древесных растений

Машкина О. С.^{1,2}, Табацкая Т. М.²

¹ Воронежский государственный университет, Университетская пл., 1, Воронеж, 394018, Россия, тел.: +7(473)220-88-76, e-mail: mashkinaos@mail.ru

² Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии, ул. Ломоносова, д. 105, Воронеж, 394087, Россия, тел.: +7(473)253-94-81, e-mail: ilgis@lesgen.vrn.ru

.....

Создание коллекции микрорастений в культуре *in vitro* — современный подход сохранения *ex situ* представителей ценного генофонда лесных древесных растений, а также их массового тиражирования *in vitro* для выращивания посадочного материала и создания плантационных культур. Одна из первых в России коллекция лиственных древесных растений была сформирована нами в 1991 г. Она ежегодно пополняется новыми экономически ценными и уникальными клонами, гибридами, полиплоидами и сортами березы, тополя, осины и ивы. Большинство из них трудно размножается обычным черенкованием. Среди них продуктивные, с хорошим качеством древесины, устойчивые диплоидные и триплоидные гибриды тополя белого (*Populus alba* L.) и тополя сереющего (*Populus canescence* Sm.); клоны продуктивных и гнилеустойчивых биотипов осины (*P. tremula* L.); продуктивных и засухоустойчивых форм березы повислой (*Betula pendula* L.) и березы пушистой (*B. pubescens* Ehrh.); форм карельской березы (*B. pendula* Roth var. *carelica* Merkl.) с узорчатой текстурой древесины; декоративных рассеченнолистных форм березы далекарлийской (*B. pendula* «dalekarlica» (L. f.); быстрорастущих биотипов разных видов ивы (*Salix spp.*), перспективных для создания биоэнергетических плантаций. По состоянию на январь 2018 г. в составе коллекции находится 60 клонов микрорастений лиственных древесных (18 видов, 3 рода, 2 семейства), которые поддерживаются нами на протяжении 2–26 лет путем редкого субкультивирования (один рез в 5–6 месяцев) при обычных условиях климатического режима на питательных средах без гормонов (за исключением ивы). Подобная технология долгосрочного культивирования *in vitro* позволила уменьшить вероятность возникновения соматклональной изменчивости при сохранении высоких биотехнологических параметров, а также морфологических, генетических и селекционных особенностей клонов в условиях *in vitro* и *ex vitro* (при высадке микрорастений в почву). На основе коллекции *in vitro* выращен посадочный материал (свыше 1200 растений) и созданы опытные плантационные культуры карельской березы (5 клонов) и березы повислой (2 клона); тополя белого и тополя сереющего (6 клонов); осины (3 клона), возраст которых в настоящее время 17–26 лет. Полевые испытания (теплица, питомник) клонов после длительного (от года до 25 лет) хранения *in vitro* демонстрируют их высокую приживаемость и сохранность (75–97%), сохранение специфичных для их исходных генотипов особенностей роста и относительную внутрикловую однородность, а также идентичность исходным экземплярам (по особенностям роста, габитусу, качеству древесины, пloidности и молекулярно-генетическим особенностям). Это создает основу использования коллекции *in vitro* ценных генотипов не только для их сохранения *ex situ*, но и для выращивания посадочного материала и создания плантационных культур целевого назначения.

In vitro collection as a tool for the production of planting stock and creation of plantations of deciduous woody plants

Mashkina O. S.^{1,2}, Tabatskaya T. M.²

¹ Voronezh State University, 1 Universitetskaya sq., 394018, Voronezh, Russian Federation, tel.: +7(473)2208876, e-mail: mashkinaos@mail.ru

² All-Russian Research Institute of Forest Genetics, Breeding and Biotechnology, Voronezh, 394087, Lomonosov st., 105; +7(473)253-94-36, e-mail: ilgis@lesgen.vrn.ru

.....

The creation of *in vitro* collection is a modern approach to *ex vitro* conservation of valuable gene pool of forest tree plants and their mass clonal micropropagation *in vitro* for growing planting stock for forest plantations. One of the first collection of deciduous woody plants in Russia was formed by us in 1991. It is annually supplemented with new economically valuable and unique clones, hybrids, polyploids and varieties of birch, poplar, aspen and willow. Most of them are difficult to reproduce with the cuttings *in vivo*. Among them are fast-growing, with good quality of wood, stable diploid and triploid hybrids of poplar white (*Populus alba* L.) and gray (*Populus canescence* Sm.); clones of productive and resistant to rotting biotypes of aspen (*P. tremula* L.); productive and drought resistant birch forms (*Betula pendula* L. and *B. pubescens* Ehrh.); forms of Karelian birch (*B. pendula* Roth var. *carelica* Merkl.) with a patterned wood texture; ornamental birch plants with deeply serrated leaves (*B. pendula* "dalekarlica" (L. f.)); fast-growing biotypes of various species of willow (*Salix* spp.), promising for the creation of bio-energetic plantations. As of January 2018, the collection contains 60 clones of microplants of deciduous wood (18 species, 3 genera, 2 families), which we maintain for 2–26 years by rare subcultivation (once in 5–6 months) under normal climatic conditions on hormone-free media (except for willow). Such technology of long-term *in vitro* storage of clones collection has made it possible to reduce the likelihood of occurrence of somaclonal variability and to preserve high biotechnological parameters, as well as morphological, genetic and breeding characteristics of clones *in vitro* and *ex vitro* (when planting into the soil). On the basis of the *in vitro* collection we have created the planting stock (over 1200 plants) and experimental plantations of Karelian birch (5 clones) and silver birch (2 clones); white and gray poplar (6 clones); aspen (3 clones), whose age is currently 17–26 years. Field trials (in the greenhouse and nursery garden) of clones after long-term *in vitro* storage (from 1 up to 25 years) demonstrate their high survival and preservation ability (75–97%), revealed their intraclonal homogeneity and their identity to original specimens (in growth features, habitus, quality of wood, ploidy, molecular features). This provides the basis for using a collection of *in vitro* valuable genotypes, not only for their *ex situ* conservation, but also for growing planting stock and creating tree plants for a specific purpose.

Анализ экстрактивных веществ из биотехнологического сырья *Iris sibirica* L., полученных в среде субкритической воды

Миронова С. О., Тихомирова Л. И.

Алтайский государственный университет, пр-т Ленина, 61, Барнаул, 656049, Россия,
факс: +7(385)266-76-26, тел.: +7(385)229-12-91, e-mail: stenyam@mail.ru

Использование экологически безопасных методов экстракции для получения физиологически активных субстанций из источников растительного происхождения — одно из приоритетных направлений современной химии. Замена токсичных органических растворителей на экологически чистые суб- и сверхкритические жидкости и флюиды, такие как CO₂ или вода, соответствует основным принципам и перспективным подходам к решению задач Зеленой химии.

Iris sibirica L. — перспективный вид лекарственных и декоративных многолетних растений, синтезирующих широкий спектр биологически активных веществ.

Целью данной работы являлось получение и изучение свойств экстрактов, извлеченных из растительного сырья *Iris sibirica* L. методами субкритической экстракции.

В качестве объектов исследования использовали растения-регенеранты, полученные и выращенные в гидропонике в Отделе биотехнологии Алтайского государственного университета, и интактные растения *I. sibirica*. Интактные 6-летние растения заготавливали в окрестностях г. Новоалтайска, Алтайского края в 2015 г.

Процедура извлечения биологически активных соединений в субкритических условиях состояла в следующем: навеску в 0,5 г сухого среднеизмельченного исходного сырья помещали в экстрактор (цилиндрический толстостенный сосуд из нержавеющей стали внутренним объемом 20 мл), в который добавляли 18 мл растворителя. Экстрактор герметично закрывали и устанавливали в сушильный шкаф с заданной температурой 250 °С (точность термостатирования ±1 °С) на 1 час. Затем экстрактор охлаждали до комнатной температуры в емкости с холодной проточной водой. Пробу экстракта фильтровали через складчатый бумажный фильтр (Ветрова и др., 2016). Рассчитывали содержание экстрактивных веществ в % на абсолютно сухой вес (а. в. с.) и проводили качественные реакции по рекомендациям Музычкиной и коллег (2011).

Содержание экстрактивных веществ в зависимости от содержания БАП в питательных средах имело следующие значения: при 1,0 мкМ БАП — 8,60 %, при 2,5 мкМ БАП — 10,12 %, при 5,0 мкМ БАП — 6,12 %, при 7,5 мкМ БАП — 6,04 %, при 10,0 мкМ БАП — 6,06 %. Максимальный выход экстрактивных веществ определяли в растительной биомассе растений-регенерантов *I. sibirica* при выращивании на средах с содержанием 2,5 мкМ БАП. Если в среды добавляли ауксина (1,0 мкМ НУК и 0.1 мкМ ИМК) содержание экстрактивных веществ резко снижалось в 2 раза. Нужно отметить, что в листьях растений, выращенных в почвенных условиях (интактных) экстрактивных веществ содержалось 6,94 % на а. в. с.

Мы рекомендуем для коммерческих целей использовать водный СКФ экстракт ириса сибирского, выращенного с добавлением 2,5 мкМ БАП.

При проведении качественных реакций получены следующие результаты.

В результате наших исследований в сырье ириса сибирского установлено наличие антраценовых производных, конденсированных и гидролизуемых дубильных веществ, кумаринов и других фенольных соединений, алкалоидов. Причем в субкритических условиях, по-видимому, происходит более полное извлечение (яркое окрашивание) конденсированных дубильных веществ. При этом следует отметить, что в субкритических условиях процесс экстракции идет в 3 раза быстрее.

Analysis of extractives from biotechnological raw materials of *Iris sibirica* L., obtained in a medium of subcritical water

Mironova S. O., Tikhomirova L. I.

Altai State University, 61 Lenin ave., 656049, Barnaul, Russian Federation,
fax: +7(385)266-76-26, tel.: +7(385)229-12-91, e-mail: stenyam@mail.ru

The use of ecologically safe extraction methods for obtaining physiologically active substances from sources of plant origin is one of the priority areas of modern chemistry. The replacement of toxic organic solvents with environmentally friendly sub- and supercritical fluids and fluids, such as CO₂ or water, is consistent with the basic principles and promising approaches to solving the problems of green chemistry.

Iris sibirica L. is a perspective view of medicinal and ornamental perennials that synthesize a wide range of biologically active substances.

The purpose of this work was to obtain and study the properties of extracts extracted from plant raw materials *Iris sibirica* L. by subcritical extraction methods.

As the objects of research, regenerating plants were used and grown in hydroponics in the Department of Biotechnology of the Altai State University, and intact plants *I. sibirica*. Intact 6-year-old plants were harvested in the vicinity of Novoaltaysk, Altai Territory in 2015.

The procedure for extracting biologically active compounds under subcritical conditions was as follows: a sample of 0.5 g of dry medium-sized feedstock was placed in an extractor (a cylindrical thick-walled stainless steel vessel with an internal volume of 20 ml) into which 18 ml of a solvent was added. The extractor was hermetically sealed and installed in an oven at a set temperature of 250°C (thermostat accuracy is ±1°C) for 1 hour. The extractor was then cooled to room temperature in a container with cold running water. The extract sample was filtered through a folded paper filter (Vetrova et al, 2016). The content of extractive substances in % was calculated for absolutely dry weight and qualitative reactions were carried out according to the recommendations of Muzychkina and colleagues (2011).

The content of extractives depending on the content of BAP in nutrient media had the following values: at 1.0 μM BAP — 8.60 %, at 2.5 μM BAP — 10.12 %, at 5.0 μM BAP — 6.12 %, at 7.5 μM BAP — 6.04 %, at 10.0 μM BAP — 6.06 %. The maximum yield of extractive substances was determined in the plant biomass of the regenerating plants *I. sibirica* when grown on media containing 2.5 μM BAP. If auxin (1.0 μM NAA and 0.1 μM IBA) was added to the medium, the extractive substances content sharply decreased by a factor of 2. It should be noted that in the leaves of plants grown in soil conditions (intact) extractive substances contained 6.94 %.

We recommend for commercial use the aqueous SCF extract of Siberian iris grown with the addition of 2.5 μM BAP.

In carrying out qualitative reactions, the following results were obtained.

As a result of our research, the availability of anthracene derivatives, condensed and hydrolyzed tannins, coumarins and other phenolic compounds, alkaloids has been established in raw Siberian iris. Moreover, in subcritical conditions, there appears to be a more complete extraction (bright staining) of condensed tannins. It should be noted that under subcritical conditions, the extraction process is 3 times faster.

Влияние фитогормонов на размножение голубики высокорослой (*Vaccinium corymbosum*) в культуре *in vitro*

Мохамед Г. Р. А.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, ул. Кремлевская, 18, Казань, 420008, Россия, тел.: +7(843)233-78-26, факс: +7(843)233-78-14, e-mail: gamil.rayan306@gmail.com

.....

В настоящее время получение массового количества однородного посадочного материала, сохраняющего свойства материнского растения, является одной из важных задач современного растениеводства. Для решения этих задач все большее распространение приобретает метод микроклонального размножения.

Целью настоящего исследования является разработка метода получения активно пролиферирующей культуры голубики высокорослой (*V. corymbosum*) в условиях *in vitro*.

Объектом для введения в культуру служила голубика высокорослая. Микрочеренкование побегов осуществляли путем разрезания стебля на фрагменты длиной 5–10 мм, с последующим пересаживанием на свежую питательную среду WPM. В качестве гормональных компонентов в питательные среды включали зеатин (Зе) в концентрациях: 0.0, 0.5, 1.0, 2.0 мг/л и индолил-3-масляную кислоту (ИМК) 0.0, 0.1, 0.2 мг/л. На всех этапах культивирования растения выращивали при 16-часовом фотопериоде и температуре воздуха $26 \pm 2^\circ\text{C}$.

При культивировании стеблевых эксплантов среда WPM, дополненная 1.0 мг/л Зе и 0.1 мг/л ИМК, оказалась самым эффективным вариантом для регенерации побегов, где процесс побегообразования составил 100%. Через восемь недель наблюдали максимальное количество пазушных побегов на эксплант (3,9 со средней длиной 3,22 см). В течение пяти пассажей было показано, что максимальное увеличение количества здоровых пазушных побегов наблюдается на четвертом пассаже. Среднее количество пазушных побегов на эксплант составило 5,5 со средней длиной 3,33 см. С пятого пассажа начинает появляться витрификация, которая, вероятно, вызвана дефицитом питательных микроэлементов, поскольку WPM не содержит кобальта и йода.

Таким образом, для эффективности регенерации *in vitro* растений голубики высокорослой (*V. corymbosum*) является среда WPM, дополненная 1.0 мг/л Зе и 0.1 мг/л ИМК в течение четырех пассажей.

Effect of plant growth regulators on micropropagation of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum*) *in vitro*

Mohamed G. R. A.

Kazan (Privolzhsky) Federal University, 18 Kremlevskaya st., 420008, Kazan, Russian Federation,
tel.: +7(843)233-78-26, fax: +7(843)233-78-14, e-mail: Gamil.rayan306@gmail.com

.....

In recent decades, to obtain mass production of homogenous plant materials and keeping the characteristics of mother plant (true to type) are important targets for crop production. *In vitro* micropropagation has been considered as an efficient tool for this purpose.

The aim of the present study the development of method for effective shoots proliferation of highbush blueberry *in vitro*.

The object for introducing of highbush blueberry into the culture. Axillary shoots cut into 5–10 mm long were subcultured on fresh WPM medium containing zeatin (Zi) was added at concentrations (0.0, 0.5, 1.0, 2.0 mg/l) and indolyl-3-butyric acid (IBA) was added at concentrations (0.0, 0.1, 0.2 mg/l). All cultures were kept in the growth room at 25±2°C under 16-hours photoperiod under cool white fluorescent tubes. WPM supplemented with 1.0 mg/l Zi in combination with 0.1 mg/l IBA was the most effective for shoot proliferation of highbush blueberry (*V. corymbosum* L.) *in vitro* after 8 weeks. With respect to the survival percent of explant and the percentage of explants forming growth, gave (100%). On the other hand, The highest mean number of formed shoots per explant (3.9 shoot/explant with mean length of axillary shoots per explant (3.22 cm). The mean number of formed shoots per explant gradually increased with each subculture. Meanwhile, shoot length decreased with subcultures up to the fifth subculture. But from the fifth subculture axillary shoots began to shows hyperhydricity. Fourth subculture gives the maximum multiplication rate with healthy axillary shoots of 5.5 shoot/explant with mean length of 3.33 cm/explant. Axillary shoots generated in the fifth subculture may be a deficiency of microelements, since WPM contains neither cobalt nor iodine.

Can be concluded that, WPM supplemented with 1.0 mg/l Zi in combination with 0.1 mg/l IBA was the most effective for efficiency of *in vitro* regeneration of highbush blueberry (*V. corymbosum* L.) during four subcultures (*Vaccinium corymbosum*).

Введение в культуру *in vitro* редкого вида *Fritillaria meleagris* L. (*Liliaceae*) из органов цветка

Мурасева Д. С., Кобозева Е. В., Новикова Т. И.

Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения РАН,
ул. Золотодолинская, 101, Новосибирск, 630090, Россия, факс: +7(383)334-44-33,
тел.: +7(383)330-41-01, e-mail: dsmuraseva@csbg.nsc.ru

Род *Fritillaria* L. (рябчик) насчитывает более 150 видов и является одним из крупнейших в семействе *Liliaceae*. На сегодняшний день существует большое количество высокодекоративных сортов и садовых форм рябчиков. Кроме того, экстракты луковиц рябчиков, известных в традиционной китайской медицине как «*Veimu*», используют для лечения кашля, снятия температуры, снижения уровня сахара в крови. Лекарственные и декоративные свойства рябчиков вызывают интерес исследователей к культуре *in vitro* представителей этого таксона. Большинство разработанных протоколов клонального размножения посвящено виду *Fritillaria meleagris* L. Для получения асептической культуры используют луковичные чешуи, зиготические зародыши, стебли и др. Выявлены разнообразные пути морфогенеза *in vitro*: органогенез, соматический эмбриогенез, каллусогенез. Однако проведенные исследования не исключают дальнейших поисков новых подходов к размножению *in vitro* рябчика шахматного. А учитывая, что *F. meleagris* занесен в Красную книгу РФ в статусе редкого вида, это открывает перспективы для сохранения *ex situ* представителей данного таксона.

В своем исследовании мы апробировали новый тип первичных эксплантов — флоральные органы. В многочисленных работах по регенерации из тканей цветка как древесных, так и травянистых растений авторы отмечают высокий морфогенный потенциал этих эксплантов. Впервые протокол с использованием органов цветка для рябчиков был предложен для *F. imperialis*: авторы индуцировали регенерацию из тканей листочков околоцветника. Нами для индукции регенерации помимо листочков околоцветника использовались тычинки и пестики. Инициацию процессов морфогенеза *in vitro* проводили на средах В5, дополненных цитокининами и ауксинами (БАП, НУК, ИУК) в концентрации от 0,1 до 3,2 мкМ. На этапе собственно размножения использовали питательные среды по прописи В5 и BDS, содержащие экзогенные цитокинины и ауксины. Культивирование растительного материала на этапах инициации культуры *in vitro* и регенерации побегов проводили при интенсивности освещения 3,5–4,0 клк в условиях 16 ч фотопериода при 23±2°C.

В ходе эксперимента установлено, что использование безгормональной среды В5 не эффективно. Однако внесение в состав среды БАП, НУК, ИУК стимулировало активную регенерацию побегов. Независимо от типа флорального экспланта, необходимым условием для индукции морфогенеза являлось присутствие ауксинов, при этом высокие концентрации БАП угнетали побегообразование. Установлено, что морфогенетический потенциал флоральных эксплантов *F. meleagris* возрастал в ряду: тычинки — пестик — листочки околоцветника.

Таким образом, выявлена эффективность использования флоральных органов — листочков околоцветника, тычинок, пестиков как первичных эксплантов для индукции морфогенеза *in vitro* редкого вида *F. meleagris*.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00164\18.

In vitro culture initiation from floral explants of *Fritillaria meleagris* L. (*Liliaceae*), a rare species

Muraseva D. S., Kobozeva E. V., Novikova T. I.

Central Siberian Botanical Garden, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
101 Zolotodolinskaya st., 630090, Novosibirsk, Russian Federation, fax: +7(383)334-44-33, tel.:
+7(383)330-41-01, e-mail: dsmuraseva@csbg.nsc.ru

The genus *Fritillaria* L. comprises more than 150 species and is the largest one in *Liliaceae*. Nowadays, there is a great number of the ornamental cultivars and garden forms of fritillaries. Moreover, the fritillaries bulb extracts, known in the traditional Chinese medicine as “Beimu”, are used as antitussive, antipyretic drugs and to lower blood sugar levels. The medicinal and ornamental properties of fritillaries resulted in the development of researchers’ interest to *in vitro* culture of representatives of the taxon. Most of the clonal micropropagation protocols developed are devoted to *Fritillaria meleagris* L. To obtain an aseptic culture, bulbous scales, zygotic embryos, stems, and other explants are used. Various ways of *in vitro* morphogenesis have been identified: organogenesis, somatic embryogenesis and callusogenesis. However, the conducted studies do not exclude further search for new approaches to *in vitro* propagation of this plant. Considering that *F. meleagris* is listed in the Red Data Book of the Russian Federation in the status of a rare species, it opens up prospects for *ex situ* conservation of the representatives of this taxon.

We tested a new type of primary explants — floral organs. In numerous works on regeneration from flower tissues of both woody and herbaceous plants, the authors note the high morphogenic potential of these explants. For the first time a protocol using flower organs for fritillaries was proposed for *F. imperialis*: researchers induced the regeneration from the tissues of tepals. To induce the regeneration stamens and pestles besides tepals were used. Initiation of *in vitro* morphogenesis processes was carried out on B5 media, supplemented with cytokinins and auxins (BAP, NAA, IAA) in a concentration of 0.1 to 3.2 μM . At the multiplication stage, B5 and BDS nutrient media containing exogenous cytokinins and auxins were applied. The cultivation of plant material during *in vitro* culture initiation and shoot regeneration was carried out under a light intensity of 3500–4000 lux and 16 hours photoperiod at $23\pm 2^\circ\text{C}$.

In the course of the experiment, it was established that the use of the hormone-free B5 medium was not effective. However, the addition of BAP, NAA, IAA stimulated the active *in vitro* shoot regeneration. Regardless of the type of floral explant, the presence of auxins was a prerequisite for the induction of morphogenesis, while high concentrations of BAP suppressed shoot formation. It was found that the morphogenetic potential of *F. meleagris* floral explants increased in a series: stamen — pestle — tepal.

Thus, the effectiveness of the use of floral organs — tepals, stamens, pestles as primary explants for the induction of *in vitro* morphogenesis of rare species *F. meleagris* was revealed.

The reported study was funded by RFBR according to research project No. 18-34-00164\18.

Полиненасыщенные жирные кислоты гаметофитов *Matteuccia struthiopteris*, выращенных в условиях *in vitro*

Некрасов Э. В.¹, Шелихан Л. А.¹, Светашев В. И.²

¹ Амурский филиал Ботанического сада-института Дальневосточного отделения Российской академии наук, Игнатьевское ш., 2-й км, Благовещенск, 675000, Россия, факс: +7(416)220-96-00, тел.: +7(416)220-95-09, e-mail: ed_nekrasov@mail.ru

² Национальный научный центр морской биологии Дальневосточного отделения Российской академии наук, ул. Пальчевского, 17, Владивосток, 690041, Россия, факс: +7(423)231-09-00, тел.: +7(423)231-73-39, e-mail: vsvetashev@mail.ru

Папоротники являются продуцентами арахидоновой (20:4 n-6, АК) и эйкозапентаеновой (20:5 n-3, ЭПК) жирных кислот, обладающих биологической активностью в организме человека. Исследования АК и ЭПК в папоротниках, за единичным исключением, ограничивалось спорофитами. Гаметофиты папоротников проще культивировать *in vitro* по сравнению со спорофитами, поэтому они могли бы стать удобной моделью для изучения метаболизма этих жирных кислот, а также исходным материалом для получения препаратов АК и ЭПК. Целью этой работы было определение содержания АК и ЭПК в гаметофитах съедобного папоротника *Matteuccia struthiopteris*, выращенных в условиях *in vitro*, по сравнению с молодыми вайями его спорофитов.

Гаметофиты *Matteuccia struthiopteris* (L.) Tod. получали из спор, собранных в естественных популяциях. Для экстракции липидов фрагменты талломов гаметофитов культивировали на питательной среде МС с добавлением витаминов МС, 2% сахарозы, 0,8% агара, без добавления регуляторов роста растений, при 16-часовом фотопериоде в течение 75 суток. Молодые растущие вайи папоротника в стадии спорофита собирали с растений, выращенных в открытом грунте. Перед экстракцией липидов растительный материал кипятили в воде 3 мин. Общие липиды экстрагировали методом Bligh и Dyer. Липиды фракционировали методом твердофазной экстракции на силикагеле. Жирные кислоты (ЖК) анализировали в виде метиловых эфиров методом газо-жидкостной хроматографии.

Выход общих липидов составил 5% (вес/сухой вес) у гаметофитов и 11,7% у спорофитов. Идентифицировали 31 жирную кислоту, и по их составу ткани гаметофитов не отличались от вай спорофитов. Главными ЖК были 16:0 (21,0/23,6 — здесь и далее спорофит/гаметофит, % от суммы ЖК), 18:3n-3 (25,0/22,1), 18:2n-6 (14,1/16,8), 18:1n-9 (7,8/7,3) и АК (5,0/8,6). В вайях существенную долю составляли также 16:3n-3 (4,4%) и ЭПК (3,0%), а в гаметофитах эти кислоты были минорными (0,9 и 0,6%, соответственно). Другие ЖК не превышали 2% от суммы. За исключением некоторых минорных компонентов, распределение ЖК по фракциям было сходным между спорофитами и гаметофитами. Фракции, обогащенные фосфолипидами (элюирование метанолом и смесью хлороформ — метанол — вода, 3:5:2, по об.), содержали основную часть 16:0 (49,6/60,1% от суммы во всех фракциях), 18:2n-6 (65,8/53,0), АК (73,5/71,9), ЭПК (61,5/55,8), t-16:1n-13 (87,6/87,6), а также потенциальных предшественников АК — 18:3n-6 (70,8/52,0) и ЭПК — 20:4n-3 (100/100). Фракции, содержащие гликолипиды (элюирование ацетоном), были обогащены 18:3n-3 (90,1/77,2), 18:1n-9 (48,9/51,1), 16:3n-3 (99,1/100), а также включали существенные доли 16:0 (39,6/30,6), 18:2n-6 (22,6/38,9), ЭПК (28,8/44,2) и АК (17,5/17,9). Фракции неполярных липидов (элюирование хлороформом) спорофитов и гаметофитов содержали все главные ЖК в диапазоне от 2,7 (18:3n-3у спорофита) до 11,6% (18:2n-6у спорофита) от суммы во всех фракциях. Эти фракции содержали АК (9,0/10,2), а ЭПК только у спорофита (9,7/0).

Таким образом, гаметофиты *M. struthiopteris*, выращенные в условиях *in vitro*, являются перспективной моделью для изучения биосинтеза АК и ЭПК, а благодаря высокому уровню АК могут быть источником фосфолипидов, обогащенных этой кислотой.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы «Дальний Восток» 2018–2020 гг. (№ 18-3-019).

Polyunsaturated fatty acids of gametophytes of *Matteuccia struthiopteris* cultivated *in vitro*

Nekrasov E. V.¹, Shelikhan L. A.¹, Svetashev V. I.²

¹ Amur Branch of Botanical Garden-Institute of the Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Ignatyevskoe Rd. 2 km, 675000, Blagoveshchensk, Russian Federation, fax: +7(416)220-96-00, tel.: +7(416)220-95-09, e-mail: ed_nekrasov@mail.ru

² National Scientific Center of Marine Biology of the Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, 17 Palchevskogo st., 690041, Vladivostok, Russian Federation, fax: +7(423)231-09-00, tel.: +7(423)231-73-39, e-mail: vsvetashev@mail.ru

.....

Ferns produce arachidonic (20:4 n-6, ARA) and eicosapentaenoic (20:5 n-3, EPA) fatty acids which have biological effects in the human body. With one exception, the researches on ARA and EPA in ferns were confined by sporophytes. However, fern gametophytes are easier to cultivate *in vitro* as compared to their sporophytes, thus gametophytes might be a convenient model for studies on metabolism of these fatty acids and also serve as a starting material for preparations of ARA and EPA. The goal of this study was determination of ARA and EPA content in gametophytes of the edible fern *Matteuccia struthiopteris*, grown *in vitro*, as compared to young fronds of its sporophytes.

Gametophytes of *Matteuccia struthiopteris* (L.) Tod. were obtained from spores collected in natural populations. For lipid extraction, fragments of gametophyte thalli were cultivated in MS medium supplemented with MS vitamins, 2% sucrose, 0.8% agar, containing no plant growth regulators, at a 16 hours photoperiod for 75 days. Young growing fronds of the fern sporophytes were collected from plants growing outdoors. The plant material was boiled in water for 3 min before lipid extraction. Total lipids were extracted by Bligh and Dyer's method. Lipids were fractionated by solid-phase extraction on silica gel. Fatty acids (FA) were analyzed as methyl esters by gas-liquid chromatography.

Yields of total lipids were 5% (wt./dry wt.) for gametophytes and 11.7% for sporophytes. There were 31 fatty acids identified, and their composition was not different in the tissue of gametophytes and the fronds of sporophytes. The major FA were 16:0 (21.0/23.6 — here and below sporophyte/gametophyte, in % of sum FA), 18:3n-3 (25.0/22.1), 18:2n-6 (14.1/16.8), 18:1n-9 (7.8/7.3), and ARA (5.0/8.6). In the fronds, significant percentages were found for 16:3n-3 (4.4%) and EPA (3.0%), although these FA were minor in the gametophytes (0.9 and 0.6%, respectively). Other FA did not exceed 2% of sum FA. With the exception of some minor components, the distribution of FA in the fractions was similar for sporophytes and gametophytes. The fractions enriched in phospholipids (elution with methanol and a mixture of chloroform — methanol — water, 3:5:2, by vol.), contained the major portions of 16:0 (49.6/60.1, in % of sum in all fractions), 18:2n-6 (65.8/53.0), ARA (73.5/71.9), EPA (61.5/55.8), t-16:1n-13 (87.6/87.6), and also the potential precursors of ARA — 18:3n-6 (70.8/52.0) and EPA — 20:4n-3 (100/100). The fractions contained glycolipids (elution with acetone) were enriched in 18:3n-3 (90.1/77.2), 18:1n-9 (48.9/51.1), 16:3 n-3 (99.1/100), and also included significant portions of 16:0 (39.6/30.6), 18:2n-6 (22.6/38.9), EPA (28.8/44.2), and ARA (17.5/17.9). The fractions of non-polar lipids (elution with chloroform) of the sporophytes and gametophytes contained all the major FA in the range from 2.7 (18:3n-3 in sporophytes) to 11.6% (18:2n-6 in sporophytes) of the sum in all fractions. The fractions of non-polar lipids contained ARA (9.0/10.2), and EPA in the sporophytes only (9.7/0).

In conclusion, gametophytes of *M. struthiopteris* grown *in vitro* are a promising model for studies of ARA and EPA biosynthesis in ferns and, due to the high level of ARA, can be a source of phospholipids enriched in this fatty acid.

The study was supported by the Program of fundamental research of the Far Eastern Branch of Russian academy of Sciences "Far East" 2018–2020, project No. 18-3-019.

Фенилаланин как возможный регулятор накопления полифенолов в *in vitro* культурах растений

Нечаева Т. Л.¹, Аксенова М. А.², Живухина Е. А.², Загоскина Н. В.¹

¹ Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, ул. Ботаническая, 35, Москва, 127276, Россия, тел.: +7(499)678-53-82, e-mail: NechaevaTatyana.07@yandex.ru

² Московский педагогический государственный университет, ул. Малая Пироговская, 1/1, Москва, 119991, Россия

Культивируемые *in vitro* клетки и ткани растений могут служить источником биологически активных веществ (БАВ), в том числе для фармакологической индустрии. Однако их продуктивность часто оказывается ниже таковой исходных эксплантов, что требует подбора условий и факторов для активации этого процесса. К их числу относится экзогенное воздействие так называемыми «предшественниками» — веществами, которые являются промежуточными продуктами биосинтеза определенных БАВ, к числу которых относятся различные вторичные метаболиты.

Одними из самых распространенных вторичных метаболитов растений являются фенольные соединения (ФС) или полифенолы, обладающие высокой антиоксидантной, противовоспалительной, антиканцерогенной активностью. Начальные этапы их биосинтеза связаны с дезаминированием *L*-фенилаланина (ФА), образованием *транс*-коричной кислоты, а затем и других классов ФС.

Целью исследования стало изучение экзогенного действия ФА как потенциального предшественника ФС на накопление этих представителей вторичного метаболизма в каллусных культурах чайного растения.

Каллусные культуры чая (*Camellia sinensis* L.) выращивали на питательной среде Хеллера, содержащей глюкозу (25 г/л) и 2,4-Д (5 мг/л) при 25 °С в темноте. При постановке опытов каллусы культивировали в жидкой питательной среде с добавлением ФА (3 мМоль) при перемешивании. Контроль выращивали на питательной среде без ФА. Длительность пассажа составляла 14 дней.

Фенольные соединения извлекали из каллусных культур 3, 7, 9 и 14-дневного возраста 96 % этанолом при 45 °С в течение 45 мин. После центрифугирования гомогената (16000 об/мин, 20 мин), надосадочную жидкость отделяли и использовали для спектрофотометрического определения содержания суммы ФС (СФС) с реактивом Фолина-Дениса (725 нм) и флаванов (ФЛ) с 1 % раствором ванилина в 70 % серной кислоте (500 нм). Калибровочные кривые в обоих случаях строили по (-) эпикатехину. Статистическую обработку данных осуществляли в программе Excel.

Установили, что в присутствии ФА в питательной среде содержание СФС в каллусах чая более чем в 2 раза превышало таковое контрольного варианта, что наблюдалось практически на всех этапах роста. Что касается ФЛ (основных соединений фенольного комплекса чая), то изменения в их накоплении имели другую тенденцию: их количество возрастало лишь во второй половине цикла культивирования (9–14 дни) пассажа.

Эти данные свидетельствуют о возможности регуляции накопления фенольных соединений в культивируемых *in vitro* клетках и тканях растений экзогенным ФА.

Phenylalanine as a possible regulator of polyphenol accumulation in plant cultures *in vitro*

Nechaeva T. L.¹, Aksenova M. A.², Zhivukhina E. A.², Zagoskina N. V.¹

¹ K. A. Timiryazev Institute of Plant Physiology Russian Academy of Sciences, 35 Botanicheskaya st., 127276, Moscow, Russian Federation, tel.: +7(499)678-53-82, e-mail: NechaevaTatyana.07@yandex.ru

² Moscow Pedagogical State University, 1/1 Malaya Pirogovskaya st., Moscow, 119991, Russian Federation

Cultivated *in vitro* cells and plant tissues can serve as a source of biologically active substances (BAS), including the pharmacological industry. However, their productivity is often lower than that of the initial explants, requiring the selection of conditions and factors for activating this process. These include exogenous effects by so-called “precursors” — substances that are intermediate products of the biosynthesis of certain BASs, including various secondary metabolites.

Among the most common secondary metabolites of plants are phenolic compounds (PC) or polyphenols, which have high antioxidant, anti-inflammatory, anti-carcinogenic activity. The initial stages of their biosynthesis are associated with deamination of L-phenylalanine (FA), the formation of trans-cinnamic acid and then other classes of PS.

The purpose of the study was to study the exogenous effect of FA, as a potential precursor of PS, on the accumulation of these representatives of secondary metabolism in callus cultures of a tea plant.

Callus cultures of tea (*Camellia sinensis* L.) were grown on Heller’s nutrient medium containing glucose (25 g/l) and 2,4-D (5 mg/l) at 25°C in the dark. When the experiments were performed, the calli were cultured in a liquid nutrient medium supplemented with FA (3 mMol) while stirring. The control was grown on a nutrient medium without FA. The passage lasted 14 days.

Phenolic compounds were recovered from callus cultures 3, 7, 9 and 14 days old with 96 % ethanol at 45°C for 45 minutes. After centrifugation of the homogenate (16,000 rpm, 20 min), the supernatant was separated and used for spectrophotometric determination of the sum of PC (SPC) with Folin-Denis (725 nm) and flavans (FL) with 1 % vanillin solution in 70 % sulfuric acid (500 nm). The calibration curves in both cases were constructed using the (-) epicatechin. Statistical processing of data was carried out in the Excel program.

It was established that in the presence of FA in a nutrient medium, the content of SPC in tea calli was twice above that of the control variant, which was observed at practically all stages of growth. As for FL (the main compounds of the phenolic tea complex), the changes in their accumulation had a different tendency with their number increasing only in the second half of the cultivation cycle (9–14 days) of the passage.

These data indicate the possibility of regulating the accumulation of phenolic compounds in cultured *in vitro* cells and plant tissues by exogenous FA.

Влияние светодиодного освещения на микроклональное размножение растений

Никонович Т. В.¹, Кильчевский А. В.², Кардис Т. В.¹, Брель Н. Г.³, Трофимов Ю. В.⁴

¹ Белорусская государственная орденов Октябрьской Революции и Трудового Красного Знамени сельскохозяйственная академия, ул. Мичурина, 5, Горки, 213410, Могилевская обл., Беларусь, факс: +375(2233)7-96-17, тел.: +375(2233)7-81-82

² Национальная академия наук Беларуси, пр-т Независимости, 66, Минск, 220072, Беларусь, факс: +375(17)284-28-16, тел.: +375(17)284-17-77

³ Центральный ботанический сад НАН Беларуси, ул. Сурганова, 2 в, Минск, 220012, Беларусь, факс: +375(17)284-14-84, тел.: +375(17)292-69-15

⁴ Республиканское научно-производственное унитарное предприятие «Центр светодиодных и оптоэлектронных технологий Национальной академии наук Беларуси», Логойский тракт, 20, Минск, 220090, факс: +375(17)385-27-56, тел.: +375(17)281-13-35, e-mail: tvnikonovich@gmail.com

Современные биотехнологические методы широко применяются для размножения растений в условиях *in vitro* с целью получения однородного, качественного посадочного материала, свободного от различных болезней. При микроклональном размножении создаются и контролируются как химические, так и физические факторы. В настоящее время для снижения себестоимости посадочного материала в культуре *in vitro* перспективным является использование установок на основе света искусственных диодов. Обладая низким энергопотреблением, светодиодные светильники позволяют сократить расходы на освещение. Многообразие световых решений позволяет создать определенный спектр света для конкретной культуры. Однако в искусственных условиях обеспечение наиболее благоприятного сочетания спектральных диапазонов в светильниках является достаточно проблематичным и представляет научный интерес. Исследования выполнялись в условиях биотехнологической лаборатории кафедры сельскохозяйственной биотехнологии, экологии и радиологии БГСХА. Растения-регенеранты винограда, картофеля, сирени выращивали на искусственной питательной среде Мурасиге-Скуга. Температура культивирования составляла +24 °С, фотопериод 16 часов. В качестве источников света применялись светодиодные осветители, с различным спектральным распределением излучения в диапазоне 380–780 нм и цветовой температурой от 2400 до 6500 К. Всего 21 вариант освещения (варианты 1–21). Контрольным источником света были люминесцентные лампы с цветовой температурой 5700 К (вариант 22). Оценка высоты растения-регенеранта, коэффициента размножения, площади листовой пластинки показала, что проявление указанных признаков в значительной степени зависит от спектрального состава света и видовой специфичности. Так наибольшие показатели высоты растения-регенеранта и коэффициента размножения винограда сортов 'Маркетт' и 'Маршал Фош' выявлены при 15 и 16 вариантах освещения, у которых спектральное соотношение R/B («красный/синий») составило 6,9–7,8. Для картофеля сортов 'Лилея', 'Архидея', 'Скарб' оптимальным типом светильника для применения при микроклональном размножении из исследуемых нами являлся светильник 14 со спектральным соотношением красный/синий 1,3 и уровнем потока фотонов не менее 70,1 мкмоль/с, поскольку он обеспечивал наибольшие средние значения признаков в сочетании с минимальными сортовыми различиями. Микроклональное размножение сирени сорта 'Бюффон' предпочтительнее осуществлять при 8 варианте освещения, у которого доминируют зеленые спектральные полосы 500–599 нм, и плотность потока фотонов составила 9,2 мкмоль/(м²·с). При выявленном варианте освещения растения-регенеранты формировались высотой 50 мм с коэффициентом размножения 9–11 и хорошо развитой листовой пластинкой 65–80 мм². Данный вариант освещения наиболее приемлем для получения более вытянутых растений-регенерантов, причем без применения для этих целей регуляторов роста в составе искусственной питательной среды.

Influence of LED lighting on microclonal propagation of plants

Nikanovich T. V.¹, Kilchevsky A. V.², Kardis T. V.¹, Brel N. G.³, Trofimov Yu. V.⁴

¹ *Belarusian State Agricultural Academy, 5 Michurin st., 213410, Gorki, Mogilev region, Republic of Belarus, fax: +375(2233)7-96-17, tel.: +375(2233)7-81-82*

² *National Academy of Sciences of Belarus, 66 Nezavisimosti ave., 220072, Minsk, Republic of Belarus, fax: +375(2233)7-96-17, tel.: +375(2233)7-81-82*

³ *Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, 2v Surganova st., 220012, Minsk, Republic of Belarus, fax: +375(17)284-14-84, tel.: +375(17)292-69-15*

⁴ *Republican Research and Production Unitary Enterprise "Center for LED and Optoelectronic Technologies of the National Academy of Sciences of Belarus", 20 Logoysky tract, 220090, Minsk, fax: +375(17)385-27-56, tel.: +375(17)281-13-35, e-mail: tvnikonovich@gmail.com*

Modern biotechnological methods are widely used for plant propagation in *in vitro* conditions with the aim of obtaining a homogeneous, quality planting material free from various diseases. In microclonal reproduction, both chemical and physical factors are created and controlled. Currently, in order to reduce the prime cost of planting material in an *in vitro* culture, it is promising to use light-emitting diodes based on artificial diodes. With low power consumption, LED lighting can reduce the cost of lighting. The variety of light solutions allows to create a certain spectrum of light for a particular culture. However, under artificial conditions, the provision of the most favorable combination of spectral ranges in luminaires is problematic enough and is of scientific interest. The research was carried out in the conditions of the biotechnological laboratory of the Department of Agricultural Biotechnology, Ecology and Radiology BSAA. Plants-regenerants of grapes, potatoes, lilacs were grown on the artificial nutrient medium of Murashige and Skog. The culture temperature was + 24°C, the photoperiod was 16 hours. Light sources were used as light sources, with different spectral distribution of radiation in the range 380–780 nm and color temperature from 2400 to 6500 K. A total of 21 lighting options (options 1–21). The control light source was fluorescent lamps with a color temperature of 5700 K (option 22). The evaluation of the height of the regenerating plant, the multiplication factor, and the area of the leaf blade showed that the manifestation of these features depends to a large extent on the spectral composition of light and species specificity. Thus, the highest values of the height of the regenerating plant and the multiplication factor of the 'Marquette' and 'Marshall Foch' varieties were revealed in 15 and 16 lighting variants, in which the spectral ratio R/B ("red / blue") was 6.9–7.8. For the potato of 'Lileia', 'Archidea', 'Scarbe' varieties, the luminaire 14 with a red / blue 1.3 spectral ratio and a photon flux level of at least 70.1 $\mu\text{mol}/\text{c}$ was the optimal type of luminaire for use in microclonal propagation, since it provided the largest average values signs combined with minimal varietal differences. The microclonal reproduction of the lilac 'Buffon' is preferable for the 8th variant of illumination, which is dominated by green spectral bands of 500–599 nm and the photon flux density is 9.2 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{c})$. With the illumination variant identified, the regenerating plants were formed with a height of 50 mm, a multiplication factor of 9–11, and a well developed leaf blade of 65–80 mm². This variant of illumination is most suitable for obtaining more elongated regenerating plants, without the use of growth regulators in the artificial nutrient medium for these purposes.

Криосохранение семян *Disa uniflora* (Orchidaceae)

Никишина Т. В.¹, Антипин М. И.², Высоцкая О. Н.¹

¹ Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, ул. Ботаническая, 35, Москва, 127276, Россия, тел.: +7(499)231-83-22, факс: +7(499)977-80-18, e-mail: orchidcryo@mail.ru; cryo_ippras@mail.ru

² Ботанический сад МГУ имени М. В. Ломоносова «Аптекарский огород», пр-т Мира, 26, стр. 1, Москва, 129090, Россия, тел.: +7(495)680-58-80, 680-72-22; e-mail: info@hortus.ru

Disa uniflora P. J. Bergius — знаменитая красная орхидея, родом из Южной Африки относится к редким и охраняемым видам. Эта вечнозеленая наземная орхидея высотой от 15 до 60 см растет в условиях постоянной влажности. В природе размножается семенами и вегетативно, производя столоны, которые развиваются в новые растения. Диза одноцветковая редко встречается в коллекциях ботанических садов из-за специфических условий культивирования. Вид интересен не только своей высокой декоративностью, но и тем, что отличается от других представителей орхидных. Растения дизы одноцветковой не имеют периода покоя. Они предпочитают кислые почвы с рН 5–6, и обитают там, где есть проточная вода, например, вдоль ручьев, возле водоемов. Вид отличается сильной изменчивостью в зависимости от условий произрастания: растения могут отличаться окраской, формой, размером, количеством цветков на цветоносе и т. п.

Небольшое количество семян *Disa uniflora* было получено из филиала Ботанического сада МГУ «Аптекарский огород». Семена были разделены на три части. Часть № 1 — контроль: семена проращивали *in vitro* на разбавленной в 2 раза безгормональной питательной среде Мурасиге-Скуга. Часть № 2 — опыт: семена подсушивали на воздухе для снижения их влажности и замораживали в жидком азоте. Семена находились в жидком азоте 2 месяца, после чего их размораживали и проращивали *in vitro* аналогично контролю. Часть № 3 — оставшиеся семена мы добавили в криоколлекцию орхидей ИФР РАН на длительное хранение. Условия культивирования семян в контроле и опыте были одинаковы. Всхожесть семян в контроле и опыте была высокой и составила 62 % и 55 % соответственно. Семена прорастали в среднем через 2 месяца. В контроле процент живых протокормов оставался высоким на протяжении всего периода прорастания. Однако в опыте в процессе культивирования процент живых протокормов постоянно снижался. Несмотря на хорошую всхожесть, семена *D. uniflora* развивались крайне медленно. Только после 2-х лет культивирования нами были получены сеянцы высотой от 3,0 см, пригодные к высадке в грунт. Причем растения, выращенные из криосохраненных семян, развивались заметно медленнее и выглядели значительно слабее контрольных. Тем не менее из замороженных семян нам удалось получить сеянцы пригодного для пересадки в нестерильные условия размера.

Количество полученных растений после 2-х лет культивирования составило порядка 35–40 % от проросших семян в контроле и около 8 % в опыте. На основании полученных результатов можно сказать, что семена дизы одноцветковой относятся к типу семян, чувствительных к воздействию жидкого азота, но они могут быть сохранены в жидком азоте.

Cryopreservation of seeds *Disa uniflora* (Orchidaceae)

Nikishina T. V.¹, Antipin M. I.², Vysotskaya O. N.¹

¹ K. A. Timiryazev Institute of Plant Physiology Russian Academy of Sciences, 35 Botanicheskaya st., 127276, Moscow, Russian Federation, tel.: +7(499)231-83-22, e-mail: orchidcryo@mail.ru; cryo_ippras@mail.ru

² The Apothecaries' Garden of the Botanic Gardens of Moscow State University, Prospect Mira, 26, st. 1. 127276, Moscow, Russian Federation, tel.: +7(495)680-67-65; e-mail: info@hortus.ru

.....

Disa uniflora P. J. Bergius, this famous red orchid, originally from South West Africa, is protecting by the state. This evergreen, terrestrial orchid height from 15 to 60 cm grows under perennially moist conditions. In nature, *D. uniflora* multiplies by seeds and vegetative by producing stolons that develop into new plants. *D. uniflora* is the highly ornamental orchid. This species is rare in collections of Botanical gardens due to the specific conditions of cultivation. In addition, that this orchid is the highly ornamental, it is interesting in that it differs from other representatives family *Orchidaceae*. Plants of this species have no rest period. They prefer acidic soils with pH 5–6 and grow along stream banks waterfalls or wet cliffs. The species differs by strong variability depending on the conditions of growth. Thus, for example, plants may differ in color, shape, size, number of flowers on the peduncle and the like.

A small amount of seeds *D. uniflora* we obtained from the branch of the Botanical garden of Moscow state University “The Apothecaries’ Garden”. Seeds were dividing into three parts. Part No. 1 — control seeds we germinated *in vitro* on a diluted in 2 times a nutrient medium Murashige and Skoog. Part No. 2 — experience the seeds were dried in air to reduce their humidity and then frozen in liquid nitrogen. The seeds were in liquid nitrogen for 2 months, after which they were thawed and germinated *in vitro* in a manner similar to the control. Part No. 3 — the remaining seeds we added to the cryo-collection of orchids of the IPP RAS. The conditions for cultivation of seeds in control and experiment were identical. Seed germination in control and experiment was high and amounted to 62 % and 55 %, respectively. Seeds germinated on average in 2 months. In control, the percentage of live protocorms remained high throughout the germination period. However, in experience, in the process of cultivation the percentage of live protocorms has declined steadily. Despite good germination, the seeds of *D. uniflora* have developed very slowly. Plants suitable for planting in the ground we obtained only 2 years after sowing. At that, the plants obtained from cryopreserved seeds developed noticeably slower and looked much weaker than the control ones. Nevertheless, from frozen seeds managed to get seedlings, the size suitable for transplantation in non-sterile conditions. The number of plants obtained after 2 years of cultivation was about 40 % in the control and about 8 % in the experiment, from the seeds sown. Based on the results obtained, *D. uniflora* seeds, apparently, belong to a type of seed that is sensitive to the effects of liquid nitrogen but they can be stored in liquid nitrogen.

Механизм редокс-зависимой активации калиевого канала плазматической мембраны клеток корня растений *Arabidopsis*, выращенных в условиях *in vitro*

Новосельский И. Ю., Гриусевич П. В., Соколик А. И., Демидчик В. В.

Белорусский государственный университет, биологический факультет, кафедра клеточной биологии и биоинженерии растений, пр-т Независимости, 4, Минск, 220030, Беларусь, тел.: +375(17)209-59-12, e-mail: dzemidchuk@bsu.by

Редокс-активные молекулы, такие как активные формы кислорода (АФК), вовлечены также в ряд ключевых физиологических процессов у высших растений, такие как индукция клеточной гибели. Растения генерируют АФК в различных физиологических состояниях, при этом особую роль играет апопластный пул данных соединений. Несмотря на исключительную важность для физиологии растений механизмы взаимодействия и первичных сигнальных реакций, вызываемых АФК на поверхности клетки, остается открытым. Целью настоящей работы было выявить потенциальные сенсоры АФК в структуре ионных каналов плазматической мембраны клеток высших растений и произвести их электрофизиологический анализ с использованием техники пэтч-кламп. С помощью биоинформационных подходов нами было показано, что в канале GORK, по аналогии с K⁺-каналом SKOR, есть аминокислотный остаток цистеин в 151 положении (Цис-151), который вероятно может выступать в роли АФК-чувствительного центра канала. В этой связи были проведены электрофизиологические тесты при помощи техники пэтч-кламп на протопластах, выделенных из клеток корня *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh выращенного в условиях *in vitro*. В исследовании использовались корни *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh четырех типов: 1) дикий тип Wassilevskija — 'WS-0'; 2) нокаутные мутанты *gork1-1*, лишенные функционального белка GORK 3) *gork1-1* с возмещенным нативным GORK; 4) *gork1-1*, экспрессирующий GORK с заменой C151S. Введение в наружный раствор смесей, генерирующих гидроксильные радикалы (1 мМ CuCl₂, 1 мМ H₂O₂, 1 мМ L-аскорбиновой кислоты), вызывало многократное увеличение медленно-активирующейся компоненты выходящего тока. У растений-нокаутов *gork1-1*, данная компонента тока отсутствовала, как до, так и после обработки их смесью, генерирующей гидроксильные радикалы. Растения *gork1-1* выращенные в *in vitro* с возмещенным каналом GORK демонстрируют нормальную активацию медленных наружу-направленных токов. Линии *gork1-1*, экспрессирующие GORK с заменой цистеина 151 на серин, демонстрировали снижение чувствительности к смесям, генерирующим гидроксильные радикалы. Полученные данные указывают на то, что Цис-151 в комплексе K⁺-канала GORK участвует в прямом взаимодействии с АФК и опосредует активацию данного канала в ответ на продукцию в среде АФК. Таким образом, в данной работе продемонстрирована роль K⁺-каналов GORK в первичных взаимодействиях растительной клетки с АФК. Показано, что в присутствии АФК канал GORK способен катализировать выход K⁺ из клеток корня, что вероятно опосредует метаболические перестройки адаптивного характера, а также индукцию запрограммированной клеточной гибели.

The mechanism of redox-dependent K⁺ channel activation in the plasma membrane of *Arabidopsis* plants cultivated *in vitro*

Navaselskiy I. Y., Hryvusevich P. V., Sokolik A. I., Demidchik V. V.

*Belarusian State University, Biology faculty, Department of Plant Cell Biology and Bioengineering,
4 Nezavisimosti ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus, tel.: +375 (17) 209-59-12,
e-mail: dzemidchik@bsu.by*

.....

Reactive oxygen species (ROS) and other redox-active substances are involved in all key physiological processes in higher plants. Plants generate ROS in different physiological conditions including developmental programs, gravitropic and stress responses, etc. Despite crucial importance for plant physiology, the mechanisms of ROS primary regulatory reactions at the plasma membrane remain unclear. The aim of this work was to identify the potential ROS sensors in the plasma membrane of higher plants. Based on the examples from animal physiology, we hypothesized that the ion channels can play the role of these sensors. Here we used electrophysiological tests (patch-clamp technique) to address this question. Using bioinformatics analyses, we have shown that K⁺ outwardly rectifying channel GORK contains an amino acid residue cysteine at 151 positions (Cys151), which can potentially act as ROS-sensitive center (based on similarity to previous characterized ROS-sensitive K⁺ channel SKOR). A number of transgenic lines were used including 1) Wild Type Wassilevskija — ‘WS-0’, 2) knockout mutant *gork1-1*, devoid GORK functional protein, 3) *gork1-1* complemented by native GORK, 4) *gork1-1*, expressing GORK with substitution of Cys151 (by Serine; C151S). The hydroxyl radical generating mixture (1 mM CuCl₂, 1 mM H₂O₂, 1 mM L-ascorbic acid) increased the slowly-activating component of the outwardly-directed conductance. This current component was not found in the knockout plants *gork1-1* treated by hydroxyl radical-generating mixtures. *Gork1-1* plants (grown *in vitro*) with a compensated GORK demonstrated normal activation of the outwardly-rectifying currents. *Gork1-1* expressing C151S GORK showed a decrease in sensitivity to hydroxyl radicals. Overall, the obtained data indicate that Cys151 in the K⁺ channel GORK takes a part in direct interaction with ROS and mediates the activation of K⁺ efflux channels in response to ROS generation in response to stresses.

Особенности микрклонального размножения и агробактериальной генетической трансформации тополя берлинского

Павличенко В. В., Протопопова М. В., Войников В. К.

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск, 664033, ул. Лермонтова, 132, факс: +7(3952)51-07-54, тел.: +7(3952)42-67-21, e-mail: vpavlichenko@gmail.com

Целью исследования было определение особенностей микрклонального размножения и агробактериальной генетической трансформации тополя берлинского (*Populus berolinensis*).

Для регенерации и культивирования растений тополя *in vitro* использовали питательную среду (рН 5,7) на основе 1/2 MS 5524 с добавлением хелата железа и микроэлементов до полной нормы от среды MS, тиамин (1 мг/л), пиридоксин (0,5 мг/л), никотиновой кислоты (0,5 мг/л), аденин сульфата (40 мг/л) и мезоинозита (50 мг/л), сахарозы (2%) и агара (7 г/л). В качестве регуляторов роста использовали кинетин (КИН), бензиладенин (БА), тидиазурон (ТДЗ) и индолмасляную кислоту (ИМК) в различных концентрациях.

Для введения в стерильную культуру использовали молодые отрезки стеблей с пазушной почкой. После стерилизации (10% раствор белизны с добавлением Tween-20) экспланты перемещали на твердую питательную среду с добавлением КИН (0,5 мг/л). Побеги, проросшие из пазушных почек в течение первых 10 дней экспозиции, срезали и переносили на питательную среду для укоренения, содержащую ИМК в финальной концентрации 0,15 мг/л. Для сохранения растений применяли метод последовательной пересадки срезанных верхних частей растения на питательную среду для укоренения через каждые 25–30 дней.

Оценивали эффективность образования регенератов на питательных средах с добавлением только цитокининов в различных концентрациях (0,1 мг/л, 0,25 мг/л, 0,5 мг/л и 1 мг/л). В качестве эксплантов использовали черешки листьев, отрезки стеблей без пазушных почек, отрезки листьев и отрезки корней. Использованные виды цитокининов приводили к образованию регенерантов у тополя берлинского с различной эффективностью. Так, при использовании БА (0,1 мг/л) в питательной среде получали регенеранты из всех типов эксплантов. Наибольшее количество регенерантов образовывалось из отрезков корней при добавлении КИН (0,5 мг/л). Добавление ТДЗ может использоваться для размножения тополя берлинского только из черешков листьев (0,1 мг/л).

Также проводили оценку питательных сред, содержащих помимо цитокининов, ИМК в концентрациях 0,5, 0,25, 0,1 и 0,05 мг/л. Питательная среда с БА (0,5 мг/л) в сочетании с ИМК (0,1 мг/л) позволила получить большее количество регенерантов, по сравнению со средой, содержащей только БА, из всех типов эксплантов. Наибольшую эффективность при этом показали отрезки стеблей и корней. Питательные среды с добавлением КИН (0,5 мг/л) и ИМК (все концентрации) могут использоваться для получения регенерантов только из отрезков стеблей и корней, но с меньшей эффективностью, чем при использовании только КИН (0,5 мг/л). На среде с добавлением ТДЗ (0,5 мг/л) и ИМК (все концентрации) помимо регенерантов также отмечали образование органогенного каллуса из всех четырех типов эксплантов.

Для агробактериальной генетической трансформации использовали штамм *A. tumefaciens*, несущий плазмиды pBI121 с репортерным (*uidA*) и селективным (*nptII*) генами. Отрезки стеблей без пазушных почек инкубировали в жидкой питательной среде без регуляторов роста в течение суток в темноте при 24°C (200 об/мин). После коэкспонирования экспланты переносили на твердую питательную среду с добавлением кинетина (0,5 мг/л) для индукции органогенеза. Помимо регуляторов роста в питательную среду добавляли селективные и подавляющие рост агробактерии антибиотики (канамицин (15 мг/л) и цефотаксим (200 мг/л)). В течение 20 дней проводили экспонирование отрезков в световой комнате с фотопериодом 16/8 (день/ночь) при температуре 24°C. Через 20 дней наблюдали появление первых регенерантов. В результате селективного отбора было получено 6 различных линий, отличающихся по степени устойчивости к канамицину.

The peculiarities of micropropagation and agrobacterium mediated transformation of Berlin poplar

Pavlichenko V. V., Protopopova M. V., Voinikov V. K.

*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 132 Lermontov st., 664033, Irkutsk, Russian Federation,
fax: +7(3952)51-07-54, tel.: +7(3952)42-67-21, e-mail: vpavlichenko@gmail.com*

.....

The aim of this study was to find the peculiarities of micropropagation and agrobacterium mediated genetic transformation of Berlin poplar (*Populus berolinensis*).

As a substrate for the regeneration and *in vitro* cultivation of poplar plants, a 1/2 MS 5524 nutrient medium (pH 5.7) with the addition of an iron chelate and microelements to a complete standard from MS medium, thiamine (1 mg/l), pyridoxine (0.5 mg/l), nicotinic acid (0.5 mg/l), adenine sulfate (40 mg/l) and meso-inositol (50 mg/l), sucrose (2 %) and agar (7 g/l) was used. Kinetin (KIN), benziladenine (BA), thidiazuron (TDZ) and indolyl-butyric acid (IBA) have been used as growth regulators.

For the sterile culture set up the young segments of stems with axillary buds were used. After sterilization (10 % bleach solution with the addition of Tween-20), the explants were transferred to a solid nutrient medium with the addition of KIN (0.5 mg/l). Shoots sprouted from axillary buds during the first 10 days of exposure were cut off and transferred to a rooting medium containing IBA at a final concentration of 0.15 mg/l. For the sterile culture maintenance, the cut off upper parts of the plant were transferred into a rooting nutrient medium every 25–30 days.

The efficiency of the regeneration on nutrient media supplemented only with cytokinins at various concentrations (0.1 mg/l, 0.25 mg/l, 0.5 mg/l and 1 mg/l) was estimated. As explants the leaves petioles, stems segments without axillary buds, segments of leaf and roots were used. The used types of cytokinins led to the formation of regenerants in poplar Berlin with different efficacy. So, when BA (0.1 mg/l) was used in a nutrient medium, regenerants were obtained from all types of explants. The greatest number of regenerants was formed from root segments with the addition of KIN (0.5 mg/l). The addition of the TLV can be used to propagate the Berlin poplar only from the leaf petioles (0.1 mg/l).

An evaluation of nutrient media containing both cytokinins and IBA at concentrations of 0.5, 0.25, 0.1 and 0.05 mg/l was also performed. Using a nutrient medium with BA (0.5 mg/l) in combination with IBA (0.1 mg/l) allowed to obtain a greater number of regenerants from all types of explants in contrast with a medium containing only BA. In this case stem segments and roots showed the greatest efficiency. Nutrient media supplemented with KIN (0.5 mg/l) and IBA (all concentrations) can be used to produce regenerants from only stem and root segments, but with less efficiency than using only KIN (0.5 mg/l). On a medium supplemented with TDZ (0.5 mg/l) and IBA (all concentrations), in addition to regenerants, the formation of organogenic callus from all four types of explants was also noted.

A strain of *A. tumefaciens* carrying pBI121 plasmids with reporter (*uidA*) and selective (*nptII*) genes was used for the genetic transformation. Stem segments without axillary buds were incubated in a liquid nutrient medium without growth regulators for 24 hours in the darkness at 24°C (200 rpm). After coexpression, the explants were transferred to a solid nutrient medium with the addition of kinetin (0.5 mg/l) to induce organogenesis. In addition to growth regulators, selective (kanamycin 15 mg/l) and agrobacteria growth-inhibiting (cefotaxime 200 mg/l) antibiotics were added to the nutrient medium. The following exposure within 20 days was performed in the light room with photoperiod 16/8 (day/night) at a temperature of 24°C. After 20 days, the appearance of the first regenerants was observed. As a result of selective selection, 6 transgenic lines differing in the degree of resistance to kanamycin were obtained.

Вегетирующая коллекция растений винограда *in vitro*, условия хранения

Павлова И. А.

Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия «Магарач» РАН, ул. Кирова, 31, Ялта, 298600, Республика Крым, Россия, тел.: +79787620350, факс (03654)230608, e-mail: pavlovairina1965@gmail.com

Метод длительного беспересадочного хранения пробирочных растений в режиме замедленного роста — один из распространенных способов поддержания коллекции растительных ресурсов в условиях *in vitro*. Депонирование позволяет уменьшить затраты труда и времени, сэкономить расходы на реактивы и материалы. Методики, обеспечивающие медленный рост, основаны на снижении температуры и освещенности, модификации среды, особенно путем добавления веществ ингибирующего действия. Преимущество вегетирующей коллекции состоит в том, что образцы представлены не клеточными структурами или отдельными органами, а полноценными растениями, находящимися в процессе замедленного роста или состоянии глубокого покоя.

С целью сохранения, оздоровления и дальнейшего массового размножения в институте «Магарач» создана коллекция растений *in vitro* сортов, клонов и гибридов винограда. В настоящий период коллекция насчитывает 40 образцов, каждый из которых представлен десятью растениями. Основное ядро коллекции составляют сорта, клоны и гибриды института «Магарач», а также автохтонные крымские сорта.

Проведены исследования с целью оптимизации условий хранения растений *in vitro* для увеличения интервалов между пассажами. Определены параметры 6 основных факторов, влияющих на эффективность беспересадочного культивирования растений винограда в вегетирующей коллекции на свету и в темноте. Проведенные исследования показали, что в течение одного года растения сохраняют свою жизнеспособность при определенных параметрах культивирования.

Для культивирования в темноте при температуре +2...+4°C на безгормональной среде крайне важным является фактор физиологического состояния растения. Переход растений в состояние глубокого покоя достигается увеличением концентрации сахарозы в среде до 60 г/л, изменением режима культивирования (8-часовой фотопериод) либо предварительным культивированием растений в моделируемых условиях близких к естественным. Для культивирования на свету при температуре +25...+27°C и 16-часовом фотопериоде основными факторами являются: обедненная среда культивирования, более слабая освещенность (800...1000 лк), тип культурального сосуда.

Основным недостатком способа хранения на свету является то, что у растения в процессе непрерывного замедленного после шести месяцев культивирования снижается жизнеспособность, и к концу года она составляет в среднем 30 %. Недостатком второго способа может быть относительно низкая регенерационная способность почек после периода хранения. В обоих случаях отмечается высокая сортовая специфичность показателей жизнеспособности растений и регенерационной способности почек.

Разработаны технологические режимы хранения растений винограда *in vitro*, не требующие специального оборудования, а среды не содержат гормональных добавок, которые в результате длительного культивирования могут привести к мутациям.

A vegetating collection of grape plants *in vitro*: storage conditions

Pavlova I. A.

All-Russian National Research Institute of Viticulture and Winemaking «Magarach» of RAS,
31 Kirov st., 298600, Yalta, Republic of Crimea, Russian Federation,
tel.: +79787620350, fax: (03654)230608, e-mail: pavlovairina1965@gmail.com

.....

Long-term storage of non-subcultured tube plants under conditions of retarded growth is a widely used method to maintain collections of genetic resources *in vitro*. Depositing makes it possible to save time and labor as well as to reduce spendings on chemical agents and materials. Procedures enabling slow growth rely on lower temperatures and reduced illumination on the one hand and on modified media on the other, especially by addition of inhibiting substances. The advantage of a vegetating collection lies in the fact that, instead of cell structures or particular organs, it maintains full-value plants in the process of retarded growth or at the state of true dormancy.

A collection of grape varieties, clones and hybrids maintained *in vitro* had been established at the Institute for Vine and Wine “Magarach”, with a view of their conservation, sanitation and subsequent propagation on a wide scale. At present, the collection has 40 accessions, each consisting of ten plants. The core of the collection is made by new-breeds of the Institute as well as by autochthonous grapes of the Crimea.

Our research was aimed at improving storage conditions of grape plants *in vitro* in order to increase subculturing intervals. Numerical values of six major factors affecting the cultivation of non-subcultured grape plants maintained in a vegetating collection, both exposed to illumination and in darkness, have been determined. It has been found that maintained plants remain viable for a period of one year provided definite cultivation parameters.

For cultivation in darkness at +2...+4°C on hormone-free medium, physiological state of a plant is of crucial importance. True dormancy may be developed in grape plants by three approaches: increasing sucrose levels of medium up to 60 g/l, applying a modified cultivation regimen envisaging 8 hours illumination, or providing pre-cultivation at simulated near-natural conditions. For cultivation in light with 16 hours photoperiod at +25...+27°C, another set of factors, such as depleted cultivation medium, lower light intensity (800...1000 lx) and the type of culture vessel, enter as crucial.

The main disadvantage of the storage in light is that the plants in the process of continuous retarded growth are becoming less viable after six months of cultivation, with an average of 30 % of their initial viability by the end of the year. A relatively low bud regenerative ability following a storage period may be a disadvantage associated with the storage in darkness. Indicators of plant viability and bud regenerative ability observed for each of the two methods of storage were highly variety-specific.

Our research has led to operating practices for *in-vitro* storage of grape plants under conditions of retarded growth. Such practices do not require special equipment, and cultivation media used are free from hormone additives capable to induce mutations.

Использование методов *in vitro* в отечественном селекционном процессе луковых культур

Павлова И. В., Купреенко Н. П., Булахова А. С.

Институт овощеводства, ул. Ковалева, 2, аг. Самохваловичи, Минский р-н, 223013,
Республика Беларусь, тел./факс: +375(17)506-60-08, e-mail: hakuroshya@yahoo.com

Луковые овощные культуры распространены во всем мире и доступны круглогодично благодаря высокой урожайности, холодостойкости и лежкости. В селекционных программах луковых культур существует быстрый способ размножения лучших исходных растений и получения свободного от вирусов посадочного материала методом *in vitro*. Однако в нашей стране *in vitro* размножение луковых культур пока не достигло достаточной эффективности. Поэтому были изучены новые мировые результаты изучения луковых культур и проведены дополнительные исследования их биологии и особенностей гибридной селекции.

Представители семейства *Alliaceae* — единственные среди овощных культур, которые относятся к классу однодольных. В сельскохозяйственном производстве роды *Allium* разделяются в зависимости от системы размножения. Лук репчатый, лук порей, лук батун традиционно размножаются семенами, а чеснок, лук поникающий, лук виноградный — с помощью вегетативных органов. Современные результаты научных исследований показывают, что семейству свойственна мейотическая иррегулярность, ведущая к редукции фертильности. У чеснока в ходе искусственного отбора по хозяйственным признакам полностью утратилось семенное размножение. Наиболее распространенным источником эксплантов для прямого морфогенеза *in vitro* у луковых растений является нераскрывшееся соцветие. Однако при образовании воздушных бульбочек у стрелкующих форм наблюдаются изменения, вызванные активностью рудиментарной половой системы. В связи с этим в наших экспериментах проводится предварительные трехлетние испытания доноров эксплантов на однородность воздушных бульбочек и их потомства. У нестрелкующих форм чеснока соцветие не образуется. Получение эксплантов меристем из луковиц очень трудоемко, так как включает этап отбора свободных от эндо- и экзогенной микрофлоры образцов. В связи с этим мы внедряем новый метод клонального микроразмножения нестрелкующего чеснока индукцией пролиферации корней и последующим формированием регенерантов из кончиков корня *in vitro*.

При получении гибридных семян лука репчатого используется система мужской ядерно-цитоплазматической стерильности, которая обуславливает долю перекрестного опыления в естественных популяциях и открытоопыляемых сортах. В последние десятилетия показано, что у луковых культур происходят существенные реаранжировки мтДНК между нормальным и ЦМС-S цитотипами, частые субстехиометрические сдвиги в химерном локусе *orf725*, отвечающего за ЦМС-T цитотип. Это объясняют эволюцией растительных митохондриальных геномов, движущей силой которой являются перестановки последовательностей относительно больших повторов от 1 до 10 kb. У видов *Allium* с ЦМС-S отмечена интеграция части хлоропластного гена *usc2* в митохондриальный геном. S- и T-цитотипы отвечают за два вида ЦМС у лука репчатого. Считается, что ЦМС-S и ЦМС-T фенотипы мужской стерильности неразличимы. Предварительные исследования вариаций мтДНК и хпДНК между двумя ЦМС и нормальными цитотипами, проведенные в Корее, выявили значительные реаранжировки мтДНК между ЦМС-S и ЦМС-T/нормальными цитотипами. В нашей работе в популяциях открытоопыляемых отечественных сортов лука репчатого выявлен молекулярно-генетический полиморфизм цитоплазматических локусов (S-, T-, N- и SN-), отвечающих за мужскую стерильность. Природа и стабильность SN-цитотипа пока не установлена. В ходе гибридной селекции лука репчатого возникает задача первичного *in vitro* размножения мужски стерильных тестеров. В качестве доноров эксплантов используются генотипированные S-, N-цитотипы. Исследуются пути детекции факторов, индуцирующих субстехиометрические сдвиги в *orf725* для их элиминации.

Present state of tissue cultures in belorussian onion breeding

Pavlova I. V., Kupreenko N. P., Bulahova A. S.

*Institute for Fruit Growing, 2 Kovalev st., 223013, Samokhvalovichy, Minsk region, Republic of Belarus,
tel./fax: +375(17)506-60-08, e-mail: hakuroshya@yahoo.com*

.....

Onion are spread all over the world and is available year-round due to high yield, cold resistance and long shelf life. In onions breeding programs *in vitro* cultivation is accelerated mode of origin plants propagation and production of virus free germplasm. However, in our country *in vitro* reproduction of onion crops has not yet reached sufficient efficiency. Therefore, new world results of onion crops studying were attracted and our research of their biology and the hybrid breeding technology have been done.

Representatives of the *Alliaceae* family are the only ones among vegetables that belong to the class of monocots. In agricultural production, the *Allium* genera are divided depending on the breeding system. Onion and leeks are traditionally seed propagated, and garlic — with the help of cloning. Modern scientific results show that the family is characterized by meiotic irregularity, leading to fertility reduction in. In the course of garlic artificial selection on horticultural grounds seed reproduction was completely lost.

The most common source of explants for direct morphogenesis *in vitro* in onion plants is the unopened inflorescence. However, in the formation of air bulbs in the bolting forms trates variability are observed that are caused by the activity of the rudimentary sexual system. In this regard, in our experiments, preliminary three-year tests of explant donors on the air bulbs and their progeny uniformity are carried out. In not-bolting garlic, the inflorescence is not formed. Obtaining explants meristem from bulbs is very laborious, since it involves the selection of samples free from endo- and exogenous microflora. In this regard, we are introducing a new method of clonal micropropagation of non-bolting garlic by induction of root proliferation and the subsequent formation of regenerants from root tips *in vitro*.

In the production of onion hybrid seeds, a male nuclear-cytoplasmic sterility system is used. Naturally it accounts for the proportion of cross-pollination in open pollinated populations and varieties. In recent decades, it has been shown that in onions significant mtDNA rearrangements occur between normal and CMS-S cytotypes, frequent sub-stoichiometric shifts in the chimeric locus *orf725* responsible for the CMS-T cytotpe. This is explained by the evolution of plant mitochondrial genomes, the driving force of which are shifting of sequences of relatively large repetitions from 1 to 10 kb. In *Allium* species with CMS-S, the integration of part of the chloroplast gene *ycf2* into the mitochondrial genome was noted. S- and T-cytotypes are responsible for two types of CMS in onions. It is believed that CMS-S and CMS-T phenotypes of male sterility are indistinguishable. Preliminary studies of the variation of mtDNA and cpDNA between two CMSs and normal cytotypes conducted in Korea revealed significant rearrangements of mtDNA between CMS-S and CMS-T/normal cytotypes. In our work, in populations of open pollinated domestic onion varieties, the molecular genetic polymorphism of cytoplasmic loci (S-, T-, N- and SN-) responsible for male sterility was revealed. The nature and stability of the SN-cytotype has not yet been established. During the hybrid selection of onion we apply *in vitro* cultures to multiply the male sterile primary plants to produce male sterile tester lines. As donors of explant genotyped S- and N-cytotypes are used. The ways of detecting factors inducing substoichiometric shifts in *orf725* for their elimination planned to be investigated.

Сайт-специфическое редактирование модельного гена *gfp* в геноме суспензионной культуры клеток *Arabidopsis thaliana* L.

Пермякова Н. В., Сидорчук Ю. В., Маренкова Т. В., Кузнецов В. В., Хозеева С. А., Загорская А. А., Дейнеко Е. В.

Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, пр-т акад. Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090, Россия, факс: +7(383)333-12-78, тел.: +7(383)363-49-80, e-mail: puh@bionet.nsc.ru

.....

Синтез рекомбинантных белков в суспензионных культурах генетически модифицированных растительных клеток является перспективной и быстро развивающейся областью биотехнологии растений. Система сайт-специфического редактирования генов CRISPR/Cas9 может стать эффективным инструментом для решения ряда проблем, существующих в данной системе экспрессии, тем не менее примеров ее применения для редактирования генома растительных клеток, растущих в суспензионных культурах, крайне мало. В данной работе мы проанализировали эффективность использования системы CRISPR/Cas9 для инактивации репортерного гена *gfp* интегрированного в геном быстрорастущей суспензионной культуры клеток *A. thaliana*. Для сайт-специфического редактирования гена *gfp* была сконструирована плаزمида Cas9GFP, несущая ген эндонуклеазы Cas9, последовательность, кодирующая подобранную для гена *gfp* направляющую РНК, и ген *bar*, определяющий устойчивость к фосфинотрицину. Плаزمида Cas9GFP доставлялась в клетки растений при помощи агробактериальной и биобаллистической трансформации. Мутации выявлялись при помощи рестриктазы *AspS9I*, сайт рестрикции которой расположен в месте предполагаемой мутации. Среди проанализированных 65 индивидуальных каллусных линий было выявлено 16 (24,6%), в которых ПЦР фрагмент гена *gfp* полностью или частично не подвергался рестрикции *AspS9I*. В большинстве исследованных линий ДНК оказалась негомогенной, что обусловлено гетерогенностью клеточной культуры. Для получения индивидуальных мутантных линий, несущих одну необходимую мутацию, необходимо проводить плэйтинг. Фрагмент гена *gfp* у линий, несущих мутацию, был клонирован и секвенирован. Инактивация гена *gfp* у мутантных линий была подтверждена при анализе уровня накопления GFP-белка. У мутантных линий уровень накопления GFP-белка по сравнению с исходной линией клеток существенно снижен или полностью отсутствует. Таким образом, показано, что система CRISPR/Cas9 может эффективно использоваться для внесения сайт-специфических мутаций в геном *A. thaliana* в суспензионной культуре клеток, однако получение линий гомогенных по мутациям требует дополнительных усилий.

Работа была поддержана проектом РНФ: 17-14-01099.

Targeted genome editing of the model gene *gfp* in the genome of the cell suspension culture of *Arabidopsis thaliana* L.

Permyakova N. V., Sidorchuk Yu. V., Marenkova T. V., Kuznetsov V. V., Khozeeva S. A., Zagorskaya A. A., Deineko E. V.

Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, 10 Academician Lavrentiev ave., 630090, Novosibirsk, Russian Federation, fax: +7(383)333-12-78, tel.: +7(383)363-49-80, e-mail: puh@bionet.nsc.ru

.....

Synthesis of recombinant proteins in the suspension cultures of genetically modified plant cells is a promising and rapidly developing field of plant biotechnology. The system of targeted genome editing named CRISPR/Cas9 can become an effective tool for solving a number of problems existing in this expression system, however, examples of its application for editing the genome of plant cells growing in suspension cultures is extremely small. In this paper, we analyzed the effectiveness of using the CRISPR/Cas9 system to inactivate the reporter gene *gfp* integrated into the genome of the fast-growing suspension culture of *A. thaliana* cells. For site-specific editing of the *gfp* gene, we constructed a Cas9GFP plasmid, carrying the Cas9 endonuclease gene, the sequence coding *gfp*-targeting guide RNA and the *bar* gene determining resistance to glufosinate. Plasmid Cas9GFP was delivered to plant cells by agrobacterial or bioballistic transformation. Mutations were detected with the restriction enzyme *AspS9I*, whose restriction site is located at the site of the proposed mutation. Among the 65 analyzed individual callus lines, 16 (24.6%) were identified in which the PCR fragment of the *gfp* gene was not digested fully or partially by *AspS9I*. In most of the studied lines, DNA was non-homogeneous, due to the heterogeneity of the cell culture. To obtain individual mutant lines having one necessary mutation, it is necessary to carry out plating. A fragment of the *gfp* gene in the lines bearing the mutation was cloned and sequenced. The inactivation of the *gfp* gene in mutant lines was confirmed by analyzing the level of accumulation of the GFP protein. In mutant lines, the level of accumulation of GFP protein is significantly reduced or completely absent in comparison with the initial cell line. Thus, it has been shown that the CRISPR/Cas9 system can effectively be used to generate site-specific mutations in the *A. thaliana* genome in a cell suspension culture, but obtaining lines homogenous in mutations requires additional effort.

This work was supported by a grant from the RSF: 17-14-01099

Методы *in vitro* для получения аллоплазматических и ДГ линий (*H. vulgare*)-*T. aestivum*, используемых в селекции яровой мягкой пшеницы

**Першина Л. А.¹, Белова Л. И.¹, Трубачеева Н. В.¹, Осадчая Т. С.¹,
Кравцова Л. А.¹, Белан И. А.², Россеева Л. П.², Немченко В. В.³,
Абакумов С. Н.⁴**

¹ Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, пр-т акад. Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090, Россия, факс: +7(383)333-12-78, тел.: +7(383)363-49-63, e-mail: pershina@bionet.nsc.ru

² Омский аграрный научный центр, пр-т Королева, 26, Омск, 644012, Россия, факс: +7(381)277-69-21, тел.: +7(381)277-54-53

³ ООО «Агрокомплекс «Кургансемена», ул. Володарского, 57, Курган, 640000, Россия, факс: +7(352)242-69-34, тел.: +7(352)246-24-77

⁴ Федеральное государственное унитарное предприятие «Ишимское», ул. Мира, 7/2, с. Тоболово, Ишимский район, Тюменская область, 627704, факс: +7(345)512-36-10, тел.: +7(345)512-36-50

.....

Важной задачей биотехнологии и генетики является увеличение генетического разнообразия культурных растений и ускорение селекционного процесса. В наших работах для увеличения генетического разнообразия мягкой пшеницы разрабатываются подходы, основанные на замещении цитоплазмы пшеницы на цитоплазму ячменя (культурного *H. vulgare* и дикого ячменя *H. marinum* ssp. *gussoneanum*) с последующей интрогрессией в ядерный геном аллоплазматических линий (*Hordeum*)-*T. aestivum* сочетания генов, определяющих устойчивость к стрессовым факторам и проявление хозяйственно-ценных признаков. Отработаны протоколы культивирования *in vitro*: зародышей для преодоления эмбриональной несовместимости при скрещивании видов ячменя и пшеницы; изолированных соцветий для клонального размножения ячменно-пшеничных гибридов с повышенным развитием жизнеспособных гамет; пыльников для получения ДГ-линий с фиксированным сочетанием целевых генов, интрогрессированных от разных источников. Выявлены генотипы мягкой пшеницы — восстановители фертильности мягкой пшеницы на цитоплазме ячменя. Изучены закономерности восстановления фертильности аллоплазматических линий, ассоциированных с изменчивостью ядерных и цитоплазматических геномов. Установлено, что условия культивирования пыльников не оказывают негативного влияния на ядерно-цитоплазматическую совместимость у аллоплазматических генотипов (*H. vulgare*)-*T. aestivum*. В нашей работе алло-линии используются в качестве нового исходного материала для селекции при создании интрогрессивных аллоплазматических линий, носителей пирамид генов устойчивости к грибным патогенам. Получено разнообразие аллоплазматических интрогрессивных линий (*Hordeum*)-*T. aestivum* и ДГ линий, включенных в селекционный процесс. Показана эффективность использования ДГ-линий интрогрессивных аллоплазматических линий (*H. vulgare*)-*T. aestivum* как для ускорения отбора генотипов с целевыми генами, так и включения их в гибридизацию для получения гибридных форм с эффектами проявления гетерозиса по признакам продуктивности. Так, одна из гибридных интрогрессивных форм, при получении которой в качестве материнского генотипа использована аллоплазматическая ДГ-линия (*H. vulgare*)-*T. aestivum*, стала источником трех линий, которые в результате отборов в разных регионах стали новыми сортами яровой мягкой пшеницы: Сигма, Уралосибирская 2 и Ишимская 11.

Отдельные аспекты работы выполнены при поддержке гранта РФФИ (проект 17-04-01738).

In vitro methods for the development of alloplasmic and DH lines (*H. vulgare*)-*T. aestivum* used in the breeding of spring common wheat

**Pershina L. A.¹, Osadchaya T. S.¹, Trubacheeva N. V.¹, Belan I. A.²,
Rosseeva L. P.², Nemchenko V. V.³, Abakumov S. N.⁴**

¹ Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, 10 Academician Lavrentiev ave., 630090, Novosibirsk, Russian Federation, fax: +7(383)333-12-78, tel.: +7(383)363-49-63, e-mail: pershina@bionet.nsc.ru

² Omsk Agricultural Scientific Center, 26 Korolev ave., 644012, Omsk, Russian Federation, fax: +7(381)277-69-21, tel.: +7(381)277-54-53

³ "Agrocomplex "Kurgansemena", 57 Volodarskogo st., 640000, Kurgan, Russian Federation, fax: +7(352)242-69-34, tel.: +7(352)246-24-77

⁴ Federalny state unitary enterprise "Ishimskoe", 7/2 Mira st., 627704, Tobolovo, Ishim district, Tyumen region, Russian Federation, fax: +7(345)512-36-10, tel.: +7(345)512-36-50

.....

An important task of biotechnology and genetics is to increase the genetic diversity of cultivated plants and speed up the selection process. In our works, approaches are being developed to increase the genetic diversity of common wheat based on replacing the cytoplasm of wheat with the cytoplasm of barley (*H. vulgare* and wild barley *H. marinum* ssp. *gussoneanum*) followed by introgression into the nuclear genome of alloplasmic lines (*Hordeum*)-*T. aestivum* a combination of genes that determine resistance to stress factors and economically valuable traits. *In vitro* cultivation protocols have been worked out: embryo culture for overcoming embryonic incompatibility in crossing between barley and wheat species; young inflorescences for clonal multiplication of barley-wheat hybrids F1 with enhanced development of viable gametes; anther culture to produce DH lines with a fixed combination of target genes, introgressed from different sources. Genotypes of common wheat are restorers of fertility of common wheat on the cytoplasm of barley have been identified. The patterns of restoration of fertility of alloplasmic lines associated with the variability of nuclear and cytoplasmic genomes have been studied. It has been established that the conditions for the cultivation of anthers do not negatively affect nuclear-cytoplasmic compatibility in alloplasmic genotypes (*H. vulgare*)-*T. aestivum*. In our work, alloplasmic lines are used as a new genotypes in breeding for development of introgressive alloplasmic lines, carriers of pyramids of genes controlling resistant to fungal pathogens. A variety of alloplasmic introgression lines (*Hordeum*)-*T. aestivum* and DH lines included in the breeding of common wheat was obtained. The efficiency of the use of DH lines of introgressive alloplasmic lines (*H. vulgare*)-*T. aestivum* is shown to accelerate the selection of genotypes with target genes, and to include them in hybridization to obtain hybrid forms with the effects of heterosis of productivity. Thus, one of the hybrid introgressive forms, in which the alloplasmic DH line (*H. vulgare*)-*T. aestivum* was used as the maternal genotype, became the source of three lines that, as a result of breeding in different regions, became new varieties of spring common wheat: Sigma, Uralosibirskaya 2 and Ishimskaya 11.

Some aspects of the work were carried out with the support of the RFBR grant (project 17-04-01738).

Содержание мангиферина в растениях-регенерантах *Iris sibirica* L.

Петрин Н. И., Базарнова Н. Г., Геньш К. В. Тихомирова Л. И.

Алтайский государственный университет, пр-т Ленина, 61, Барнаул, 656049, Россия,
факс: +7(385-2)667-626, тел.: +7(385-2)291-291, e-mail: petrin_93@mail.ru

Лечебные свойства растений рода Ирис обусловлены уникальным набором биологически активных веществ — ксантонов, флавоноидов, изофлавоноидов, кумаринов, терпеноидов. Наиболее распространенный ксантоновый гликозид мангиферин (2-С-β-D- глюкопиранозил-1,3,6,7-тетрагидрокси-ксантон) обладает высокой биологической активностью, он проявляет противотуберкулезное, противоопухолевое, гепатопротекторное, желчегонное, антибиотическое, гипогликемическое, иммуностимулирующее и мембраностабилизирующее действие. Кроме того, мангиферин проявляет противовирусную активность в отношении ДНК-вирусов, в том числе вирусов герпеса (HSV-1, HSV-2, VZV, EBV, CMV).

Противогерпетическое действие мангиферина используется в лекарственном препарате «Алпизарин» (Фармцентр ВИЛАР, РФ), который представлен в данное время на фармацевтическом рынке Российской Федерации. Остается нерешенной проблема заготовки растительного сырья для производства препарата. Основным источником является *Mangifera indica*. Используемая часть — листья. Но манговые деревья в России не растут, в связи с этим необходим поиск новых источников сырья.

Целью данных исследований являлось определение содержания мангиферина в растениях-регенерантах и интактных листьях *Iris sibirica* L. методом ВЭЖХ.

Объектами исследования служили растения-регенеранты *Iris sibirica* L., выращенные в Отделе биотехнологии Алтайского государственного университета.

0,5 г (точная навеска) измельченного сырья заливали 50 мл 60 % этанола и экстрагировали на водяной бане 1 ч. Отфильтровывали через бумажный фильтр и повторяли экстракцию еще дважды по 30 мин. Объединенный экстракт упаривали досуха и остаток растворяли в 5 мл 70 % этанола. Отделение ксантонов проводили методом ТСХ. 0,05 мл спиртового экстракта наносили на бумагу (марка Sorbfil 10×10 мм) и разгоняли восходящим способом в 40 %-й уксусной кислоте. Затем высушенную хроматограмму просматривали под УФ облучателем марки Ленхром при длине волны 254 нм. Проявившееся пятна элюировали 70 % раствором спирта этилового и объем раствора доводили до 25 мл.

Качественное определение проводили методом ВЭЖХ на приборе Shimadzu с параметрами прибора. Колонка Zorbax SB-C18 (250×4,6 mm, 5 μm) (Agilent). Длины волн 260–320 нм, подвижная фаза раствор А фосфорная кислота (1 %) и раствор Б ацетонитрил. Градиент 95–90 % раствор А — 0–3 мин., 90 % раствор — А — 3–7 мин., 90–60 % раствор А — 7–15 мин., 60–0 % раствор — А — 15–22 мин. Объем инъекции 10 мкл. Скорость потока 1 мл/мин. Температура 22–240 °С.

В качестве стандарта использовали образец мангиферина фирмы «Sigma». Установили поглощение стандарта с помощью ВЭЖХ при длинах волн 260 нм, 320 нм и времени удерживания 16 886 и 16 887 соответственно. В ходе исследований были получены хроматограммы ВЭЖХ испытуемого раствора растений-регенерантов с временем удерживания 16 845 при длине волны 260 нм и 16 845 при длине волны 320 нм, а также листьев интактных растений с временем удерживания 16 829 при длине волны 260 нм и 16 830 при длине волны 320 нм.

Таким образом, было доказано содержание мангиферина в растениях-регенерантах *Iris sibirica* L., что является важным достижением в решении проблемы разработки биотехнологии получения растительного сырья как источника ценного противовирусного соединения.

The contents mangiferin in plants-regenerante *Iris sibirica* L.

Petrin N. I., Bazarnova N. G, Gensh K. V., Tikhomirov L. I.

*Altai State University, 61 Lenin ave., 656049, Barnaul, Russian Federation,
fax: +7(385-2)667-626, tel.: +7(385-2)291-291, e-mail: petrin_93@mail.ru*

Medicinal properties of plants of the genus iris due to a unique set of biologically active substances — xanthenes, flavonoids, isoflavonoids, coumarins, terpenoids. The most common xanthone glycoside mangiferin (2-C- β -D — glucopyranoside-1,3,6,7-tetrahydroxy — xanthone) has a high biological activity, it exhibits antitubercular, antitumor, hepatoprotective, choleric, antibiotic, hypoglycemic, immunostimulatory and membrane stabilizing effect. In addition, mangiferin exhibits antiviral activity against DNA viruses, including herpes viruses (HSV-1, HSV-2, VZV, EBV, CMV).

The antiherpetic effect of mangiferin is used in the drug “Alpizarin” (Farmcentr VILAR, Russia), which is currently represented on the pharmaceutical market of the Russian Federation. The problem of harvesting plant materials for the production of the drug remains unresolved. The main source is *Mangifera indica*. Part used: leaves. But mango trees in Russia do not grow, in this regard, it is necessary to search for new sources of raw materials.

The aim of these studies was to determine the content of mangiferin in regenerative plants and intact leaves *Iris sibirica* L. by HPLC.

The objects of research were plants-regenerants *Iris sibirica* L., grown in the Department of biotechnology of Altai state University.

0.5 g (precise linkage) chopped raw material is poured 50 ml of 60 % ethanol and extracted in a water bath for 1 hour was Filtered through a paper filter and the extraction repeated twice more for 30 min. the combined extract was evaporated to dryness and the residue was dissolved in 5 ml of 70 % ethanol. Separation of xanthenes was carried out by TLC. 0.05 ml of alcohol extract was applied to paper (sorbfil brand 10×10 mm) and dispersed in an ascending way in 40 % acetic acid. Then the dried chromatogram was viewed under UV irradiator brand Lenchrom at a wavelength of 254 nm.

Qualitative determination was performed by HPLC on the device Shimadzu with the parameters of the device. ZORBAX SB-C18 column (250×4.6 mm, 5 μ m) (Agilent). Wavelength 260–320 nm, the mobile phase solution a phosphoric acid (1 %) and solution B acetonitrile. Gradient 95–90 % solution A — 0 to 3 min, 90 % solution A — 3 to 7 min, 90–60 % solution of A — 7–15 min, 60–0 % solution — A 15 to 22 min. The volume of injection was 10 μ l. Flow rate 1 ml/min Temperature 22–240 °C.

As standard the sample used mangiferin “Sigma”. The absorption of the standard was established by HPLC at wavelengths of 260 nm, 320 nm and a retention time of 16,886 and 16,887, respectively. In the course of researches chromatograms of HPLC of the tested solution of regenerant plants with a retention time of 16,845 at a wavelength of 260 nm and 16,845 at a wavelength of 320 nm, and also leaves of intact plants with a retention time of 16,829 at a wavelength of 260 nm and 16,830 at a wavelength of 320 nm were obtained.

Thus, the content of mangiferin in plants-regenerants *Iris sibirica* L. was proved, which is an important achievement in solving the problem of biotechnological production of plant raw materials as a source of valuable antiviral compound.

Сравнительный анализ химического состава и биологической активности интактного растения и изолированной культуры *Amberboa sosnovskyi* ILJIN

Петросян М. Т., Саакян Н. Ж., Алоян С., Трчунян А.

Ереванский государственный университет, факультет биологии, кафедра биохимии, микробиологии и биотехнологии, ул. Алека Манукяна, 1, Ереван, 0025, Армения, тел.: (374) 99-20-12-33, e-mail: margaritpetrosyan@ysu.am

Род *Amberboa* принадлежит к семейству *Asteraceae*. Традиционно растения рода *Amberboa* использовались в качестве тонизирующего, жаропонижающего, антидиарейного, антипериодического, цитотоксического, противолихорадочного средства, а также против кашля и для лечения кожных заболеваний. Некоторые виды содержат сесквитерпены, которые обладают холинэстераз-ингибирующей активностью и могут быть использованы в качестве нейропротективных средств при болезни Альцгеймера. *A. sosnovskyi* ILJIN включен в Красную книгу Армении как исчезающий вид: встречается только в одном флористическом районе. Площадь роста менее 500 км². С этой точки зрения микроклонирование и биотехнологический метод получения ценных метаболитов представляет интерес. Целью настоящего исследования было проведение оптимизации условий роста *in vitro* культуры, оценка антиоксидантной активности *in vitro* и исследование химического состава интактных растений *A. sosnovskyi* и изолированной культуры. Исследуемое растение *A. sosnovskyi* было собрано из Арагатского Марза (Суренаван) Армении (800–820 м над уровнем моря) в период цветения. Каллусная культура была получена на базальной среде Мурасиге-Скута (МС), с добавлением 2,0 мг/л индол-3-уксусной кислоты (ИУК), 0,2 мг/л кинетина, но дальнейший рост поддерживался как на среде МС, так и на его модифицированном варианте (МР), с почти одинаковым содержанием ауксинов и цитокининов (0,5 мг/л ИУК, 0,2 мг/л кинетин и 0,2 мг/л 6-бензиламинопуридин (БАП)). Антирадикальная активность интактных растений и изолированных культур была исследована ДФПГ-тестом (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил), а метод газовой хроматографии с масс-спектрометрией (ГХ-МС) использовался для выявления химического состава. Согласно ГХ-МС анализу количественное и качественное содержание этанольных экстрактов интактных растений и каллусных культур довольно различно. Было выявлено 45 и 40 компонентов в интактных растениях и каллусной культуре, соответственно. В качестве основных компонентов в интактных растениях были выявлены 2,2-дибромохолестанон (15,39%) и пентадекановая кислота (6,96%). *In vitro* культура содержит пентадекановую кислоту (6,13%) и 2-фурануксусную кислоту (7,94%) в качестве основных компонентов. Пентадекановая кислота является насыщенной жирной кислотой, вырабатывается некоторыми растениями и действует как токсическое эфирное масло, известное своими транквилизирующими, антиноцицептивными и антимикробными свойствами. 2-фурануксусная кислота используется для лечения аутофаг-зависимых заболеваний, включая рак, нейродегенеративные заболевания, заболевания печени, мышечные заболевания и панкреатит. Эти исследования связаны с тем, что благодаря мониторингу условий культивирования можно урегулировать метаболические процессы изолированных культур растений.

Comparative analysis of *Amberboa sosnovskyi* ILJIN intact plant and isolated culture chemical composition and biological activity

Petrosyan M. T., Sahakyan N. Zh., Aloyan S., Trchounian A.

Department of Biochemistry, Microbiology & Biotechnology, Biology Faculty, Yerevan State University, 1 Manoogian st., 0025, Yerevan, Armenia, tel: (374) 99-20-12-33, e-mail: margaritpetrosyan@ysu.am

.....

The genus *Amberboa* belongs to the Asteraceae family. Traditionally plants of *Amberboa* genus have been used as tonic, febrifuge, anti-diarrheal, antiperiodic, antipyretic, cytotoxic, anti-cough agent and for the treatment of skin disorders. Some of species contain sesquiterpens, which possess cholinesterase inhibitory activity and can be used as neuroprotective agents against Alzheimer's disease. *A. sosnovskyi* ILJIN is included in the Red Data Book of Armenia as an endangered species and widely used in folk medicine: it occurs in one floristic region, the extent of occurrence and the area of occupancy are less than 500 km². Therefore, micropropagation and biotechnological methods of obtaining of valuable metabolites are also of interest. The aim of the present study was undertaking the optimization of growth conditions of *in vitro* cultures, evaluate the *in vitro* antioxidant activity and investigation of chemical composition of *A. sosnovskyi* intact plants and isolated culture. The investigated plant *A. sosnovskyi* was collected from Ararat region (Surenavan) in Armenia (800–820 m above sea level) during the flowering period. Callus culture was obtained on MS (Murashige and Skoog) basal medium, supplemented with 2.0 mg/l indole 3-acetic acid (IAA), 0.2 mg/l kinetin, but further growth was supported on both MS medium and its modified variant (MR medium) with approximately the same concentrations of auxins and cytokinins (0.5 mg/l IAA, 0.2 mg/l kinetin and 0.2 mg/l 6-benzylaminopurine (BAP)). The antiradical potential of intact plant and isolated culture was measured using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) assay and the gas chromatography mass selective analysis (GC-MS) was used to determine chemical composition. According to the GC-MS analysis the qualitative and quantitative composition of intact plant and callus culture ethanol extracts was quite different. It was determined the 45 and 40 compounds in intact plant and callus culture, respectively. The main components in the intact plant extract are 2,2-dibromocholestanone (15.39%), pentadecanoic acid (6.96%). The *in vitro* culture contains pentadecanoic acid (6.13%) and 2-furanacetic acid (7.94%) as the main components. The pentadecanoic acid is a saturated fatty acid and produced by certain plant species and acts as toxic essential oil, which is known to exhibit potential anxiolytic, antinociceptive and antimicrobial properties. 2-furanacetic acid is used for the treatment of autophagy-related diseases, including cancer, neurodegenerative diseases, liver diseases, muscle diseases and pancreatitis. These investigations lie under the fact that due to the monitoring of cultivation conditions it is possible to lead the metabolic processes of plant isolated cultures.

Коллекция штаммов лекарственных растений СПХФУ, как научная база для разработки инновационных лекарственных средств

Пивоварова Н. С., Пovyдыш М. Н., Каухова И. Е., Лужанин В. Г.

Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет Минздрава РФ, ул. профессора Попова, д. 14, лит. А, 197376, Санкт-Петербург, факс: +7(812)499-39-03, тел.: +7(812)499-39-00, e-mail: rector@spspa.ru

Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет является одним из старейших вузов России, выпускающих специалистов для фармацевтической отрасли. Здесь в 1961 г. под руководством Адель Федоровны Гаммерман и Раисы Георгиевны Бутенко была организована одна из первых в стране групп по культивированию *in vitro* клеток ценных и редких лекарственных растений. Благодаря коллекции растений Ботанического сада РАН впервые были получены штаммы женьшеня настоящего, панакса пятилистного, женьшеня японского. Позднее введен в коллекцию штаммов полисциас папоротниколистный, а также селективные штаммы, содержащие ценный микроэлемент германий, БАВ солодки голой, березы повислой, календулы лекарственной. Уникальность коллекции СПХФУ заключается в длительности существования и стабильности морфолого-физиологических и биохимических показателей сохраняемых штаммов.

Благодаря федеральной целевой программе по реконструкции и перевооружению, начиная с 2011 г. в университете появились новые научно-образовательные центры. В лаборатории культуры растительных клеток фактически полностью обновлена материально-техническая база. Пересмотрены подходы к технологии работы при пересадках. На сегодняшний день все открытые манипуляции с клетками выполняются в помещениях класса С, квалифицированных по стандарту GMP.

Основные направления деятельности лаборатории:

- проведение работ по организации лаборатории биотехнологического культивирования растительных клеток и тканей, а также производства биомассы с учетом требований GMP
- оценка возможности введения растительных объектов в культуру *in vitro* и обучение методам введения в культуру
- разработка оптимальных питательных сред и условий культивирования с целью получения штаммов — продуцентов БАВ
- разработка новых лекарственных средств и БАД на основе биомассы штаммов
- использование штаммов в качестве тест-систем для оценки безопасности наноматериалов, органических и неорганических веществ и лекарственных препаратов
- разработка нормативной документации (паспорт, лабораторный регламент) на штаммы-продуценты БАВ, регламентов на производство лекарственных препаратов и БАД на основе биомассы.

На базе лаборатории разработаны составы и технологии таких лекарственных средств, как: настойки, сухие экстракты, капли, эликсир, гранулы и гель для приема внутрь, дентальные и буккальные пленки, назальный гель, спрей и эмульсионные капли, микрокапсулы, ородиспергируемые таблетки. Для лекарственных средств разработаны спецификации показателей качества, определены сроки годности, разработаны технологические схемы получения и проекты нормативной документации

Таким образом, коллекция штаммов лекарственных растений СПХФУ является научной базой для сохранения и исследования морфолого-физиологического и биохимического состояния клеток ценных видов растений, а также для разработки инновационных лекарственных средств.

Tissue cultures of medicinal plants in SPCPU as a base for the development of innovative medicines

Pivovarova N. S., Povydysh M. N., Kauhova I. E., Luzhanin V. G.

Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical University of the Ministry of Public Health of the Russian Federation, 14 Professora Popova, let. A, 197376, Saint Petersburg, Russian Federation, fax: +7(812)499-39-03, tel.: +7(812)499-39-00, e-mail: rector@spcpa.ru

.....

The Saint-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University is the first institute of higher pharmaceutical education in Russia, the leader in training highly qualified specialists for the pharmaceutical and biotech industries.

In 1961 one of the first national collections of tissue cultures of rare non-native medicinal plants or plants with a limited habitat in Russia, headed by Adel Fedorovna Gammerman and Raisa Georgievna Butenko was established. On the base of the collection of the Komarov Botanical Garden (RAS), strains of *Panax ginseng* C. F. Mey, *P. quinquefolius* L., *P. japonicus* L., *Rauwolfia serpentina* Benth. were first obtained. Later the strain of *Polyscias filicifolia* (Moore ex Fournier) Bailey was introduced, and a number of selective strains containing a valuable trace element germanium and biologically active substances (BAS) of *Glycyrrhiza glabra*, *Betula pendula* and *Calendula officinalis* was first obtained. The uniqueness of the collection of SPCPU lies in the duration and stability of the morphological, physiological and biochemical parameters of the preserved strain.

Thanks to the Federal Target Program for the reconstruction and rearmament since 2011, new research and educational centers have appeared at the University. The material and technical base in the laboratory of plant cell cultures has been completely updated. Approaches to the technology of transplant operations were reviewed. Now, all open manipulations with cells are performed in class C premises, qualified according to the GMP standard.

The main activities of the laboratory are currently the following:

- assessment of the possibility of introducing plant objects into *in vitro* culture;
- optimization of growth media and environment for cultivation of BAS producing strains;
- development of novel drugs and nutritional supplements based on strain biomass;
- application of strains in safety testing of nanomaterials, drugs, organic and nonorganic compounds;
- development of regulatory documents (passport, laboratory regulations) for strains producing BAS, regulations for the production of medicines and dietary supplements based on biomass;
- GMP-compliant biomass production setup services.

Several new compositions and technologies of tinctures, dry extracts, drops, elixir, granules and gel, dental and buccal films, nasal gel, spray and emulsion drops, microcapsules, orodispersible tablets have been developed using plant tissue cultures. For all new medicines, specifications for quality indicators have been established, expiration dates have been determined, technological schemes for obtaining and draft regulatory documents have been developed.

Thus, the collection of strains of medicinal plants is a scientific basis for conservation and research of the morphological, physiological and biochemical status of cells of valuable plant species, as well as for the development of innovative medicines.

Оптимизация питательных сред при микроразмножении садовых культур

Плаксина Т. В.

Федеральный Алтайский научный центр агrobiотехнологий, Научный городок, 35, Барнаул, 656910, Россия, факс: +7(3852)68-50-65, тел.: +7(3852)68-45-75, e-mail: tplaksina@mail.ru

Микроразмножение растений *in vitro* широко используется во всем мире уже более 50 лет не только для решения фундаментальных вопросов, но в первую очередь является вспомогательным инструментом в селекционной работе, для создания генетических коллекций и сохранения самых разных видов растений. Это метод широко применяется в коммерческих целях для быстрого тиражирования новых гибридов, отборных форм и сортов цветочных, декоративных, плодовых и ягодных культур. Поиск путей снижения затрат на производство готовой продукции остается актуальным и одним из главных на сегодняшний день.

В связи с этим нами были проведены исследования по частичной замене в питательной среде дорогостоящего структурообразующего компонента агар-агара на картофельный крахмал для снижения себестоимости питательной среды. Для снижения потерь от микробной контаминации при культивировании растительных объектов в питательные среды вводили антибиотики: левомецитин, эритромицин, амоксициллин.

Объектами служили гибриды и сорт 'Памяти Левандовского' вишни степной; малина ремонтантная сорта 'Теракл', 'Атлант' и хризантема корейская группы мультифлора сорта 'Гармония' и 'Дафна'.

В результате проведенных исследований было установлено, что частичная замена агар-агара на крахмал в концентрации 4 г/л агар-агара + крахмал 20 г/л не влияет на количество листьев на побеге, длину побега у вишни, малины и хризантемы, но существенно оказывает влияние на размеры листовой пластинки у изучаемых культур. Они становились значительно крупнее, чем в контроле. Подобный состав структурообразующих веществ в среде, у гибридов вишни оказал влияние на коэффициент размножения (КР). Он увеличился в 1,6–4 раза по сравнению с контрольной средой. Для малины этот показатель на среде с крахмалом был аналогичен с контролем. У хризантемы сорта 'Гармония' КР был ниже в 1,6 раза, а у сорта 'Дафна' существенной разницы с контролем не выявлено.

Добавление в питательную среду антибиотика амоксициллина в концентрации 100–200 мг/л положительно влияло на рост и развитие растений вишни и малины. Так как данный антибиотик широкого спектра действия, то благодаря его присутствию в питательной среде растения были освобождены от бактериальной микрофлоры, активно росли, имели зеленые листья в отличие от других изучаемых антибиотиков, которые вызывали хлороз и пожелтение листьев и в целом угнетали рост. Наличие в среде амоксициллина 100 мг/л не снижало КР у малины по сравнению с контролем, а у вишни даже повышало его в 1,5 раза.

В заключении можно сделать вывод, что для снижения затрат на питательные среды возможна частичная замена агар-агара на картофельный крахмал. Предложенные концентрации структурообразующих веществ не только не ухудшают рост регенерантов, но и стимулируют рост адвентивных и боковых побегов у вишни степной, тем самым увеличивая КР. Для освобождения растений от бактериального загрязнения эффективно использовать антибиотик амоксициллин в концентрации 100–200 мг/л.

Nutrient media optimization in garden crops micropropagation

Plaksina T. V.

*Federal Altai Scientific Centre of Agro-BioTechnologies, 35 Nauchnyy gorodok, 656910, Barnayl,
Russian Federation, tel./ fax: +7(385-2)68-50-65, e-mail: tplaksina@mail.ru*

.....

In vitro propagation of plants has been widely used all over the world for more than 50 years not only to solve fundamental problems, but first of all is an method in breeding work, to create genetic collections and to preserve a variety of plant species. This method is widely used industry for rapid replication of new hybrids and varieties of ornamental, fruit and berry crops. Important task for today is to find the ways of reducing the cost of production of plants by *in vitro* methods.

In this regard, experiments on partial replacement of agar-agar as expensive structural component of nutrient medium by potato starch reduce the cost of technology have been carried out. Some antibiotics like levomycetin, erythromycin, amoxicillin have been added to medium to reduce losses from microbial contamination during the cultivation of plants.

As objects following hybrids and varieties have been taken: cherry — ‘*Pamjati Lewandovskogo*’; remontant raspberry — ‘*Hercules*’, ‘*Atlant*’; chrysanthemum korean (multiflora group) — ‘*Harmoniya*’ and ‘*Daphna*’.

As a result of research it has been found out that the partial replacement of agar-agar by starch at a concentration of 4 g/l agar-agar + starch 20 g/l does not affect the number of leaves on the shoot, the length of shoot, but significantly affects the size of the leaves of studied cultures. They became much larger compare to control. That composition of the medium, had effect on coefficient of multiplication of cherry hybrids. It increased by 1.6–4.0 times compare to control. At raspberry, this indicator on medium with starch was similar to control medium. Coefficient of multiplication on chrysanthemum variety ‘*Harmoniya*’ was 1.6 times lower, when ‘*Daphna*’ variety has not significant difference to control.

Addition of antibiotic amoxicillin at concentration of 100–200 mg/l had a positive effect on the growth and development of cherry and raspberry plants. Since this antibiotic is wide-spectrum effect, the plants on such medium were free of bacterial microflora, had active growth and green leaves compare to the rest studied antibiotics, which caused chlorosis and yellowing of leaves and generally inhibited growth. The presence in the environment of amoxicillin 100 mg l did not reduce the coefficient of multiplication on raspberry compare to control, while cherry even increased it by 1.5 times.

In conclusion it must be noted that to reduce the cost of nutrient media partial replacement of agar-agar by potato starch is possible. Proposed concentrations of substances do not reduce the growth of regenerants, but stimulate the growth of adventive and lateral shoots on cherry, thereby increasing the coefficient of multiplication. To control bacterial contamination, the antibiotic amoxicillin at concentration of 100–200 mg/l is recommended.

Воздействие наночастиц серебра, полученных на основе «зеленого» наносинтеза, на развитие корневой системы микрорклонов *Salix fragilis* L. и контаминацию патогенными грибами в культуре *in vitro*

Пржевальская Д. А.^{1,*}, Черныш М. А.¹, Костень А. А.¹, Колбанов Д. В.², Демидчик В. В.¹

¹ Белорусский государственный университет, пр-т Независимости, 4, Минск, 220030, Беларусь, факс: +375(17)209-58-08, тел.: +375(17)209-58-84

² Республиканское учебно-опытное унитарное предприятие БГУ «Щемяслица», ул. Жуковского, 15 а, аг. Щемяслица, Минский р-н, 223049, Беларусь, тел.: +375(17)509-32-56

* e-mail: daryaprzhevalskaya@gmail.com

Наносеребро, полученное при помощи «зеленого» наносинтеза и с использованием биосовместимых реагентов, обладает рядом свойств, имеющих значительный интерес как с точки зрения фундаментальной науки, так и для прикладных разработок. Одним из направлений использования серебряных наночастиц, полученных с применением таких технологий является разработка новых регуляторов роста растений. Наши результаты (Sosan *et al.*, 2016, Plant Journal) и некоторые литературные данные указывают на росто- и иммуностимулирующую активность серебряных наночастиц, введенных в среду выращивания в очень низких концентрациях. Имеется также большое число работ, демонстрирующих биоцидную активность серебряных наночастиц для различных видов бактерий и грибов. Рассматривая данные свойства серебряных наночастиц нами была выдвинута гипотеза, согласно которой они могут являться эффективным средством для повышения уровня жизнеспособности и укоренения черенков древесных растений, а также в качестве биоцидного препарата против контаминирующих инфекций, повреждающих растения в условиях *in vitro*. Таким образом, целью настоящей работы являлось установить характер воздействия наночастиц серебра на формирование и рост корневой системы древесных растений в условиях *in vitro* при параллельном анализе их биоцидной активности по отношению к ключевым контаминирующим грибным инфекциям, таким как *Penicillium sp.* и *Aspergillus sp.* Объектом исследования являлась культура *in vitro Salix fragilis* L., культивируемая на 100% среде Woody Plant Medium (WPM; Duchefa) с добавлением 0,3–300 мг/л наночастиц серебра. Для синтеза наночастиц серебра использовались методы «зеленого» наносинтеза. В качестве восстановителя использовались L-аскорбиновая кислота и экстракт ели. Поливинилпирролидон (ПВП), полимер, отличающийся высокой биосовместимостью, использовался в качестве стабилизатора наночастиц. Было испытано несколько протоколов наносинтеза, отобраны наиболее эффективные. На средах с введенными наночастицами в различных концентрациях анализировалось изменение длины корней и побегов, а также диаметр колоний грибов *Penicillium sp.* и *Aspergillus sp.*, контаминирующих культуру при нарушении стерильных условий (на 14 сут). Было продемонстрировано, что наночастицы, приготовленные на основе L-аскорбиновой кислоты, в концентрации 3 мг/л стимулируют рост корней и побегов *Salix fragilis* L. и индуцируют корневое ветвление. Для наночастиц, полученных с помощью экстракта ели наблюдались схожие результаты. Выраженное фунгицидное действие проявлялось на средах, содержащих 100 и 300 мг/л наночастиц, полученных на основе L-аскорбиновой кислоты, и 300 мг/л наночастиц, полученных на основе экстракта ели. Таким образом, в ходе проведенных исследований можно сделать следующие выводы: серебряные наночастицы, полученные с использованием методов «зеленого» синтеза, оказывают стимулирующее действие на рост корневой системы древесных растений в условиях *in vitro*, а также индуцируют корневое ветвление в концентрации 0,3–3 мг/л; высокие концентрации серебряных наночастиц 100–300 мг/л обладают фунгицидной активностью по отношению к плесневым грибам *Penicillium sp.* и *Aspergillus sp.*

The effect of silver nanoparticles obtained on the basis of “green” nanosynthesis on the development of the root system of microclones *Salix fragilis* L. and contamination by pathogenic fungi in culture *in vitro*

Przhevalskaya D. A.¹, Charnysh M. A.¹, Kosten A. A.¹, Kolbanov D. V.², Demidchik V. V.¹

¹ Belarusian State University, 4 Nezavisimosti ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus, fax: +375(17)209-58-08, tel.: +375(17)209-58-84

² Republican educational and experimental unitary enterprise of BSU “Schemyslitsa”, 15-A Zhukovsky st., a. Shchomyslitsa, 223049, Minsk district, Republic of Belarus, tel. (017) 509-32-56

* e-mail: daryaprzhevalskaya@gmail.com

.....

The nanosilver obtained with the help of “green” nanosynthesis and using biocompatible reagents possesses a number of properties that are of considerable interest both from the point of view of fundamental science and for applied developments. One of the directions of using silver nanoparticles obtained with the use of such technologies is the development of new plant growth regulators. Our results (Sosan et al., 2016, Plant Journal) and some published data indicate the growth and immunostimulating activity of silver nanoparticles introduced into the growth medium at very low concentrations. There is also a large number of works demonstrating the biocidal activity of silver nanoparticles for various species of bacteria and fungi. Considering these properties of silver nanoparticles, we hypothesized that they can be an effective means for increasing the viability and rooting of cuttings of woody plants, and also as a biocidal preparation against contaminating infections that damage plants *in vitro*. Thus, the purpose of this work was to establish the nature of the effect of silver nanoparticles on the formation and growth of the root system of woody plants *in vitro* in a parallel analysis of their biocidal activity against key contaminant fungal infections, such as *Penicillium sp.* and *Aspergillus sp.* The object of the study was the *in vitro* culture of *Salix fragilis* L., cultivated in 100 % Woody Plant Medium medium (WPM; Duchefa) supplemented with 0.3–300 mg/l silver nanoparticles. For the synthesis of silver nanoparticles, the methods of “green” nanosynthesis were used. As a reducing agent, L-ascorbic acid and spruce extract were used. Polyvinylpyrrolidone (PVP), a polymer with a high biocompatibility, was used as a stabilizer of nanoparticles. Several protocols of nanosynthesis were tested, the most effective ones were selected. On media with nanoparticles introduced at various concentrations, the change in the length of roots and shoots, as well as the diameter of the colonies of fungi *Penicillium sp.* and *Aspergillus sp.*, contaminating the culture in violation of sterile conditions (by 14 days). It was demonstrated that nanoparticles prepared on the basis of L-ascorbic acid at a concentration of 3 mg/l stimulate the growth of roots and shoots of *Salix fragilis* L. and induce root branching. Similar results were observed for nanoparticles obtained with the help of spruce extract. The pronounced fungicidal effect was manifested on media containing 100 and 300 mg/l of L-ascorbic acid-derived nanoparticles and 300 mg/l of nanoparticles obtained from spruce extract. Thus, during the conducted researches it is possible to draw the following conclusions: silver nanoparticles obtained using the methods of “green” synthesis have a stimulating effect on the growth of the root system of woody plants under *in vitro* conditions, and induce a root branching at a concentration of 0.3–3 mg/l; high concentrations of silver nanoparticles of 100–300 mg/l have fungicidal activity against mold fungi *Penicillium sp.* and *Aspergillus sp.*

Биохимическое изучение и биотехнологическое использование асептических коллекционных фондов аборигенных и интродуцированных растений

Решетников В. Н.

*Центральный ботанический сад НАН Беларуси, ул. Сурганова, 2 в, Минск, 220012, Беларусь,
тел./факс: +375(17)284-14-61, e-mail: V.Reshetnikov@cbg.org.by*

.....

В настоящее время коллекционные фонды ботанических садов формируются как на традиционной основе, так и с использованием новаций в ботанической науке — клеточной биологии и приемов биотехнологий. Выбор и включение видов растений в биотехнологические коллекции (кроме редких и охраняемых) в большинстве случаев должен осуществляться на знании индивидуальных особенностей биосинтеза групп, отдельных соединений и веществ, обладающих уникальными свойствами. Биохимический подход используется при формировании асептических коллекций Центрального ботанического сада НАН Беларуси. В частности, была создана коллекция интродуцированных видов и сортов семейства Брусничные, пажитника греческого и расторопши для последующего использования в науке и практике.

Детальное изучение антоцианового комплекса голубики (совместно с А. Деевой) дало возможность рекомендовать отдельные сорта этой культуры для закладки промышленных плантаций с одновременным производством посадочного материала клональным микроразмножением (совместно с В. Филипеня, О. Чижик, Т. Мазур). Селекционная работа с коллекционным фондом пажитника греческого привела к созданию (совместно с Е. Спиридович, Е. Агабалаевой и венгерским специалистом Ш. Макай) сорта этой культуры для приусадебного использования. Биохимическое изучение новых форм и сортов расторопши пятнистой (совместно с О. Ковзуновой и учеными БГУ В. Курченко и др.) показало возможность изменения состава силимарина и получения форм этого растения, накапливающего преимущественно особо активные составные части этого фенольного комплекса.

Важным направлением исследований явилась сравнительная протеомная и метаболомная характеристика эксплантов и полученных из них каллусов и клеточных культур. Обнаружено изменение гетерогенности ДНК-связывающих и других ядерных белков, оказывающих влияние на экспрессию генома и метаболические процессы в дедифференцированных клетках каллусов и клеточных культур. Результаты исследований являются научной базой для прикладных направлений биотехнологии растений.

Biochemical study and biotechnological use of aseptic collection funds of aboriginal and introduced plants

Reshetnikov V. N.

Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, 2v Surganova st., 220012, Minsk, Republic of Belarus, tel./fax: +375(17)284-14-61, e-mail: V.Reshetnikov@cbg.org.by

.....

Currently, collection funds of botanical gardens are formed both on a traditional basis and using innovations in botanical science — cell biology and biotechnology techniques. The selection and inclusion of plant species in biotechnological collections (except rare and protected) in most cases should be carried out on the knowledge of individual characteristics of the biosynthesis of groups, individual compounds and substances possessing unique properties. The biochemical approach is used in the formation of aseptic collections of the Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus. In particular, a collection of introduced species and varieties of Ericaceae, fenugreek and milk thistle for later use in science and practice.

A detailed study of the anthocyanin blueberry complex (with A. Deeva) made possible to recommend certain varieties of this crop for the creation of industrial plantations with the simultaneous production of planting material by clonal micropropagation (with V. Filipenya, O. Chizhik, T. Mazur). Selective work with the collection of fenugreek fund led to the creation (with E. Spiridovich, E. Agabalaeva and the Hungarian specialist Sh. Makai) varieties of this crop for personal use. The biochemical study of new forms and varieties of milk thistle (with O. Kovzunova and scientists from BSU V. Kurchenko and others) showed the possibility of changing the composition of silymarin and obtaining the forms of this plant, which accumulates mainly highly active constituent parts of this phenolic complex.

An important direction of research was the comparative proteomic and metabolic characteristics of explants and derived from them callus and cell cultures. A change in the heterogeneity of DNA-binding and other nuclear proteins that affect genome expression and metabolic processes in dedifferentiated cells of callus and cell cultures has been observed. The results of the research are the scientific basis for applied areas of plant biotechnology.

Антиоксидантная активность *in vitro* культуры *Ajuga genevensis* L.

Саакян Н. Ж., Петросян М. Т., Трчунян А.

Ереванский государственный университет, факультет биологии, кафедра биохимии, микробиологии и биотехнологии, ул. Алека Манукяна, 1, Ереван, 0025, Армения, тел. +374(93)72-02-29, e-mail: sahakyanaira@ysu.am

.....

По мнению многих ученых, оксидативный стресс содействует развитию патогенеза различной формы, однако тысячи исследований подтверждают протективное или терапевтическое влияние антиоксидантов в клеточной или иной модели возрастных заболеваний. Одной из задач биотехнологии, фармакологии, пищевой и косметической индустрии является получение биологически активных веществ растительного происхождения, которые обладают высоким терапевтическим действием без видимых побочных эффектов. Флора Армении богата растениями, которые могут быть использованы в медицине, пищевой и косметической индустрии. Однако ценность изолированных культур растений значительно выше поскольку *in vitro* культуры не только обладают способностью вырабатывать вещества, присущие интактным растениям, но также, при определенных условиях могут синтезировать соединения не специфические данному виду растений в природных условиях. Более того, возможность получения соединений растительного происхождения зачастую ограничена в связи с тем, что многие растения могут принадлежать к группам эндемиков, редких и исчезающих видов. Таким образом, клеточные культуры растений являются альтернативными источниками получения биологически активных соединений. Род *Ajuga* включает более 50 видов растений 4 из которых произрастают в Армении. Целью данного исследования явилось изучение антиоксидантных свойств каллусной культуры *A. genevensis*. Каллусная культура *A. genevensis* была получена из листовых эксплантов и дальнейший рост поддерживался как на среде Мурасиге-Скуга (МС) (с добавлением 2 мг/л индол-3-уксусной кислоты и 0,2 мг/л кинетина) так и его модифицированном варианте с добавлением 2,4-дифеноксиуксусной кислоты (2,4-Д). Антирадикальная активность этанольного, метанольного, ацетонового, хлороформного и водного экстрактов была протестирована ДФПГ-тестом (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил), выявлением металл-хелатирующей способности и фотохемилюминесцентным методом. Антиоксидантная активность была исследована с использованием теста определения малонового диальдегида. Некоторые механизмы антиоксидантного действия были изучены с использованием генно-инженерных штаммов *E. coli*. Наши исследования показали, что и антирадикальная, и антиоксидантная активности каллусной культуры *A. genevensis*, растущей на питательной среде содержащей 2,4-Д почти вдвое выше, что указывает на возможность направления метаболизма изолированной культуры под воздействием внешних факторов.

The antioxidant activity of *Ajuga genevensis* L. *in vitro* culture

Sahakyan N., Petrosyan M., Trchounian A.

Department of Biochemistry, Microbiology & Biotechnology, Biology Faculty, Yerevan State University, 1 Manoogian st., 0025, Yerevan, Armenia, tel. +374(93)72-02-29, e-mail: sahakyanaira@ysu.am

.....

Oxidative stress is considered to be a contributor to pathogenesis but thousands of studies have reported protective or therapeutic effects of antioxidants in cellular or other models of age related diseases. One of the tasks in biotechnology, pharmacology, food and cosmetic industry is obtaining of biologically active substances from plants which possess actually high therapeutic value without visible side effects. Armenian flora is rich of plants which can be used in traditional and modern medicine, food, cosmetics. The significance of plant isolated cultures is higher, because plant *in vitro* cultures not only possess the ability to synthesize metabolite which are specific to intact plants but also during the monitored cultivation it is possible to obtain substances that are not specific to the plants in nature. Moreover, sometimes the possibility of obtaining the plant origin substances is limited due to the belonging of wild-growing plants to the endemics, scarce or endangered groups. So, the plant cell cultures are of great interest as alternative sources of biologically active substances. Genus *Ajuga* includes over 50 species among which 4 species grow in Armenia. *A. genevensis* is of great interest due to expressed biological activity. The aim of this study was to investigate the antioxidant activity of *A. genevensis* callus culture. The *A. genevensis* callus culture was obtained from leave explants and the further growth was supported on both Murasige-Skoog (MS) nutrient medium (which contained 2 mg/l indole-3-acetic acid and 0.2 mg/l kinetine) and it's modified variant, contained 1 mg/l 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). The antiradical activity of callus extracts (ethanol, methanol, propanone, water, chlorophorm) was tested using DPPH-assay, metal-chelating property determination and photochemiluminescent method. The antioxidant activity was determined using TBARs-assay. Some mechanisms of antioxidant activity were studied using *E. coli* gene-engineered strains. Our investigations show that both antioxidant and antiradical activity of *A. genevensis* callus culture, growing on nutrient medium containing 2,4-D is higher approximately two fold, which indicates the possibility of directing the metabolism of isolated culture under the influence of external factors.

Ценные лекарственные растения флоры Узбекистана и способы их сохранения

Сагдуллаев Ш. Ш.

Институт химии растительных веществ им. акад. С. Ю. Юнусова АН РУз,
ул. М. Улугбека, 77, Ташкент, 100170, Узбекистан, e-mail: ixrv@mail.ru

Институт химии растительных веществ им. акад. С. Ю. Юнусова Академии наук Республики Узбекистан является крупнейшим научно-исследовательским центром по фитохимическому исследованию флоры Центральной Азии. С начала основания института (1956 г.) было выявлено огромное количество веществ различных классов: выделено и установлено строение 1300 алкалоидов, из них 650 новых; более 1000 изопреноидов, из которых 450 новых, 500 фенольных соединений, из которых 270 новых. Проведены клинические испытания 60 лекарственных препаратов и биологически активных добавок, 35 препаратов рекомендованы для использования в медицинской практике Фармакологическим Комитетом СССР и Фармакологическим Комитетом Республики Узбекистан.

Все возрастающий спрос на лекарственные препараты растительного происхождения диктует поиск новых источников биологически активных соединений без нанесения ущерба природным ресурсам.

С целью рационального использования растительного сырья в институте проводится работа по изучению естественных запасов ценных лекарственных видов, по введению их в культуру. Интродукция новых перспективных растений может стать не только источником лекарственного сырья для фармацевтической промышленности. Проведена интродукция таких ценных в практическом плане видов, как *Artemisia leucodes*, *Psoralea drupacea*, *Ferula tenuisecta*. Выявлены запасы эндемиков Гиссарского хребта — *Ungernia victoris* и *Ajuga turkestanica*. Данные виды являются ценными источниками получения лекарственных препаратов и БАДов. *Ungernia victoris* является сырьем для производства препарата галактомин, на основе растения *Ajuga turkestanica* (Rgl.) Briq. (Lamiaceae) нарабатывается тонизирующий и адаптогенный препарат экдистен, БАДы — аюстан и эксумид, а также субстанция биологической добавки к кремам — жистенин.

В качестве дополнительного источника сырья при получении продуктов вторичного метаболизма могут служить клетки, культивируемые *in vitro*. В институте проводятся работы по разработке технологии получения клеточных культур эндемичных видов растений. Выявлено, что культура тканей и клеток *Ajuga turkestanica* сохраняет биосинтез экдистероидов: экдистерона и туркестерона. Изучено влияние фиторегуляторов на рост и морфогенез каллусной и суспензионной культуры клеток, установлено влияние процессов дифференциации на их продуктивность. Выявлено влияние состава питательной среды и происхождения каллуса на выход экдистероидов.

Растения рода *Astragalus* продуцируют свободные и гликозилированные формы циклоартанов. Широкий спектр физиологической активности этих веществ открывает большие перспективы для практического использования в качестве лекарств и биопрепаратов. Проводится работа по разработке условий культивирования растений *Astragalus lehmannianus*, *A. Babatagi*.

Valuable medicinal plants of the flora of Uzbekistan and ways to preserve them

Sagdullaev Sh. Sh.

Acad. S. Yu. Yunusov Institute of the Chemistry of Plant Substances of the Academy of Sciences of Uzbekistan, 77 Ulugbek st., 100170, Tashkent, Uzbekistan,
fax: +998(371)120-64-75, tel.: +998(371)262-59-13, e-mail: ixrv@mail.ru

.....

The Institute of Chemistry of Plant Substances. acad. S. Yu. Yunusov Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan is the largest research center on phytochemical research of the flora of Central Asia. Since the foundation of the institute (1956), a large number of substances of various classes have been identified: a structure of 1300 alkaloids has been identified and installed, of which 650 new; more than 1000 isoprenoids, of which 450 are new, 500 phenolic compounds, of which 270 are new. Clinical trials of 60 drugs and biologically active additives, 35 drugs recommended for use in medical practice by the Pharmacological Committee of the USSR and the Pharmacological Committee of the Republic of Uzbekistan.

The increasing demand for herbal medicines dictates the search for new sources of biologically active compounds without damaging natural resources.

With the purpose of rational use of plant raw materials, the Institute is working on the study of natural stocks of valuable medicinal species and their introduction into culture. The introduction of new promising plants can become not only a source of medicinal raw materials for the pharmaceutical industry. It have been introduced such valuable species as *Artemisia leucodes*, *Psoralea drupaceae* and *Ferula tenuisecta*. The reserve of the endemic species of the Hissar Range — *Ungernia victoris* and *Ajuga turkestanica* have been identified. These species are valuable sources of medicines and dietary supplements. *Ungernia victoris* is the raw material for the production of the galactomin preparation, based on the plant *Ajuga turkestanica* (Rgl.) Briq. (Lamiaceae), a toning and adaptogenic ecdystene is produced, dietary supplements — austin and exumide, as well as a substance of the biological additive to creams — zistenin.

As an additional source of raw materials for the production of products of secondary metabolism, cells cultivated *in vitro* can serve. The Institute is working on developing a technology for obtaining cell cultures of endemic plant species. It was revealed that the tissue culture of *Ajuga turkestanica* cells retains the biosynthesis of ecdysteroids: ecdysterone and turcesteron. The influence of phyto regulators on growth and morphogenesis of callus and suspension cell culture was studied, the influence of differentiation processes on their productivity was established. The influence of the composition of the nutrient medium and the origin of the callus on the yield of ecdysteroids was revealed.

Plants of the genus *Astragalus* produce free and glycosylated forms of cycloartanes. A wide range of physiological activity of these substances opens great prospects for practical use as drugs and biologics. Work is underway to develop the conditions for the cultivation of plants *Astragalus lehmannianus*, *A. Babatagi*

Анализ стресс-индуцированного выхода ионов калия из клеток корня высших растений, культивируемых *in vitro*, с помощью метода меченых атомов

Самохина В. В., Мацкевич В. С., Соколик А. И., Демидчик В. В.

Белорусский государственный университет, биологический факультет, кафедра клеточной биологии и биоинженерии растений, ул. Курчатова, 10, Минск, 220030, Беларусь, тел.: +375(17)209-59-12, факс: +375(17)209-58-08, e-mail: veronika.bukhovets@gmail.com

Присутствие стресс-факторов в среде может приводить к потере электролитов, основным среди которых является ион калия (K^+). Недавние исследования показали, что это явление вызывается активацией K^+ -каналов GORK под действием активных форм кислорода (АФК). Нами был идентифицирован АФК-чувствительный центр в структуре GORK (Цис-151), который может быть потенциально ответственен за активацию канала под действием АФК при стрессе. Была проведена генетическая модификация данного центра — замена аминокислоты мишени АФК — цистеина (Цис) на редокс-инертный серин (Сер). Целью работы было тестирование выхода калия из клеток корня *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. с помощью радиоактивно-меченного трейсера ($^{86}Rb^+$) и сравнение его у растений, обладающих нативным и генетически модифицированным Цис-151. Также в задачи работы входил анализ стрессоустойчивости данных растений с использованием высокоэффективной системы замены среды без переноса растений. Объектом исследования являлись корни проростков арабидопсиса 4 линий: 1) дикий тип WS-0; 2) нокаутные мутанты *gork1-1*, лишенные функционального белка GORK, кодирующего наружу-выпрямляющий K^+ -канал; 3) *gork1-1* с возмещенным нативным GORK; 4) *gork1-1*, экспрессирующие GORK с заменой Цис-151 на Сер-151 (C151S). Для ростового теста культура *in vitro* целых растений выращивалась в течение 4 сут. Далее производилась замена части среды на аналогичную с добавлением стрессора (NaCl, Cu^{2+} /аскорбат, H_2O_2). Измерялся ежедневный прирост главного корня. Для регистрации и анализа кинетических параметров выхода калия из клеток корня арабидопсиса в работе был использован трейсер K^+ — $^{86}Rb^+$ в форме хлорида (POLATOM; Польша). Было показано, что у растений дикого типа выход $^{86}Rb^+$ ускорялся под действием NaCl в 5 раз, Cu^{2+} /аскорбат (смесь, генерирующая гидроксильные радикалы — $HO\cdot$) в 3 раза, H_2O_2 в 2,5 раза. Близкие значения увеличения скорости выхода изотопа были зарегистрированы в случае растений *gork1-1* с возмещенным GORK. В то же время, скорость стресс-индуцируемого потока $^{86}Rb^+$ была в 2 раза ниже у нокаутов по K^+ -каналу *gork1-1*, а также у *gork1-1*, экспрессирующих GORK с заменой C151S. Эти данные свидетельствуют о том, что GORK напрямую вовлекается в выход K^+ в ответ на обработку NaCl, H_2O_2 и смесями, генерирующими АФК (Cu^{2+} /аскорбат). При этом сенсором выступает Цис-151. Также было протестировано влияние вышеперечисленных стрессоров, введенных в среду выращивания, на скорость роста корней арабидопсиса (опыты с заменой среды). Линии арабидопсиса *gork1-1* и *gork1-1*, экспрессирующие GORK-C151S, демонстрировали пониженную чувствительность к протестированным стрессорам. Таким образом, в ходе проведенных опытов было установлено, АФК-чувствительный центр в структуре GORK (Цис-151) имеет ключевое значение в активации K^+ -каналов GORK под действием АФК при солевом и окислительном стрессе. Устранение функционального Цис-151 вызывало значительное снижение чувствительности растений к солевому и окислительному стрессу.

Analysis of the stress-induced efflux of potassium ions from root cells of higher plants cultivated *in vitro*, using radioactively-labelled ions

Samokhina V. V., Mackievic V. S., Sokolik A. I., Demidchik V. V.

Belarusian State University, Biological Faculty, Department of Plant Cell Biology and Bioengineering, 10 Kurcatava st., 220030, Minsk, Republic of Belarus, tel.: +375 (17) 209-59-12, fax: +375 (17) 209-58-08, e-mail: veronika.bukhovets@gmail.com

One of the key reaction of plant roots in response to abiotic and biotic stresses is electrolyte leakage, which is mediated by the efflux of K^+ and anions. It was recently shown that this reaction is induced by reactive oxygen species (ROS) generated by NADPH oxidases and some other redox enzymes. Potassium leakage component in a major one in the total electrolyte loss. At the cellular level, K^+ efflux from roots, under stress conditions, is mediated by K^+ efflux channels encoded by gene *gork1-1*. Our recent studies demonstrated the presence of an ROS-sensitive center directly incorporated into the channel GORK. This center is potentially responsible for the activation of K^+ channels in response to generation of ROS. This center is based on the ROS-sensitive amino acid Cysteine 151 (Cys-151). Its bioengineered replacement or complete of functional GORK can potentially lead to a change in both the K^+ efflux and general sensitivity of the root cells to ROS. Here, we have designed an assay based on $^{86}Rb^+$ loading to roots with subsequent recording the efflux to examine the structure-function relationship of K^+ channels and confirm the structure of the GORK's ROS-sensitive moieties. We have tested the modification of stress-induced efflux of K^+ caused by substitution of Cys-151 (to Ser) in ROS-sensitive center of K^+ channel GORK using *Arabidopsis thaliana* roots (*in vitro* vertical culture of whole plants). Additionally, we have measured effects of Cys-to-Ser substitution at 151 on growth rate of *in vitro* whole plant culture in response to H_2O_2 , NaCl and hydroxyl radicals. The *in vitro* culture of *Arabidopsis* was grown vertically during four days on a surface of sterilized gel medium, which contained Murashige and Skoog medium, sucrose and Phytigel. Then a part of the medium below the level of root tips was cut out and replaced with a medium containing H_2O_2 , NaCl and hydroxyl radical-generating mixtures (1 mM Cu^{2+} , 1 mM L-ascorbate; Cu/a). Daily increment of root length was measured during 6 days. To determine K^+ efflux we used radiotracer $^{86}Rb^+$ ($t_{1/2}=18.64$ d) as chloride (Radioisotope Centre POLATOM, Poland). In wild type (WT) plants, $^{86}Rb^+$ efflux rates increased by 5, 3 and 2,5 times in response to salinity, Cu/a stress and H_2O_2 , respectively (as compared to control). In GORK knockouts *gork1-1*, stress-induced $^{86}Rb^+$ rates were approximately half that of wild type. Lines with substitution of Cys151 to Ser in GORK (GORK-C151S) demonstrated $^{86}Rb^+$ efflux rate, which was similar to *gork1-1*. This indicates that Cys151 is crucial for activation of ROS- and NaCl-induced K^+ efflux. Complementation of *gork1-1* mutation with functional GORK recovered wild type phenotype. Further we tested the effect of H_2O_2 , NaCl and hydroxyl radical-generating mixtures introduced into the medium during growth (medium replacement). Root growth in wild type plants and *gork1-1* complemented with functional GORK was significantly inhibited. At the same time, root growth was not arrested in knockouts of K^+ channel GORK, as well as lines with substitution of Cys151 to Ser in GORK. Thus, the substitution of Cys151 contributed to K^+ efflux after introducing tested agents and to the suppression of the inhibiting effect on the main root growth. In conclusion, we have found that K^+ channel GORK, which contains ROS-sensitive moiety Cys151, is responsible for ROS- and salinity-induced K^+ leakage and potentially involved in the regulation of root growth.

Морфологические особенности межвидовых гибридов сахарной свёклы

Сащенко М. Н., Подвигина О. А.

Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свёклы и сахара
им. А. Л. Мазлумова, пос. ВНИИСС, д. 86, 396030, Рамонский район, Воронежская область, Россия,
+7(920)427-29-40, samani84@mail.ru

.....

Дикорастущие виды сахарной свёклы обладают многими ценными для селекции признаками: холодо- и зимостойкостью, апомиктическим способом размножения, устойчивостью к болезням (вирусная желтуха листьев, церкоспороз, курчавость верхушки) и неблагоприятным условиям произрастания (низким температурам, засухе и др.).

Однако использование диких видов свёклы для гибридизации с сахарной свёклой осложнено разницей в периодах цветения скрещиваемых видов, их анатомо-морфологическими и генетическими различиями, обуславливающими несовместимость исходных растений.

Для преодоления естественных барьеров несовместимости разработаны методы изолирования и выращивания в условиях *in vitro* зигот, незрелых зародышей и семян, что позволило получить фертильные растения межвидовых и межродовых гибридов. Метод культуры незрелых зародышей используется тогда, когда невозможно эффективно получить определенную генетическую комбинацию желаемых признаков традиционными методами.

Материалом для исследований служили селекционные МС — образцы отдела селекции на фертильной основе и растения дикого вида *B. corolliflora* с признаком апомиктического размножения. Опыление проводилось в полевых условиях заранее собранной пылью дикого вида свёклы. После проведения принудительного опыления растения этикетировались и помещались под индивидуальные изоляторы.

Культивирование *in vitro* проростков от межвидовых скрещиваний выявило наличие морфологических признаков дикой свёклы. Растения имели длинночерешковые листья стреловидной, ланцетовидной формы, цельнокрайние, остроконечные и гофрированные. У части микроклонов наблюдалась четко выраженная антоциановая окраска черешков листьев.

Цитологический анализ пloidности полученных регенерантов выявил разнокачественность материала. Так, микроклоны, имеющие характерные признаки дикой свёклы, имели триплоидный набор хромосом, а растения, наследуемые материнские признаки, — диплоидный.

В результате проведенных исследований был получен ценный селекционный материал, объединяющий в своей наследственности различные ценные признаки и свойства культурных и дикорастущих видов. В настоящее время изучение данных растений-регенерантов продолжается.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о возможности применения метода эмбриокультуры при создании принципиально новых растений на основе отдаленной гибридизации.

Morphological features of interventional hybrids sugar beets

Sashchenko M. N., Podvigina O. A.

The A. L. Mazlumov All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar, 86 VNIISS, 396030, Ramonsky district, Voronezh region, Russian Federation, +7(920)427-29-40, samani84@mail.ru

.....

Wild-growing species of sugar beet have many valuable for breeding at-signs: cold and winter hardiness, apomictic way of reproduction, resistance to diseases (viral jaundice leaves, cercosporosis, curlewism of the apex) and unfavorable conditions of growth (low temperatures, drought, etc.).

However, the use of wild beet species for hybridization with sugar beets is explained by the difference in the periods of flowering of the crossed species, their anatomo-morphological and genetic differences, which cause the incompatibility of the original plants.

To overcome natural barriers of incompatibility, methods for isolating and growing *in vitro* zygotes, immature embryos and ovules were developed, which made it possible to obtain fertile plants of interspecific and intergeneric hybrids. The method of culture of immature embryos is used when it is impossible to effectively obtain a certain genetic combination of the desired features by traditional methods.

The material used for the studies was selective MC samples from the fertile selection department and wild-type *B. corolliflora* plants with the sign of apomictic multiplication. Pollination was carried out in the field in advance collected by pollen of wild beet. After the forced pollination, the plants were ethicized and placed under individual insulators.

Cultivation *in vitro* of seedlings from interspecies crossings revealed the presence of morphological signs of wild beet. The plants had long-petioled leaves of sagittate, lanceolate form, entire, pointed and corrugated. A part of microclones showed a pronounced anthocyanin color of the petioles of the leaves.

Cytological analysis of the ploidy of the regenerants obtained revealed a different quality of the material. Thus, microclones with characteristic features of wild beet, had a triploid set of chromosomes, and plants inherited maternal signs — diploid.

As a result of the studies, a valuable selection material was obtained, combining in its heredity various valuable characteristics and properties of cultivated and wild-growing species. Currently, the study of plant regeneration data continues.

Thus, the obtained results testify to the possibility of using the embryoculture method for the creation of fundamentally new plants based on remote hybridization.

Получение и оценка растений регенерантов от слияния протопластов *Solanum tuberosum* и *Solanum neoantipoviczii*

**Семанюк Т. В., Дубинич В. Л., Кондратюк А. В., Родькина И. А.,
Козлов В. А.**

Научно-практический центр НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству,
ул. Ковалева, 2 а, аг. Самохваловичи, Минский район, 223013, Беларусь,
тел./факс: +375(17)506-67-79, e-mail: safto@rambler.ru

С целью получения межвидовых соматических гибридов, обладающих устойчивостью к фитофторозу, а также оптимальными биохимическими показателями клубней, было проведено химическое слияние протопластов образца североамериканского вида *S. neoantipoviczii* (Л87-13) и раннего сорта белорусской селекции 'Зорачка' (восприимчивого к фитофторозу). Образец Л87-13 устойчив к фитофторозу листьев и клубней, содержит крахмала в клубнях до 23 %.

На начальном этапе для идентификации соматических гибридов выполняли описание морфологических признаков у растений-регенерантов. Гибриды, как правило, имели промежуточные морфологические признаки. Описание каждого растения проводили по преимущественно существенным морфологическим признакам согласно методике испытания картофеля *S. tuberosum* на отличимость, однородность и стабильность с введением дополнительных признаков, характеризующих виды и гибриды. По результатам оценки вся совокупность растений-регенерантов была разделена на три фенотипические группы: первая — близкая *S. neoantipoviczii*; вторая — обладающая промежуточными морфологическими признаками и/или видоспецифичными признаками партнеров слияния; третья группа растений без видоспецифичных признаков дикого вида (антоциановая окраска стебля и клубней, длинные столоны, устойчивость к фитофторозу листьев и клубней и т. д.). Наличие растений второй группы позволяло сделать предположение об успешной соматической гибридизации.

Далее был выполнен анализ интрогрессии генетического материала дикого партнера слияния. Выборочно по несколько лучших растений (цветение, клубнеобразование, устойчивость к фитофторозу), представляющих каждую из групп, были проанализированы с применением ДНК-маркеров (SSR и специфичных В геному *S. neoantipoviczii*).

Сопоставление спектров аллелей по ДНК-маркерам позволило сделать вывод о том, что регенеранты первой группы не несут аллелей свойственных сорту 'Зорачка', третьей группы не имеют аллелей дикого вида. Совпадение результатов фенотипической оценки и молекулярно-генетического анализа, позволяет предположить, что регенеранты 1 и 3 групп являются соматическими гибридами партнеров слияния протопластов. Для второй группы регенерантов наличие генетических детерминант культурного партнера слияния подтверждено идентичностью спектров аллелей 6 SSR локусов, дикого — наличием специфичных В геному маркеров.

В дальнейшую селекционную работу вовлечены наиболее устойчивые к фитофторозу, отличающиеся относительно высоким содержанием крахмала (20,1–22,0 %), соматические гибриды комбинации 'Зорачка' + *S. neoantipoviczii*.

Developing and evaluating of regenerant plants from the fusion of *Solanum tuberosum* and *Solanum neoantipoviczii* protoplasts

Semanyuk T. V., Dubinich V. L., Kandratiuk A. V., Rodzkina I. A., Kozlov V. A.

Research and Practical Center of National Academy of Sciences of Belarus of Potato, Fruit and Vegetable Growing, 2 a Kovaleva st., Samokhvalovich, Minsk region, 223013, Republic of Belarus, tel./fax: +375(17)506-67-79, e-mail: safto@rambler.ru

.....

To develop interspecies somatic hybrids resistant to late blight and optimal biochemical indices of tubers, a chemical fusion of protoplasts of a sample of the North American species *S. neoantipoviczii* (L87-13) and an early variety 'Zorachka' (late blight susceptible) of Belarusian breeding was performed. The sample L87-13 is resistant to late blight of leaves and tubers. It contains starch in the tubers up to 23%.

At the initial stage for somatic hybrids' identification, morphological characters of regenerant plants were described. The hybrids normally possessed intermediate morphological characters. Every plant was described by predominantly significant morphological characters using test methodology for the *S. tuberosum* potato for distinctness, uniformity and stability introducing additional characters characterizing species and hybrids. Based on the evaluation results, the entire pattern of regenerant plants was divided into three phenotypic groups: group I — close to *S. neoantipoviczii*; group II — possessing intermediate morphological characters and/or species-specific characters of fusion partners; group III — plants with no species-specific characters of a wild species (anthocyanin coloration of leaves and tubers, long stolons, resistance of leaves and tubers to late blight, and etc.). The presence of group II plants allowed to make an assumption about successful somatic hybridization.

Later an introgression analysis of the genetic material of a wild fusion partner was performed.

A few best plants selected at random (flowering, tuber formation, resistance to late blight), representing each group, were analyzed using DNA markers (SSR and B genome-specific *S. neoantipoviczii*).

Comparing of alleles' spectra by DNA markers, made it possible to conclude that group I regenerants do not carry the alleles characteristic of the 'Zorachka' variety and group III regenerants do not have wild species alleles. Convergence of phenotypic evaluation and molecular genetic analysis results makes it possible to assume that the regenerants of group I and III are somaclones of protoplast fusion partners. For group II of regenerants, the presence of genetic determinants of a cultural fusion partner was confirmed by the spectra identity of 6 SSR loci alleles, wild — by the presence of B genome-specific markers.

Somatic hybrids of 'Zorachka' + *S. neoantipoviczii* combinations — the most resistant to late blight and characterized by a relatively high content of starch (20.1–22.0%) — were chosen for further breeding.

Криоустойчивость апикальных меристем купены лекарственной (*Polygonatum odoratum*), изолированных из растений после длительного культивирования *in vitro*

Семенцова М. В.* , Высоцкая О. Н.

Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, ул. Ботаническая, 35, Москва, 127276, Россия, тел.: +7(499)678-54-21

* e-mail: Lunariarediviva@yandex.ru

Наиболее прогрессивной технологией длительного сохранения клонированного *in vitro* растительного материала в настоящее время является криосохранение. Это особенно важно для сохранения ценных клонов лекарственных растений, принадлежащих к роду купена (*Polygonatum* Mill.). В тканях этих растений обнаружены разнообразные биологические активные вещества: сапонины, гликозиды, флавоноиды и алкалоиды, а также целый ряд фитогормонов. Растительный материал многих видов из рода купены используют для получения разнообразных лекарственных средств, которые применяют в традиционной тибетской и китайской медицине, а также в народной медицине других стран. Согласно опубликованным данным (Naroon Khan, Abdur Rauf, 2014), вторичные метаболиты, обнаруженные в различных видах *Polygonatum*, обладают антимикробными и противогрибковыми свойствами. Известно, что корневища купены душистой (*Polygonatum odoratum*) содержат алкалоид гликонин, сердечные гликозиды (конваллярин, конваллямарин), сапонины стероидного характера, слизеподобные и дубильные вещества, а также: органические кислоты (хелидоновая, аскорбиновая и др.), аспарагин, глюкозу, арабинозу, маннит, каротин и многочисленные микроэлементы. Кроме того, из тканей *Polygonatum odoratum* были выделены цитотоксичные вещества с противоопухолевой активностью, антиоксиданты, а также метаболиты с обезболивающим, жаропонижающим и противовоспалительным действием. В Китае купену используют как компонент лечебного питания при заболевании диабетом. В связи с тем, что растения рода *Polygonatum* обладают чрезвычайно ценными свойствами, их природные популяции склонны сокращаться. Поэтому для получения ценного лекарственного сырья из купены необходимо применять новые технологии культивирования этого растения и сохранения ценных его клонов. С этой целью, способ криосохранения земляники, разработанный ранее (патент РФ № 2302107), был адаптирован для тестового замораживания апексов купены, изолированных из конгломератов побегов полученных *in vitro*. Для этого эксперимента мы использовали клон *Polygonatum odoratum*, который сохраняли *in vitro* в коллекции растений ИФР РАН с 1994 г. (Высоцкая О. Н., Баскакова О. Ю., 1995). После быстрого замораживания и кратковременного хранения в жидком азоте 25–45 % апикальных меристем купены лекарственной на модифицированной питательной среде МС, дополненной 0,5 мг/л 6-бензиламинопурина, восстановили свой рост и сформировали побеги с листьями и корнями. Таким образом, показано, что существует реальная возможность разработать эффективный способ криосохранения для растительного материала купены, культивируемого *in vitro*.

Cryoresistance of meristem apices isolated from Solomon's seal plantlets after long-term *in vitro* culture (*Polygonatum odoratum*)

Sementsova M. V.*, Vysotskaya O. N.

K. A. Timiryazev Institute of Plant Physiology Russian Academy of Sciences, 35 Botanicheskaya st., 127276, Moscow, Russian Federation, tel.: +7(499)678-54-21

* e-mail: Lunariarediviva@yandex.ru

At present the cryopreservation technique is the most progressive method for long-term preservation of plant material cloned *in vitro*. It is especially important for storage of valuable clones of medicinal plants belong to Solomon's seal genus (*Polygonatum* Mill.). The different biological active substances were detected in tissues of Solomon's seal plants: saponins, glycosides, flavonoids alkaloids and phytohormones. Plant material of many species from *Polygonatum* genus was used for obtaining of different medicinal substances that are practiced in traditional Tibetan and Chinese medicine as well as in folk medicine of other countries. According to published information (Haroon Khan, Abdur Rauf, 2014), secondary metabolites detected in various species of *Polygonatum* genus have antimicrobial and antifungal properties. It is known, that *Polygonatum odoratum* rhizomes contain alkaloid glyconin, cardiac glycosides (konvallyarin, konvallyamarin), steroid saponins, mucoid-like substance, tannins and also: organic acids (chelidonic, ascorbic and others), asparagine, glucose, arabinose, mannitol, carotene and numerous microelements. In addition, from the tissues of *Polygonatum odoratum* (Mill.) Druce were obtained cytotoxic substances with antitumor activity, antioxidants, as well as metabolites with analgesic, antipyretic and anti-inflammatory effects. In China Solomon's seal plants are used as a component of therapeutic nutrition for diabetes. In connection with that plants from *Polygonatum* genus have extremely valuable properties their natural populations tend to decrease. Therefore, in order to obtain a valuable plant material of Solomon's seal for medicine using, it is necessary to apply new techniques for cultivation of this plants and preservation of its valuable clones. For this purpose, the cryopreservation protocol developed earlier (RF patent No. 2302107) was adapted for tested experiment with freezing of Solomon's seal apices, isolated from shoot conglomerates obtained *in vitro*. For this experiment we used one clone of *Polygonatum odoratum*, which was preserved *in vitro* since 1994 in IPPRAS plant collection (Vysotskaya O. N., Bascakova O. Y., 1995). After faster freezing and short-term storage in liquid nitrogen 25–45 % apical meristems of Solomon's seal recovered their growth on modified nutrient medium, supplemented by 0,5 6-benzylaminopurine and formed shoots with leaves and roots. Thus, it is shown that there is a real chance to develop of effective cryopreservation protocols for plant material of *Polygonatum* species cultured *in vitro*.

Содержание суммы флавоноидов в растениях-регенерантах *Iris sibirica* L. в зависимости от гормонального состава питательных сред

Семёнова К. П., Тихомирова Л. И.

Алтайский государственный университет, пр-т Ленина, 61, Барнаул, 656049, Россия,
факс: +7(385-2)667-626, тел.: +7(385-2)291-291, e-mail: ksyunya.semenova.1996@mail.ru

Широта терапевтического действия, присущая как индивидуальным веществам флавоноидной структуры, так и их смесям, позволила создать большое количество лекарственных форм на их основе. Известно, что флавоноиды оказывают антиоксидантное и капилляроукрепляющее действие, а также входят в группу витамина Р.

Виды рода *Iris* богаты вторичными метаболитами, прежде всего флавоноидами и изофлавоноидами, флавонами, хинонами и ксантонами. (Kaššák, 2012, Kukula-Koch и соавт., 2015). Антиповой Е. А. и ее коллегами (2016) в траве ириса сибирского установлено присутствие флавоноидов: рутина, кверцетрина и монозида мирицетина. Определено количественное содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин $1,97 \pm 0,23$.

Целью данной работы являлась разработка методики дифференциальной спектрофотометрии, позволяющей проводить оценку качества биотехнологического сырья *Iris sibirica* по содержанию суммы флавоноидов в зависимости от содержания БАП в питательной среде.

Объектами исследования служили растения-регенеранты *Iris sibirica* L., выращенные в Отделе биотехнологии. Для клонального микроразмножения питательные среды готовили по рецептуре MS, содержащие 30 г/л сахарозы. На этапе введения в культуру добавляли 3 мкМ НУК (α -нафтилуксусной кислоты) в сочетании с 8 мкМ БАП (6-бензиламинопурин). На этапе собственно микроразмножения питательные среды готовили с добавлением 2,5–10,0 мкМ БАП, 1 мкМ НУК и 0,1 мкМ ИМК (3-индолилуксусная кислота). Для укоренения *I. sibirica* использовали среды, содержащие 3 мкМ НУК. рН среды доводили до 5,8–5,9 и добавляли 0,6 % агара. Среды разливали в пластиковые контейнеры (по 30 мл в каждый) или в культуральные флаконы (по 10 мл в каждый). Автоклавировали приготовленные питательные среды в течение 20 мин. при 1200 °С. Экспланты культивировали в условиях фотопериода 16/8 часов свет/темнота при 24–260 °С.

Разработанная нами методика определения флавоноидов методом дифференциальной спектрофотометрии основана на способности флавоноидов образовывать комплексы с алюминия (III) хлоридом. Оптическую плотность полученных растворов измеряли на спектрофотометре при длине волны 410 нм. В качестве стандарта использовали раствор стандартного образца (СО) рутина в 95 % спирте этиловом.

Рассчитаны метрологические характеристики методики. Средняя изучаемая совокупность с 95 %-м уровнем вероятности находилась в интервале $2,66 \pm 0,25$ % на абсолютно сухой вес (а. с. в.) листьев интактных растений. Вероятность ошибочного заключения составляла 5 %. Абсолютная ошибка средней $S'_x = 0,104$ г, относительная ошибка $\epsilon = 3,9$ %. Как видно, относительная погрешность определения (ϵ) не превышала 5 %.

Нами изучены количественные данные суммы флавоноидов в сырье растений-регенерантов в зависимости от содержания БАП в питательных средах на а. с. в.: при 1 мкМ БАП — 1,03 %, при 2,5 мкМ БАП — 1,88 %, при 5,0 мкМ БАП — 2,16 %, при 7,5 мкМ БАП — 3,53, при 10 мкМ БАП — 1,91 %.

Таким образом, для максимального накопления суммы флавоноидов в биотехнологическом сырье *Iris sibirica* необходимо в питательные среды добавлять БАП в количестве 7,5 мкМ на 1 литр.

The content of the amount of flavonoids in plants regenerating *Iris sibirica* L., depending on the hormonal composition of nutrient media

Semenova K. P., Tikhomirova L. I.

Altai State University, 61 Lenin ave., 656049, Barnaul, Russian Federation,
fax: +7(385-2)667-626, tel.: +7(385-2)291-291, e-mail: ksyunya.semenova.1996@mail.ru

The breadth of the therapeutic effect, inherent in both individual substances of the flavonoid structure, and their mixtures, made it possible to create a large number of dosage forms based on them. It is known that flavonoids have antioxidant and capillary-strengthening effect, and also belong to the group of vitamin R.

Kinds of the genus *Iris* are rich in secondary metabolites, especially flavonoid and isoflavonoid, flavones, quinones and xanthenes. (Kaššák, 2012, Kukula-Koch, et al., 2015). Antipova EA and its colleagues (2016) in the grass of Siberian iris found the presence of flavonoids: rutin, quercetin and monoside myricetin. The quantitative content of the sum of flavonoids in recalculation for routine is determined to be 1.97 ± 0.23 .

The purpose of this work was to develop a technique for differential spectrophotometry that allows an assessment of the quality of biotechnological raw materials of *Iris sibirica* in terms of the content of the amount of flavonoids depending on the content of BAP in the nutrient medium.

The objects of research were the regenerating plants *Iris sibirica* L., grown in the Department of Biotechnology. For clonal micropropagation, the nutrient media was prepared by MS prescription containing 30 g/l sucrose. At the introduction stage, 3 μM NUA (α -naphthylacetic acid) in combination with 8 μM BAP (6-benzylaminopurine) was added to the culture. At the micropropagation stage, the nutrient media was prepared with the addition of 2.5–10.0 μM BAP, 1 μM NAA and 0.1 μM IMC (3-indolylacetic acid). For the rooting of *I. sibirica*, a medium containing 3 μM NCC was used. The pH of the medium was adjusted to 5.8–5.9 and 0.6 % agar was added. Mediums were poured into plastic containers (30 ml each) or in culture bottles (10 ml each). The prepared nutrient media was autoclaved for 20 minutes at 1200°C. The explants were cultured under photoperiod conditions for 16/8 hours light / dark at 24–260°C.

The method we developed for the determination of flavonoids by the method of differential spectrophotometry is based on the ability of flavonoids to form complexes with aluminum (III) chloride. The optical density of the resulting solutions was measured on a spectrophotometer at a wavelength of 410 nm. As a standard, a standard sample (CO) solution of rutin was used in 95 % ethanol.

The metrological characteristics of the method are calculated. The average study population with a 95 % probability level was in the range 2.66 ± 0.25 % for absolutely dry weight (a. s. v.) of the leaves of intact plants. The probability of erroneous imprisonment was 5 %. The absolute error of the mean $S_{\bar{x}} = 0.104$ g, the relative error $\varepsilon = 3.9$ %. As can be seen, the relative error in determining (ε) did not exceed 5 %.

We have studied the quantitative data of the amount of flavonoids in the raw materials of regenerating plants depending on the content of BAP in nutrient media on asb: at 1 μM BAP -1.03 %, at 2.5 μM BAP -1.8 % 5.0 μM BAP — 2.16 %, at 7.5 μM BAP — 3.53, with 10 μM BAP — 1.91 %.

Thus, for maximum accumulation of the amount of flavonoids in biotechnological raw materials *Iris sibirica* it is necessary to add BAP in the nutrient media in the amount of 7.5 μM per 1 liter.

Микроклональное размножение гибридных сортов гибискуса (*Hibiscus sp.*)

Серода М. М., Васильченко Е. В., Верещагина А. В.

Южный федеральный университет, ул. Ботанический спуск, 7, Ростов-на-Дону, 344041, Россия,
e-mail: seredam@yandex.ru

Вегетативное размножение декоративных гибискусов малоэффективно по причине сравнительно низкой укореняемости черенков, а также в связи с завышенными временными и трудовыми затратами. Кроме того, промышленные масштабы размножения гибискуса целесообразно обеспечивать методами микроклонального размножения. Исследование проведено с целью разработки эффективного протокола для микроклонального размножения гибридных сортов гибискуса 'Cranberry Crush' и 'Royal Gems' из пазушных почек.

Исходный материал получен из частной коллекции. Работа выполнялась на базе лаборатории клеточных и геномных технологий Ботанического сада Южного федерального университета. Приготовление сред, поверхностная стерилизация эксплантов проводились по общепринятым методикам. В качестве эксплантов использовались пазушные почки молодых неодревесневших побегов вместе с узлами в период май-июнь. В процессе поверхностной стерилизации тестировались следующие растворы: 0,1 %-й раствор сулемы, 10 %-й раствор перекиси водорода, 1 %-й раствор гипохлорита натрия. Наиболее эффективным раствором оказался 10 % раствор перекиси водорода. В этом случае выживало около 80 % стерильных эксплантов.

Наиболее эффективным составом для введения побегов в культуру явилась среда Андерсона без добавления фитогормонов. Пазушные почки начинали активизироваться уже на второй неделе культивирования.

Для мультипликации побегов было испытано несколько вариантов питательных сред с добавлением бензиламинопурина (БАП) в концентрации 0,2 мг/л, 0,5 мг/л, 1 мг/л. Питательные среды по прописи Мурасиге-Скуга (МС), Андерсона, WPM. На среде МС побеги развивались достоверно медленнее, чем на среде Андерсона и WPM. На среде WPM экспланты имели сравнительно мелкие листовые пластинки в отличие от эксплантов на среде Андерсона. Концентрация БАП свыше 0,2 мг/л не давала положительного эффекта. В целом для мультипликации побегов использовалась среда Андерсона с добавлением бензиламинопурина в концентрации 0,2 мг/л. При этом коэффициент размножения составил около 3 для сорта 'Cranberry Crush' и около 3,5 для 'Royal Gems'.

Корнеобразование на полученных побегах эффективно происходит на безгормональной среде Андерсона на 2-й неделе культивирования.

Укоренившиеся побеги адаптировали к тепличным условиям. Для этого использовали субстрат в виде смеси торфа и песка в равных пропорциях. Период адаптации составляет около 3-х недель. Адаптированные растения высаживали в открытый грунт в мае — июне.

Micropropagation of hybrid *Hibiscus sp.* varieties

Sereda M. M., Vasilchenko E. V., Vereshchagina A. V.

Southern Federal University, 7 Botanicheskiy spusk, 344041, Rostov-on-Don, Russian Federation

Traditional propagation of decorative hibiscuses is ineffective due to the relatively low rooting of the shoots, and also due to overstated time and labor costs. In addition, the industrial scale of reproduction of hibiscus is advisable to provide methods of microclonal reproduction. The study was conducted to develop an effective protocol for micropropagation of hybrid varieties of 'Cranberry Crush' and 'Royal Gems' from axillary buds.

Source material is obtained from a private collection. The work was carried out on the basis of the laboratory of cellular and genomic technologies of the Botanical Garden of the Southern Federal University. Preparation of media, surface sterilization of explants were carried out according to generally accepted methods. As explants, axillary buds of young, ungreened shoots were used together with the nodes in the period May-June. In the process of surface sterilization the following solutions were tested: 0.1 % solution of mercuric chloride, 10 % solution of hydrogen peroxide, 1 % solution of sodium hypochlorite. The most effective solution was a 10 % solution of hydrogen peroxide. In this case, about 80 % of sterile explants survived.

The most effective composition for the introduction of shoots into the culture was the Anderson medium without the addition of phytohormones. The axillary buds began to intensify as early as the second week of cultivation.

For the shoot multiplication, several variants of nutrient media with the addition of benzylaminopurine (BAP) at a concentration of 0.2 mg/l, 0.5 mg/l, 1 mg/l were tested. Nutrient mediums according to Murashige and Skoog (MS), Anderson, WPM. On the MS medium shoots developed significantly slower than on the Anderson medium and WPM. On the WPM medium, the explants had comparatively small leaves, unlike the explants on the Anderson medium. Concentration of BAP over 0.2 mg/l did not give a positive effect. In general, the Anderson medium with the addition of BAP at a concentration of 0.2 mg/l was used to shoot the shoots. The breeding factor was about 3 for 'Cranberry Crush' and about 3.5 for 'Royal Gems'.

Rooting induction obtained on Anderson's hormone-free medium at the second week of cultivation.

Rooted shoots adapted to greenhouse conditions. For this, a substrate was used in the form of a mixture of peat and sand in equal proportions. The adaptation period is about 3 weeks. Adapted plants were transferred in soil in May-June.

Клеточные культуры как экспериментальные системы исследования генотипов пшеницы, устойчивых к промораживанию

Сергеева Л. Е., Хоменко Л. А., Бронникова Л. И.

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины, Васильковская, 31/17, Киев, 03022, Украина, e-mail: Zlenko_lora@ukr.net

Проблема стрессоустойчивости растений занимает одно из ведущих мест среди фундаментальных вопросов биологии. Увеличение объема информации в рамках этой проблемы будет создавать теоретическую основу для получения форм растений с новыми характеристиками, с одной стороны. С другой стороны, данный *modus operandi* может оказаться стимулом для совершенствования традиционных биотехнологий.

При ранжировании генотипов по признаку морозоустойчивости традиционно используют метод промораживания с последующим вычленением выживших вариантов. При этом, как правило, не оцениваются физиологические и биохимические эффекты — причины — устойчивости. Вероятно, они могут приводить к отдаленным пролонгированным изменениям, также оказывающим свое влияние на онтогенез.

В настоящее время биотехнология *in vitro* становится наиболее актуальным подходом получения генетически измененных форм растений с повышенным уровнем стрессоустойчивости. В то же время система *in vitro* дает возможность исследовать физиологические механизмы устойчивости, реализуемые на клеточном уровне, а также последствия различных событий (модификаций), произошедших в структурах интактного растения.

Целью данного исследования было установление некоторых характеристик клеточных культур пшеницы, полученных из генотипов, переживших промораживание. Промораживанию подвергали наклюнувшиеся семена. Сначала такие зерновки выдерживали в режиме динамического снижения температуры от 15°C до -8°C. Затем в течение 24 часов при температуре -20°C. Промороженные зерновки высевали в поле и выращивали аналогично контрольным растениям. После образования колоса и опыления выделяли незрелые зародыши, переносили на среды для индукции каллусогенеза различного состава. Оценивали характер и скорость реакции.

У всех тестированных генотипов пшеницы отмечали различные реакции на культивирование *in vitro*: прямое прорастание, каллусогенез, ризогенез. При этом у контрольных растений прямое прорастание эксплантатов наблюдали у более 60 % вариантов, тогда как у подвергнутых промораживанию генотипов прорастало 12–30 %, в зависимости от состава среды. Также следует отметить тот факт, что начало реакции у устойчивых форм отмечали на 2–4 суток позднее.

Оставшиеся незрелые зародыши начинали продуцировать каллусные клетки либо не проявляли никакой реакции (засыхали). Частота каллусообразования у всех генотипов была аналогичной. Однако, активность каллусогенеза (относительный прирост биомассы) у «промороженных» вариантов была выше на 10–26 %. При дальнейшем культивировании у части каллуса всех вариантов отмечали появление ризогенеза.

Полученные результаты показывают, что генотипы, выжившие после промораживания, отличаются преимуществами при культивировании *in vitro*. По нашему мнению, это проявление генетических особенностей, а не последствия промораживания.

В каллусных клетках определяли содержание свободного пролина, которое было невысоким. По этому показателю различий между вариантами не отмечали. Это может свидетельствовать в пользу нормального развития культур.

Таким образом, можно допустить, что процедура промораживания не оказывает пролонгированного патологического воздействия на устойчивые генотипы. Их клеточные культуры *in vitro* являются показателем стабильного метаболизма клеточного уровня.

Cell cultures as experimental systems for investigation of freezing tolerant wheat genotypes

Sergeeva L. E., Khomenko L. A., Bronnikova L. I.

*Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine,
31/17 Vasylkivska st., 03022, Kyiv, Ukraine, e-mail: Zlenko_lora@ukr.net*

.....

The problem of plant stress-resistance belongs to chief biological directions. The accumulation of information within this problem will establish the theoretical basis for new form plants breeding and ensure the traditional biological technologies improvement.

The routine approach of wheat genotypes segregation according to their frost resistance is the mass seed freezing and selection of survived variants. But this method does not detect and evaluate the physiological and biochemical reasons of the resistance. *In vitro* system gives the opportunity to investigate a number of resistance mechanisms on cellular level as well as the consequences of various changes that developed on entire plant level.

The aim of the investigation was the evaluation of some parameters of cell cultures obtained from freezing wheat variants. Germinated seeds were kept under two cold influences. The first (the variable) one is characterized by gradual temperature lowering ($t^{\circ} 15^{\circ}\text{C} \rightarrow t^{\circ} -8^{\circ}\text{C}$). The second (the stable) pressure was $t^{\circ} -20^{\circ}\text{C}/24$ hours frost stress.

Freezing seeds were sowed and cultivated in fields. After coming into ears immature embryos were emitted and put for calli induction on various cultural media. The types of reactions and rates of their development were evaluated.

Various types of physiological reactions were observed among wheat variants. They are; embryos direct germination, calli induction, rooting. Control explants demonstrated the direct germination in 60% chances. At the same time this reaction developed only 12–30% of freezing forms. The reaction frequencies depended on cultured media. “Freezing” embryos began to grow 2–4 days later than control ones.

Other immature embryos formed calli cells or eliminated. The callus formation frequency of tested genotypes was equal. However relative calli biomass growth of resistant variants was higher (10–26%). Some wheat calli cultures appeared to be rhizogenous. Resistant forms demonstrated advantages during *in vitro* culture establishment. In our opinion they are the genotype peculiarities rather than the freezing consequences.

The free proline levels were detected in calli tissues. Parameters were low and analogous in all variants. These events reflect the normal cultures development.

The prolonged freezing consequences were not observed in resistant genotypes. Their particular features are the markers of cellular stable metabolism.

Формы минерального азота и фактор рН в формировании рибосом растительной клетки культуры *in vitro*

Смолов А. П.

Институт фундаментальных проблем биологии РАН, ул. Институтская, 2, Пущино, 142290,
Московская область, Россия, факс: +7(496)733-05-32, тел.: +7(496)773-28-64,
e-mail: smar49@mail.ru

.....

Ранее на клетках каллусной культуры сои (*Glycine max*) было обнаружено, что окисленная (нитрат) и восстановленная (аммоний) формы минерального азота по-разному влияют на структурную организацию органелл (хлоропласты, митохондрии) растительной клетки. В частности, у клеток, выращенных исключительно на нитратной среде, значительно снижалось количество мембранных образований (ламелл стромы и гран — у хлоропластов и крист — у митохондрий). Кроме того, клетки, лишенные аммонийного компонента, содержали в 5–10 раз меньше рибосом, чем клетки, выращенные на аммоний-содержащей среде. Учитывая, что все мембранные образования представляют собой белково-липидную структуру, а рибосомы — рибонуклео-протеиновый комплекс было предположено, что используемая форма минерального азота (нитрат или аммоний) по-разному влияют на путь синтеза белков у культивируемых клеток. Эксперименты, проведенные на клетках каллуса сои, дают основание предположить, что путь усиления белкового обмена связан с изменениями рН цитоплазмы при поглощении NH_4^+ -ионов или NO_3^- -ионов. Поглощение NH_4^+ -ионов клетками каллуса вызывало выход H^+ -ионов из клеток в питательную среду и следовательно должно способствовать увеличению значения рН цитоплазмы. Повышенное значения рН цитоплазмы способно усиливать активность некоторых карбоксилирующих ферментов, таких, например, как фосфоенолпируваткарбоксилаза и способствовать тем самым повышению содержания продуктов фиксации CO_2 — органических кислот, которые являются предшественниками молекул аминокислот (продукта реакции аминирования). Эксперименты с использованием $^{14}\text{CO}_2$ показали усиление скорости поглощения меченого углерода клетками при наличии экзогенного аммония в составе питательной среды, по сравнению со скоростью поглощения этого субстрата клетками, выращенными на исключительно нитратной питательной среде. Таким образом, результаты проведенных экспериментов свидетельствуют в пользу выдвигаемого предположения.

The forms of mineral nitrogen and pH factor in ribosomes formation of plant cell *in vitro*

Smolov A. P.

Institute of Basic Biological Problems, Russian Academy of Sciences, 2 Institutskaya st., 142290, Pushchino, Moscow Region, Russian Federation, fax: +7(496)733-05-32, тел.: +7(496)773-28-64, e-mail: smap49@mail.ru

.....

Previously, there were found that two forms of mineral nitrogen, which are the oxidized (nitrate) and reduced (ammonium) forms, to differently affect organelle (chloroplasts and mitochondria) organization in a soybean (*Glycine max*) callus culture. Substantially, the amount of the membrane structures (lamellae of stroma and grains in chloroplasts and cristae in mitochondria) was significantly decreased in cells grown on a nitrate medium. In addition, cells were grown in lack the ammonium component contained 5–10 times less ribosomes as compared with those grown on the ammonium medium. Given that all membranes are built from proteins and lipids, as well as ribosomes are based on ribonucleic-protein complexes, it was suggested that mineral nitrogen (nitrate or ammonium) affected differently on the cellular protein metabolism. Our results suggest increasing the level of the protein metabolism which is associated with changes in the cytoplasm pH depending on NH_4^+ or NO_3^- absorption. The absorption of NH_4^+ by the callus cells caused the release of H^+ ions into the medium and, therefore, should increase the cytoplasmic pH. The higher cytoplasmic pH, in turn, may enhance the activity of carboxylating enzymes, such as phosphoenolpyruvate carboxylase, and promote the formation of CO_2 fixation products — organic acids, which are the precursors of amino acids. The experiments based on $^{14}\text{CO}_2$ showed the increase in the absorption rate of the labeled carbon by the cells grown on the ammonium medium. Thus, our results confirm the proposed hypothesis.

Получение каллусов женьшеня вьетнамского *Panax vietnamensis* Ha et Grushv., синтезирующих тритерпеновые гликозиды

Соболькова Г. И., Кочкин Д. В., Титова М. В., Григорьев Р. О.,
Клюшин А. Г.

Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, ул. Ботаническая, 35, Москва, 127276, Россия, тел.: +7(499)678-54-00, +7(915)199-24-26, факс: +7(499)678-54-20, e-mail: 1991grom22@gmail.com

Ключевые слова: тритерпеновые гликозиды, клеточные культуры растений, женьшень вьетнамский, *Panax vietnamensis*, каллусная культура

В настоящее время природные запасы *P. vietnamensis* существенно истощены, поэтому изучение образования характерных для этого растения тритерпеновых гликозидов в условиях стерильной культуры *in vitro* является весьма актуальным исследованием. Однако до настоящего времени состав тритерпеновых гликозидов в культурах клеток *P. vietnamensis* описан довольно слабо.

Цель: Получение штамма культуры клеток женьшеня вьетнамского, продуцирующий тритерпеновые гликозиды в детектируемых количествах.

Задачи:

- 1) Получение каллусной культуры клеток женьшеня вьетнамского;
- 2) Произвести химический анализ вторичных метаболитов в культуре клеток исследуемого растения;
- 3) Экспериментальным путем выявить оптимальные условия выращивания каллусной культуры клеток.

Каллусная культура клеток вьетнамского женьшеня *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. была получена из корня интактного растения. В экспериментах использовали линии данной культуры клеток, выращенные на модифицированной среде Мурасиге-Скуга (MS).

Для культивирования клеток *P. vietnamensis* в условиях *in vitro* использовали несколько вариантов сред, отличающихся по составу фитогормонов: ауксинов — 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д), α -нафтилуксусная кислота (НУК), и цитокининов — кинетин, 6-бензиламинопурин (БАП). Анализ ростовых характеристик культур клеток проводили по общепринятым методикам. Определяли жизнеспособность клеток и содержание сырой и сухой биомассы клеток в литре среды.

Предварительный фитохимический анализ спиртовых экстрактов из биомассы каллусных культур клеток вьетнамского женьшеня был проведен с помощью хроматографии в тонком слое силикагеля (ТСХ). Система растворителей: этилацетат: ледяная уксусная кислота: H_2O (16:4,5:4,5, по объему).

В результате данной работы была отработана и оптимизирована методика получения каллусных культур из корневища *Panax vietnamensis*, в частности — был оптимизирован состав питательных сред для интенсификации роста полученных линий. Получены несколько активно растущих линий каллусной культуры клеток женьшеня вьетнамского, для двух из них подробно исследованы ростовые характеристики. Для получения каллусных культур клеток на корневищах женьшеня вьетнамского оказалось эффективным последовательное использование двух сред — вначале безгормональной (2–3 пассажа) с последующим переносом на среду с оптимальной комбинации гормонов.

Также проведен предварительный анализ состава тритерпеновых гликозидов (гинзенозидов) в полученных линиях каллусных культур *P. vietnamensis*. Установлено, что изученные линии сохраняют способность к образованию гинзенозидов и содержат не менее 5 основных гинзенозидов — производных окотиллола, протопанаксадиола и олеаноловой кислоты.

Preparation of the callus of the Vietnamese ginseng *Panax vietnamensis* Ha et Grushv., synthesizing triterpene glycosides

Sobolkova G. I., Kochkin D. V., Titova M. V., Grigoryev R. O., Klyushin A. G.

K. A. Timiryazev Institute of Plant Physiology Russian Academy of Sciences, 35 Botanicheskaya st., 127276, Moscow, Russian Federation, tel.: +7(499)678-54-00, +7(915)199-24-26, fax: +7(499)678-54-20, e-mail: 1991grom22@gmail.com

.....

Key words: triterpene glycosides, plant cell cultures, Vietnamese ginseng, *Panax vietnamensis*, callus culture

Currently, the natural reserves of *P. vietnamensis* are substantially depleted, so the study of the formation of triterpene glycosides characteristic for this plant under conditions of a sterile culture *in vitro* is a very topical study. However, to date, the composition of triterpene glycosides in *P. vietnamensis* cell cultures has been described rather poorly.

Objective: To obtain a strain of Vietnamese ginseng cell culture, producing triterpene glycosides in detectable amounts.

Tasks:

- 1) Obtaining callus culture of ginseng cells of Vietnamese;
- 2) To perform a chemical analysis of secondary metabolites in the culture of the cells of the plant under investigation;
- 3) Experimentally identify the optimal conditions for growing the callus cell culture.

Callus cell culture of Vietnamese ginseng *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. was obtained from the root of an intact plant. In the experiments, the lines of this cell culture grown on the modified Murasige-Skoog medium (MS) were used.

Several variants of media differing in composition of phytohormones were used for the cultivation of *P. vietnamensis* cells *in vitro*: auxins — 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), α -naphthylacetic acid (NAA), and cytokinins — kinetin, 6-benzylaminopurine (BAP). Analysis of the growth characteristics of cell cultures was carried out according to generally accepted procedures. The viability of cells and the content of raw and dry biomass of cells in a liter of medium were determined.

A preliminary phytochemical analysis of alcohol extracts from the biomass of callus cultures of Vietnamese ginseng cells was carried out by chromatography in a thin layer of silica gel (TLC). Solvent system: ethyl acetate: glacial acetic acid: H₂O (16: 4.5: 4.5, by volume).

As a result of this work, the technique of obtaining callus cultures from the rhizome of *Panax vietnamensis* was worked out and optimized, in particular, the composition of nutrient media for the intensification of growth of the obtained lines was optimized. Several actively growing lines of the callus culture of Vietnamese ginseng cells were obtained, and two of them were studied in detail for growth characteristics. To obtain callus cell cultures on the rhizomes of Vietnamese ginseng, it was effective to consistently use two media — initially hormone-free (2 to 3 passages) followed by transfer to the medium with the optimal combination of hormones.

Preliminary analysis of the composition of triterpene glycosides (ginsenosides) in the obtained lines of callus cultures *P. vietnamensis* was also carried out. It has been established that the lines studied retain the ability to form ginsenosides and contain at least 5 basic ginsenosides — derivatives of ocotylol, protopanaxadiol and oleanolic acid.

Характер воздействия криосохранения методом дегидратации на генетическую стабильность растительного материала *Triticum aestivum* и *Fragaria vesca*

Соловьева А. И., Высоцкая О. Н.

Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, ул. Ботаническая, 35, Москва, 127276, Россия, факс: +7(499)678-54-00, тел.: +7(499)678-53-97, e-mail: slvjova.aleksandra@rambler.ru

.....

Криосохранение тканей и органов растений — один из способов сохранения генетических ресурсов. Одной из самых сложных задач является криосохранение растительного материала, культивируемого *in vitro*, поскольку для успешного замораживания необходимо провести многоступенчатую подготовку тканей с помощью различных веществ, обладающих гормоноподобными и криопротекторными свойствами. Такое воздействие увеличивает риск появления генетических отклонений у растений, восстановленных после замораживания. Изучаемый нами протокол криосохранения методом дегидратации один из наиболее простых и доступных, и не включает использование таких веществ, как ДМСО, обладающих мутагенными свойствами. Однако стабильность восстановленного растительного материала может зависеть не только от используемого протокола, но и от свойств замораживаемого объекта, в частности, от степени дифференциации замораживаемой ткани и размера генома сохраняемого вида. Поэтому мы провели сравнение стабильности растений, восстановленных после криосохранения методом дегидратации двух контрастных объектов: свежеполученных линий каллусов *Triticum aestivum* и апексов длительно поддерживаемого клона *Fragaria vesca*. После криосохранения возобновление роста, как апексов земляники, так и каллусов пшеницы всех линий, происходило с высокой частотой — 75 и 87% соответственно. Для анализа генетической стабильности мы использовали RAPD, ISSR и REMAP методы. В пробах каллусов пяти из шести линий пшеницы, восстановленных после криосохранения, ни с одним из праймеров не было обнаружено изменений в спектрах амплифицированных фрагментов. Исключением была одна из проб ДНК каллусов одной линии, где после криосохранения было зарегистрировано появление нового фрагмента размером около 90 п. н. Однако все полученные растения-регенеранты не имели никаких отклонений. В отличие от свежеполученных каллусных линий пшеницы длительно поддерживаемый клон земляники обладал внутренним разнообразием. В его пробах доля полиморфных фрагментов составляла 9%, но у растений, восстановленных после криосохранения, она сократилась до 4.5%. Таким образом, после криосохранения растительного материала по протоколу дегидратации вероятность появления изменений в геноме достаточно низка, но при криосохранении исходно различающегося растительного материала может происходить отбор.

Influence character of dehydration cryopreservation on genetic stability of *Triticum aestivum* and *Fragaria vesca* plant material

Solov'eva A. I., Vysotskaya O. N.

K. A. Timiryazev Institute of Plant Physiology Russian Academy of Sciences, 35 Botanicheskaya st., 127276, Moscow, Russian Federation, fax: +7(499)678-54-00, tel.: +7(499)678-53-97, e-mail: slvjova.aleksandra@rambler.ru

.....

Cryopreservation of plant tissues and organs is one of the genetic resource preservation manners. The most difficult problem is the *in vitro* plant tissues cryopreservation, because for successful freezing are necessary the multistep preculture of the tissue with substances with hormone and cryoprotective properties. Preculture and cryoprotection steps increase the genetic variations risk for plants recovered after cryopreservation. Dehydration cryopreservation is simple and inexpensive method, it eliminate the using of mutagenic cryoprotectors like DMSO. However, the stability of recovered plant material could be affected by cryopreservation protocol and the plant object properties, differentiation and genome size. We compared the genetic stability of plants recovered after cryopreservation of two contrast objects — young callus culture of *Triticum aestivum* and *Fragaria vesca* clone subcultured for a long period. The strawberry apexes and the wheat lines calli recovered their growth with high frequency — 75 and 87 %, respectively. RAPD, ISSR and REMAP methods have been used for the genetic stability analysis. The new polymorphic fragments have not been observed in DNA of one of the five wheat lines calli. Only in a one DNA sample of the one line callus has been detected new amplified fragment about 90 bp. However, all regenerated plants did not have any deviations. In contrast to wheat young callus culture, strawberry clone cultivated for a long period have had the variability. The polymorphic amplicons proportion of the DNA samples of the clone was 9 %. This percentage has reduced to 4.5 % for the plants recovered after cryopreservation. Therefore, the probability of the genome variations occurrence after the dehydration cryopreservation is low, but after this of genetic differentiated plant material might taking place the selection.

Биотехнологии сохранение растений: коллекция *in vitro* и банк ДНК редких видов Центрального ботанического сада НАН Беларуси

Спиридович Е. В., Власова А. Б., Козлова О. Н., Вайновская И. Ф., Филипеня В. Л., Юхимук А. Н., Хотляник Н. В., Кузьменкова С. М., Решетников В. Н.

Центральный ботанический сад НАН Беларуси, ул. Сурганова, 2 в, Минск, 220012, Беларусь,
тел./факс: +375(17)284-14-84, e-mail: e.spiridovich@cbg.org.by

Достижения в области биотехнологии растений, особенно те, которые связаны с культурой *in vitro* и молекулярной биологией, представляют мощные инструменты для сохранения и управления разнообразием растений в ботанических садах. В настоящее время в Центральном ботаническом саду НАН Беларуси (ЦБС) биотехнологические методы широко используются для сохранения исчезающих, редких, декоративных, лекарственных и лесных видов, что позволяет сохранить материал, не содержащий патогенов, элитные растения и генетическое разнообразие в краткосрочном, среднесрочном и долгосрочном режимах. Сохранение *in vitro* особенно важно для вегетативно размножаемых и для неортодоксальных видов семенных растений. Кроме того, методы *in vitro* обеспечивают безопасное средство для обмена генетическими ресурсами на международном уровне, накапливать ценный материал для восстановления природных популяции и проводить молекулярные и экологические исследования.

В ЦБС постоянно проводится работа с коллекцией «Редкие и исчезающие виды природной флоры Беларуси», в которой растения сохраняются в условиях *ex situ*, свидетельство Министерства природных ресурсов и охраны окружающей среды РБ № 23 от 2 августа 2005 г. К этой коллекции в 2015 г. добавлена стержневая коллекция асептической культуры и банк ДНК редких и эндемичных видов растений дикорастущей флоры Беларуси и России. На сегодняшний день в нее входит 38 образцов 33 видов, относящихся к 22 родам и 15 семействам покрытосеменных растений. Задачи:

- создание и/или развитие национальных коллекций культур растительных клеток, меристем, стерильных растений *in vitro* редких и эндемичных видов растений дикорастущей флоры Беларуси, России, на основе сбора природных источников и обмена образцами коллекций между стран ЕврАзЭС;
- разработка научных основ создания коллекций растительных объектов *in vitro* для редких и эндемичных видов растений с целью сохранения генофонда и биоразнообразия, реинтродукции и подходов их промышленного использования для получения биотехнологического растительного сырья;
- физиолого-биохимическая характеристика культур клеток, органов и тканей редких и эндемичных видов растений; в т. ч. по содержанию БАВ и биологической активности;
- оптимизация унифицированных правил депонирования растительных образцов *in vitro* для редких и эндемичных видов растений, в том числе их криосохранение;
- создание общих баз данных по этим коллекциям;
- проведение школ (семинаров); гармонизация правил предоставления доступа и передачи депонированных объектов *in vitro* для редких и эндемичных видов растений в соответствии с международными соглашениями и стандартами. В ЦБС коллекция постоянно расширяется, для образцов коллекции регулярно проводится подбор сред для культивирования и депонирования. Семена и меристемы некоторых редких видов растений передаются в криобанк Института физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН на долгосрочное хранение. Разработаны и применяются методы оценки параметров генетического разнообразия (ГР) популяций охраняемой природной флоры для включения в коллекцию *in vitro* и поддержания оптимальных параметров ГР. Препараты ДНК передаются в банк ДНК, который создан в ЦБС для интегрирования с существующими коллекциями. Данные о растениях регистрируются в информационно-поисковой системе Hortus Botanicus Centralis — Info.

Plant biotechnology conservation: collections *in vitro* and DNA bank of rear species in the Central botanical garden NAS of Belarus

**Spiridovich E. V., Vlasava N. B., Kozlova O. N., Vaynovskaya I. F., Yukhimuk A. N.,
Filipenia V. L., Khotlyanik N. V., Kuzmenkova S. M., Reshetnikov V. N.**

Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, 2v Surganova st., 220012,
Minsk, Republic of Belarus, fax/tel.:+375(17)284-14-84, e-mail: e.spiridovich@cbg.org.by

Advances in plant biotechnology, especially those associated to *in vitro* culture and molecular biology, have provided powerful tools to support and improve conservation and management of plant diversity in the botanical gardens. At present in the Central botanical garden NAS of Belarus (CBG) biotechnological methods have been used to conserve endangered, rare, crop ornamental, medicinal and forest species, allowing the conservation of pathogen-free material, elite plants and genetic diversity for short-, medium- and long-term. *In vitro* conservation is especially important for vegetatively propagated and for non-orthodox seed plant species. Furthermore, *in vitro* techniques offer a safe mean to internationally exchange plant material, enable the establishment of extensive collections using minimum space, allow supply of valuable material for wild population recovery and facilitate molecular investigations and ecological studies.

The CBG constantly works with the collection “Rare and Endangered Species of the Natural Flora of Belarus”, in which the plants are preserved *ex situ*, the certificate of the Ministry of Natural Resources and Environmental Protection of the Republic of Belarus No. 23 of August 2, 2005. A core collection of aseptically cultured and a DNA bank of rare and endemic plant species of the wild flora of Belarus and Russia on the basis of natural samples and existing *in vitro* collections of the EurAsEC countries have joined to this collection in 2015. To date, collection *in vitro* includes 38 samples of 33 species belonging to 22 genera and 15 families of angiosperms. Sampling for the *in vitro* collection of cells and tissues cultures and maintaining the genetic purity of taxa are carried out on the basis of modern molecular genetic methods.

Objectives:

- creation and/ or development of national collections of plant cell cultures, meristems, sterile plants *in vitro* of rare and endemic plant species of the wild flora of Belarus, Russia, based on the collection of natural sources and the exchange of samples of collections between the EurAsEC countries;
- development of scientific foundations for the creation of *in vitro* plant collections for rare and endemic plant species in order to preserve the gene pool and biodiversity, reintroduction and approaches to their industrial use for obtaining biotechnological plant raw materials;
- physiological and biochemical characteristics of cell, organ and tissue cultures of rare and endemic plant species; in t. ch. on the content of BAS and biological activity;
- optimization of unified rules for the deposition of plant samples *in vitro* for rare and endemic plant species, including their cryopreservation;
- creating common databases for these collections;
- holding schools (seminars); harmonization of rules for granting access and transfer of deposited objects *in vitro* for rare and endemic plant species in accordance with international agreements and standards. Optimization of nutrient media for the tissue culture propagation and the deposit of rare and endemic plants species, including medicinal is carried out. Seeds and meristems of several rare species were deposited to Cryobank of the Institute of Plant Physiology named after K. A. Timiryazev of Russian Academy of Sciences for the long-term storage. Methods for assessing the genetic diversity parameters (GD) of natural populations of protected natural flora for inclusion in the collection and preservation and maintenance of optimal parameters of the GR were developed and applied. DNA preparations are transferred to the DNA bank, which is created in the CLS for integration with existing collections. Data records on plants are deposited in retrieval system ‘Hortus Botanicus Centralis — Info’.

Прораствание семян шести видов ковылей *Stipa* L. до и после криосохранения

Спринчану Е. К.¹, Антипин М. И.², Высоцкая О. Н.¹

¹ Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, ул. Ботаническая, 35, Москва, 127276, Россия, e-mail: cryo@ippras.ru, cryo_ippras@mail.ru

² «Аптекарьский огород» Ботанического сада Московского государственного университета, пр-т Мира, 26, стр. 1, Москва, 129090, Россия

Обширные территории с богатыми плодородными почвами, где в природных сообществах доминируют травянистые растения, во всем мире интенсивно используют для производства продуктов питания. В связи с этим биоразнообразие природных степных и лесостепных экосистем катастрофически снижается. Сосредоточенные на юге России богатейшие черноземные почвы тысячелетиями формировали уникальные травянистые сообщества. В наше время, большая часть этих территорий занята пастбищами и пахотой. Сохранившаяся на немногочисленных охраняемых территориях природная растительность целинных степей очень разнообразна и может быть представлена различными сообществами растений, где преобладают травы, в том числе ковыли. Род ковылей (*Stipa* L.) включает в себя более трех сотен видов. Некоторые из них занесены в различные Красные книги и нуждаются в таких специальных методах защиты, как криосохранение. В связи с этим мы исследовали влияние жидкого азота (-196°C) на всхожесть семян некоторых видов ковылей. Известно, что метаболические процессы в клетках практически прекращаются при температурах ниже -136°C и поэтому устойчивые к замораживанию образцы биологического материала можно сохранять в криогенных хранилищах в течение длительного времени. Такие условия хранения позволяют сохранять обширные коллекции ортодоксальных семян, принадлежащих редким и исчезающим видам растений на очень небольшой территории криобанка.

Многие растения аридных мест обитания, как правило, продуцируют семена, которые можно отнести к группе ортодоксальных, поскольку они могут сохранять свою всхожесть при существенном подсушивании. Семена ковылей (*Stipa* L.) также устойчивы к обезвоживанию, а значит должны сохранять жизнеспособность после криогенного замораживания. Мы исследовали влияние криосохранения на всхожесть семян шести видов ковылей *S. adoxa* Klokov & Osychnyuk, *S. dasyphylla* (Lindem.) Trautv., *S. pulcherrima* C. Koch., *S. ucrainica* P. Smirn., *S. sareptana* A. Beck., *S. tirsia* Steven. Наши исследования показали, что семена ковыля сарептского (*S. sareptana*) отличались высокой всхожестью, как в контроле (54–79%), так и после криосохранения (82–100%). Всхожесть в грунте семян ковылей опушеннолистного (*S. dasyphylla*), украинского (*S. ucrainica*) и узколистного (*S. tirsia*) варьировала до криогенного замораживания от 7 до 12%, а после жидкого азота и стратификации существенно увеличивалась до 13–27%. Семена ковылей незаметного (*S. adoxa*) и красивейшего (*S. pulcherrima*) всходили в грунте только после замораживания в жидком азоте. Интересно, что всхожесть семян *S. pulcherrima* возрастала до 50% только после применения холодовой стратификации и криогенного замораживания. Обработка экспериментальных семян 30% раствором едкого натрия также увеличивала их лабораторную всхожесть (влажная фильтровальная бумага в чашках Петри) до 25–90,3% (данные для семенных образцов после 1 года хранения в жидком азоте).

Таким образом, показано, что ортодоксальные семена 6 видов рода ковылей можно сохранять в условиях криобанка. Однако даже после криосохранения для получения сеянцев из большинства семенных образцов ковылей необходимо применять специальные методы стимуляции всхожести.

The germination of six needlegrass species (*Stipa* L.) before and after cryopreservation

Sprinchanou E. K.¹, Антипин М. И.², Высоцкая О. Н.¹

¹ K. A. Timiryazev Institute of Plant Physiology Russian Academy of Sciences, 35 Botanicheskaya st., 127276, Moscow, Russian Federation, tel.: (8-499) -678-54-21, e-mail: cryo@ippras.ru; cryo_ippras@mail.ru

² The Apothecaries' Garden of the Botanic Gardens of Moscow State University, Prospect Mira, 26, st. 1. 127276, Moscow, Russian Federation

.....

In worldwide the large areas with rich fertile soils are intensive used for food production. Numerous herbaceous plants are dominated in natural communities of these territories. In connected with the biodiversity of native grassland ecosystems catastrophically decreases. The richest chernozem soils concentrated in the south of Russia were formed by unique herbaceous communities for thousands of years. Now the most part of these lands are occupied by pastures and plowings. The natural vegetation of virgin steppe, preserved in a few protected areas, is very diverse and can be represented by various plant communities, where predominate such herbs, as feather grasses (*Stipa* L.). The *Stipa* genus includes more than three hundred species. Some of them are listed in different Red Books and need in such special protection techniques as cryopreservation. In this regard, we have investigated the effect of liquid nitrogen (-196°C) on seeds of a few feather grass species. It is known that metabolic processes in cells are practically stopped at temperatures below -136°C and therefore freeze-resistant specimens of biological material can be preservation in cryogenic repositories for a long time. Such storage conditions allow to store of rich collection of orthodox seeds belonged to rare, endangered and threatened species of plants on a very small area of cryobank.

Many plants of arid habitats, as a rule, produce seeds, which can be considered to orthodox group, because they can to storage their ability to germinate after significantly desiccation. Seeds of feather grasses (*Stipa* L.) also are resistant to dehydration and therefore must remain viable after cryogenic freezing. We investigated of cryopreservation effect on seed germination of six species of feather grasses: *S. adoxa* Klokov & Osychnyuk, *S. dasyphylla* (Lindem.) Trautv., *S. pulcherrima* C. Koch, *S. ucrainica* P. Smirn., *S. sareptana* A. Beck., *S. tirsia* Steven. Our experiments showed that *Stipa sareptana* seeds have a high germination both in control (54–79%) and after cryopreservation (82–100%). The soil germination of seeds for *S. dasyphylla*, *S. ucrainica* and *Stipa tirsia* have varied before cryogenic freezing from 7 to 12% and after liquid nitrogen and cold stratification significantly increased to 13–27%. Seeds of two other species (*S. adoxa* and *S. pulcherrima*) germinated in soil only after liquid nitrogen. It is interesting that seed germination of *S. pulcherrima* increased to 50% only after application complex of cold stratification and cryopreservation. The treatment of experimental seeds by 30% aqueous solution of sodium hydroxide increased their laboratory germination on wet filter paper in Petri dishes to 25–90% (data for seed specimens after one year storage in liquid nitrogen).

Thus, it is shown that orthodox seeds of six species of *Stipa* genus can storage in cryobank. However even after cryopreservation it is necessary to apply of specially methods for stimulation germination of seeds to obtain seedlings from most collection specimens of feather grasses.

Изучение взаимосвязи между активностью глюкуронидазы и образованием флавоно-агликонов в дифференцированных и недифференцированных *in vitro* культурах шлемника байкальского

Степанова А. Ю., Соловьева А. И., Евсюков С. В.

Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, ул. Ботаническая, 35, Москва, 127276, Россия, тел.: +7(499)678-53-97, e-mail: step_ann@mail.ru

Шлемник байкальский (*Scutellaria baicalensis*) — растение, широко используемое в традиционной китайской медицине. Лекарственные свойства корней шлемника объясняются наличием в них четырех доминирующих флавонов: вогонина, вогонозида, байкалина, байкалеина. Среди них выраженной физиологической активностью обладают флавоно-агликоны — байкалеин и вогонин. Потому увеличение их содержания является актуальным. Одним из путей образования флавоно-агликонов является гидролиз соответствующих глюкуронидов с помощью эндогенной β -глюкуронидазы. Однако в зависимости от степени дифференцировки культуры активность глюкуронидазы может быть различной, следовательно, флавоно-агликоны могут образовываться также в различных количествах. В связи с этим целью нашей работы было изучение взаимосвязи между активностью глюкуронидазы и синтезом флавоно-агликонов в недифференцированных (каллусах, суспензиях) и дифференцированных (*hairy roots*) культурах шлемника байкальского. *Hairy roots* выращивали в жидкой среде В5 без гормонов; суспензионную культуру и каллусы — на агаризованной среде В5, дополненной 1 мг/л 2,4-Д и 1 мг/л кинетина. Во всех культурах, кроме *hairy roots*, преобладающим глюкуронидом был байкалин, агликоном — байкалеин. В *hairy roots* содержание вогонозида было сопоставимо с содержанием байкалина. По соотношению глюкурониды : агликоны *hairy roots* и суспензионная культура были схожи — в течение цикла культивирования преобладали глюкурониды. В данных культурах содержание агликонов составляло от 1,5 до 12 мг/г сухой массы с максимумом содержания на 7–14 день культивирования, глюкуронидов — 17–47 мг/г сухой массы. В каллусах соотношение глюкурониды : агликоны колебалось в течение цикла культивирования, в течение первых двух недель преобладали агликоны, а в последующие — глюкурониды. Максимум содержания агликонов приходился на 7 сутки цикла культивирования (36,5 мг/г сухой массы), глюкуронидов — на 21 сутки (14,5 мг/г сухой массы). Однако при измерении активности эндогенной β -глюкуронидазы в недифференцированных культурах отмечено ее незначительное колебание в течение цикла культивирования — 0,9–3 нмоль 4-MU/(час мкг белка) для суспензий и 3–7 нмоль 4-MU/(час мкг белка) — для каллусов. При помещении каллусов на среду без гормонов содержание агликонов и глюкуронидов резко возрастало до 25–70 мг/г и 19–45 мг/г соответственно. Несмотря на увеличение содержания агликонов, активность эндогенной β -глюкуронидазы возрастала незначительно, данный показатель и образование флавоно-агликонов не коррелировали друг с другом. Однако при анализе активности глюкуронидазы в *hairy roots* отмечены ее резкие изменения в течение цикла культивирования от 9 до 180 нмоль 4-MU/(час мкг белка) со средней активностью на большей части цикла 14–32 нмоль 4-MU/(час мкг белка). Используя коэффициент корреляции Спирмена, нами была установлена значимая корреляция только между активностью эндогенной β -глюкуронидазы и содержанием вогонина. Таким образом, отсутствие значимой активности эндогенной β -глюкуронидазы в недифференцированных культурах, наиболее вероятно, связано с незначительным исходным содержанием глюкуронида вогонозида. Вероятно, в недифференцированных культурах повышение уровня содержания агликонов происходит за счет ингибирования процесса образования глюкуронидов, а именно, фермента УДФ-глюкуронозилтрансферазы, переносящей остаток глюкуроновой кислоты.

Investigation of relationship between β -glucuronidase activity and flavone-aglycones content in differentiated and undifferentiated *in vitro* Baikal skullcap cultures

Stepanova A. Yu., Solov'eva A. I., Evsyukov S. V.

K. A. Timiryazev Institute of Plant Physiology Russian Academy of Sciences, 35 Botanicheskaya st., 127276, Moscow, Russian Federation, fax: +7(499)678-54-00, tel.: +7(499)678-53-97, e-mail: step_ann@mail.ru

Baikal skullcap (*Scutellaria baicalensis*) is plant widely used in Chinese medicine. The skullcap roots have medicinal properties because it contains four dominant flavones, baicalein, baicalin, wogonin, and wogonoside. The flavones-aglycones (baicalein and wogonin) have pronounced physiological activity. Therefore, its content increasing is relevant. One of ways of the flavones-aglycones formation is the respective glucuronides hydrolyze by endogenous β -glucuronidase. However, the glucuronidase activity might be different depending on differential culture degree. Consequently, the flavones-aglycones might be generated in different amounts. Thereby, the aim of our study is investigation of the relationship between endogenous β -glucuronidase activity and the flavone-aglycones content in differentiated and undifferentiated *in vitro* Baikal skullcap cultures. *Hairy roots* have been cultivated in liquid medium B5 without hormones; suspension and calli — on agar medium B5 with 1 mg/l 2,4-D and 1 mg/l kinitin. In all the cultures, exception the *hairy roots*, dominant glucuronide was baicalin, aglycone — baicalein. In the *hairy roots* wogonoside content was comparable with baicalin content. The *hairy roots* and the suspension culture were similar in ratio glucuronides : aglycones, during cultivation cycle the glucuronides was dominant. In this cultures the aglycones content was from 1.5 to 12 mg/g of dry weight (maximum content on 7–14 culturing day); the glucuronides — 17–47 mg/g of dry weight. In the calli the ratio glucuronides : aglycones fluctuated during cultivation cycle, in the two initial weeks the aglycones was dominant, but in the next weeks — the glucuronides. Maximum of the aglycones content was on 7 day of cultivation cycle (36.5 mg/g of dry weight), the glucuronides — on 21 day (14.5 mg/g of dry weight). However, in measuring of endogenous β -glucuronidase activity have been shown its insignificant fluctuation during cultivation cycle, 0.9–3 nmoles 4-MU/(h mkg protein) in the suspensions and 3–7 nmoles 4-MU/(h mkg protein) in the calli. After the calli replacement on the medium without hormones the content of aglycones and glucuronides dramatically increased until 25–70 mg/g и 19–45 mg/g, respectively. Despite of the aglycones content increasing, endogenous β -glucuronidase activity insignificantly increased this measure and the flavones-aglycones formation did not correlate to each other. However, the glucuronidase activity dramatically varied during the cultivation cycle from 9 to 180 4-MU/(h mkg protein), the average activity, on a large part of the cycle, was 14–32 4-MU/(h mkg protein). By drawing on Spirmen correlation coefficient only significant correlation between endogenous β -glucuronidase activity and wogonin content have been found. Thus, absence of significant endogenous β -glucuronidase activity in the undifferentiated cultures, most likely, have related with insignificant content of the glucuronid, wogonoside. Probably, in the undifferentiated cultures the aglycones content improved by inhibition of the glucuronides generation process, in particularly, UDP-glucuronosyltransferase transferred glucuronic acid moiety.

Цитогенетический анализ влияния бактерии *Serratia fonticola*, выделенных из проб многолетнемерзлых пород, на клетки корневой системы *Allium cepa* L.

Субботин А. М., Петров С. А., Мальчевский В. А. Хрупа Д. А.

Федеральный исследовательский центр Тюменский научный центр Сибирского отделения РАН, ул. Малыгина, 86, Тюмень, 625026, Россия, тел.: +7(345)268-87-89, e-mail: d.a.khrupa@mail.ru

В результате процессов деструкции многолетнемерзлых пород (ММП) как антропогенного, так и естественного характера, микроорганизмы, длительное время сохранявшиеся в «вечной мерзлоте», попадают в современные экобиоценозы и взаимодействуют с современными организмами. Последствия взаимодействия макроорганизм-микроорганизм из ММП мало изучены и представляют несомненный интерес. В то же время, имеется значительное количество работ показывающих, что бактерии могут оказывать существенное влияние на физиологические процессы у лабораторных животных и растений.

В работе использовали штамм бактерий *Serratia fonticola*, выделенный из ММП и идентифицированный методом сиквенса по 16S RNA в ФГУП «ГосНИИГенетика». Для оценки активности цито- и генотоксического воздействия данного штамма использовали Allium-тест, который проводили на луке репчатом (*Allium cepa* L.), сорт российской селекции ВНИИССОК 'Черный принц'. Растительный материал выращивали без доступа солнечного света при температуре $20 \pm 2^\circ\text{C}$ в центрифужных пробирках, заполненных 50 мл дистиллированной воды. Через 48 ч проращивания были отобраны луковицы, у которых средняя длина 10 крупных корней на одном растении составляла 18 ± 3 мм. Средой для проращивания послужил смыв дистиллированной воды с мясопептонного агара. Растения проращивались 96 ч на суспензии бактериальных клеток в дистиллированной воде в концентрации 1×10^6 , 1×10^9 и 1×10^{12} микробных клеток в 1 мл соответственно. Определяли среднюю длину 10 крупных корней, которые затем помещали в фиксатор Кларка на 24 ч при температуре 5°C . Из полученного материала готовили давленные цитологические препараты, которые окрашивали 2% ацетоарсеином. Анализ препаратов и фотографии клеток корневой меристемы выполняли на микроскопе AxioImager A1 («Zeiss»), используя лицензионное программное обеспечение AxioVision 4.7.1 и видеокамеру AxioCam MRc5 («Zeiss»).

При цитологическом анализе 10 000 клеток на всех стадиях жизненного цикла рассчитывали митотический индекс и регистрировали хромосомные aberrации: микроядра, мосты, фрагменты, отставания и забегания хромосом. Клетки с неопределенным типом aberrаций регистрировали как клетки с патологиями ядерного аппарата. Определяли митотический индекс и частоту встречаемости aberrантных клеток по В. А. Iwalokun (2011). Установлено, что исследуемый штамм бактерий не оказывает ингибирующего воздействия на рост корневой системы *Allium cepa* L., но проявляет цитотомодулирующие и генотоксические свойства. Так в контрольной группе митотический индекс (%) составил $5,8 \pm 2,2$, в концентрации 1×10^6 микробных клеток — $5,1 \pm 1,2$, в 1×10^9 и 1×10^{12} соответственно $6,0 \pm 1,4$ и $6,7 \pm 1,5$. Митотический индекс в эксперименте достоверно снизился на 12,1% при добавлении микробных клеток в концентрации 1×10^9 и увеличился на 15,5% при добавлении 1×10^{12} микробных клеток. При этом увеличилось количество клеток с индуцированными хромосомными aberrациями от $0,62 \pm 0,02$, $0,87 \pm 0,02$ и $1,0 \pm 0,03$ соответственно ($0,14 \pm 0,03$ в контроле).

Таким образом, бактерии штамма *Serratia fonticola*, выделенные из ММП, могут приводить к дестабилизации кариотипа и активации соматического мутагенеза корневой меристематической ткани *Allium cepa* L. и индуцировать такие аномалии ядерного аппарата клетки, как фрагменты, мосты, отставания и забегания хромосом.

Работа выполнена по госзаданию, согласно Плану НИР ТюмНЦ СО РАН на 2018–2020 гг., протокол № 2 от 8.12.2017 (Приоритетное направление IX.133. Программа IX.133.1. Проект: IX.133.1.4. Криобиологические процессы на суше и в прибрежной части Карского моря в условиях повышения среднегодовых температур).

The cytogenetic analysis of influence of a bacterium of *Serratia fonticola* allocated from samples of permafrost rock on cages of the root system *Allium cepa* L.

Subbotin A. M., Petrov S. A., Malchevsky V. A., Khrupa D. A.

Tyumen Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, 26 Malygina ave., 625026, Tyumen, Russian Federation, tel.: +7(345)268-87-89, e-mail: d.a.khrupa@mail.ru

In response to processes of destruction of permafrost rock of both anthropogenic, and natural character, the microorganisms, a long time remaining in “permanent frost” get about modern ecobio-cenoses and interact with modern organisms. Interaction consequences a macroorganism-microorganism from permafrost rock are underexplored and are of undoubted interest. At the same time, there is appreciable quantity of the papers showing that bacteria can have a great impact on physiological processes at laboratory animals and plants.

In work used the strain of bacteria of *Serratia fonticola* separated from permafrost rock and identified by a sequencing method on 16S RNA in SRCGosNIgenetika For assessment of activity cyto- and genotoxic influence of this strain used the Allium-test which was carried out on onion (*Allium cepa* L.), grade of the Russian selection of VNISSOK ‘The black prince’. Plant material grew up without access of sunshine at a temperature of $20\pm 2^\circ\text{C}$ in the centrifugal test-tubes filled with 50 ml of the distilled water. In 48 hours of a sprouting onions at which the average length of 10 large roots on one plant was 18 ± 3 mm have been selected. Medium for germination washout of the distilled water from an agar-meat infusion has served. Plants it was germinated by 96 hours on suspensions of bacterial cells in the distilled water in concentration of 1×10^6 , 1×10^9 and 1×10^{12} microbial cells in 1 ml respectively. The average length of 10 large roots was determined, which was then placed in a Clark retainer for 24 hours at a temperature of 5°C . From the obtained material, pressed cytological preparations were prepared, which were stained with 2% acetoarsein. The analysis of specimens and the photo of cages of a root meristem carried out on a microscope of AxioImager A1 (“Zeiss”), using the license software of AxioVision 4.7.1 and the AxioCam MRc5 video camera (“Zeiss”).

In the cytologic analysis of 10 000 cells at all stages of life cycle counted the mitotic index and registered chromosome aberration: microkernels, bridges, fragments, lagging and overlaps of chromosomes. Cells with an indeterminate type of aberrations were registered as cells with pathologies of the nuclear apparatus. The mitotic index and degree of the incident the abberant cells by V. A. were determined. V. A. Iwalokun (2011). It is established that the studied strain of bacteria doesn't make the inhibiting impact on growth of the root *Allium cepa* L. system, but shows cytotomodulating and genotoxic properties. So in observational group the mitotic index (%) was 5.8 ± 2.2 , in concentration of 1×10^6 microbial cells — 5.1 ± 1.2 , in 1×10^9 and 1×10^{12} respectively 6.0 ± 1.4 and 6.7 ± 1.5 . The mitotic index in an experiment has significantly decreased by 12.1% at addition of microbial cells in concentration 1×10^9 and has increased by 15.5% at addition of 1×10^{12} microbial cells. in addition the cells number with the induced chromosomal aberration from 0.62 ± 0.02 , 0.87 ± 0.02 and 1.0 ± 0.03 respectively has increased (0.14 ± 0.03 in control).

Thus, the bacteria of the *Serratia fonticola* strain separated from permafrost rock can lead to destabilizing of the karyotype and the activation of somatic mutagenesis of the root meristematic tissue of *Allium cepa* L. and induce such anomalies in the nuclear apparatus of the cell as bridges, fragments, lagging and overlaps of chromosomes.

Work is performed on a state task, according to plan the Tyumen scientific center of the SB RAS for 2018–2020, protocol No. 2 from 12/8/2017 (Priority direction IX.133. IX.133.1 program. Project: IX.133.1.4. Cryobiological processes on the land and in a coastal part of the Kara Sea within the conditions of increase in average annual temperature).

Биотехнологические методы в селекции чечевицы

Суворова Г. Н.

Всероссийский научно-исследовательский институт зернобобовых и крупяных культур,
ул. Молодежная, кор. 1, Орел, 302502, n/o Стрелецкое, Россия,
факс: +7(486)240-31-30, тел.: +7(486)240-32-24, e-mail: galina@vniizbk.ru

Чечевица является ценной бобовой культурой с содержанием белка в зерне до 32%. Она быстро разваривается и легко усваивается, что делает ее популярной во всем мире. Хотя производство чечевицы ежегодно увеличивается, вследствие биологических особенностей, урожай ее остается низким. Замена местных популяций селекционными сортами привела к снижению генетического разнообразия культурной чечевицы. Изменить биологический потенциал данной культуры можно, используя зародышевую плазму дикорастущих видов и подвидов, многие из которых являются более устойчивыми к стрессовым воздействиям среды и патогенам.

Известно 7 таксонов рода *Lens* Mill. в разной степени совместимых с культурной чечевицей *L. culinaris* Medik. Нами получены гибриды чечевицы с видом *L. orientalis* (Boiss) Hand.-Mazz. (по некоторым данным *L. culinaris* ssp. *orientalis*) и видом *L. tomentosus* Ladizinsky. Дикорастущие виды обычно низкорослые, имеют стелющийся стебель, мелкие растрескивающиеся бобы, мелкие окрашенные семена, фиолетовые цветки.

В комбинации *L. culinaris* × *L. orientalis* ILWL7 семена завязывались при обычном скрещивании. Для преодоления периода покоя, унаследованного от дикорастущих видов, семена F1 проращивали *in vitro* на средах с ауксинами, что также повышало их жизнеспособность.

В комбинации *L. culinaris* × *L. tomentosus* использовали культуру изолированных семяпочек, которые в возрасте 7–20 суток после опыления культивировали на средах, содержащих цитокинины и ауксины. В культуре семяпочек происходило развитие зародышей по пути прямого или непрямого эмбриогенеза. Спасенные зародыши дали начало развитию растений F1. Наиболее жизнеспособное семенное потомство было получено при скрещивании с образцом *L. tomentosus* ILWL 120 в сравнении с ILWL 90.

Гибриды идентифицировали с помощью морфологических или молекулярных маркеров. Для идентификации гибридов *L. culinaris* × *L. orientalis* использовали RAPD-праймеры OPW2 и CS33, для гибридов *L. culinaris* × *L. tomentosus* — праймеры OPF4 и CS4.

В результате селекционной работы с гибридными популяциями получен разнообразный генетический материал. Созданы 2 сорта чечевицы. Сорт 'Восточная' получен в результате многократного индивидуального отбора из гибридной популяции ('Пауза' × *L. orientalis* ILWL7). Имеет белую окраску цветка, желтую окраску семян и семядолей, внесен в Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию в Российской Федерации в 2017 г. Сорт 'Чернава' выведен в результате отбора из гибридной популяции ('Светлая' × (Образцов 'Чифлик 7' × *L. orientalis* ILWL7)). Имеет фиолетовую окраску цветка, черно-пеструю окраску семян и красную окраску семядолей. Передан в Государственное сортоиспытание в 2016 г. С использованием праймера CS33 показана интрогрессия генетического материала дикорастущего образца *Lens orientalis* ILWL 7 в геном новых сортов чечевицы 'Восточная' и 'Чернава'.

Таким образом, сочетание биотехнологических методов с методами классической селекции позволило создать новые высокоурожайные сорта чечевицы.

Biotechnological approaches in lentil breeding

Suvorova G. N.

The All-Russia Research Institute of Legumes and Groat Crops, 1 Molodeznaya st., 302502, Orel, p/b Streletskoye, Russian Federation, fax: (4862)403130, tel.: (4862)403224, e-mail: galina@vniizbk.ru

.....

Lentil is a valuable crop which grain contains up to 32 % protein. It is quickly cooked and easily digested, which makes it popular all over the world. Though lentil production is increased, the yield is very low because of its biological features. Replacement of local lentil populations by the breeding cultivars has led to a narrowing of the genetic diversity of cultivated lentil. Change of lentil biological potential is possible if the germplasm of wild relatives many of which are more resistant to abiotic stresses and pathogens will be used.

7 taxa of the genus *Lens* Mill. are known which are more or less compatible to the *L. culinaris* Medik. We have obtained the hybrids between cultivated lentil and the species *L. orientalis* (Boiss) Hand.-Mazz. (*L. culinaris* ssp. *orientalis*) and *L. tomentosus* Ladizinsky. Wild species have low procumbent stem, small dehiscent pods, small colored seeds, violet flowers.

In cross of *L. culinaris* × *L. orientalis* ILWL7 the seeds set by usual way. The F1 seeds were germinated *in vitro* on media with auxins in order to overcome the seed dormancy inherited from the wild species, that also increased their viability.

In cross of *L. culinaris* × *L. tomentosus* the ovule rescue technique was used. The isolated ovules 7–20 days after pollination were grown on media containing both cytokinins and auxins. The embryos developed *in vitro* on pathway of direct or indirect embryogenesis giving F1 plants. The most viable progenies were obtained in cross to the accession *L. tomentosus* ILWL 120 comparatively to the accession ILWL 90.

The hybrids were identified by means of morphological or molecular markers. The RAPD primers OPW2 and CS33 were used to identify *L. culinaris* × *L. orientalis* hybrids, the primers OPF4 and CS4 identified *L. culinaris* × *L. tomentosus* hybrids.

As a result of breeding work with hybrid population the various genetic material has been obtained. Two varieties ‘Vostocnaya’ and ‘Chernava’ have been created. Variety Voctochnaya has been obtained as a result of multiple individual selection in a hybrid population (‘Rauza’ × *L. orientalis* ILWL7). It has white flower color, yellow color of seed coat and cotyledons. It is registered in 2017. Variety ‘Chernava’ has been creaste as a result of selection in a hybrid population (‘Svetlaya’ × (Obraztsov ‘Chiflik 7’ × *L. orientalis* ILWL7)). It has violet flowers, black-spotted seed coat and red cotyledons. V. Chernava was included into the State trials in 2016. Introgression of the genetic material of wild accession *Lens orientalis* ILWL 7 into genome of the new varieties Vostocnaya and Chernava was shown with the use of primer CS33.

Our results have demonstrated that combination of biotechnological approaches and classic breeding resulted in the creation of new high yielding lentil varieties.

Перспективность использования ISSR и IRAP ДНК-маркеров для анализа генетической стабильности видов *Eryngium maritimum* L., *Galanthus woronowii* Losinsk., *Campanula sclerophylla* Kolak. при размножении *in vitro*

Супрун И. И.¹, Маляровская В. И.², Степанов И. В.¹, Самарина Л. С.²

¹ Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия,
ул. им. 40-летия Победы, 39, Краснодар, 350901, Россия,
факс: +7(861)257-57-02, тел.: +7(918)018-02-88

² Всероссийский научно-исследовательский институт цветоводства и субтропических культур,
ул. Яна Фабрициуса, 2/28, Сочи, 354002, Россия, факс: +7(862) 246-80-16, тел.: +7(918)409-48-66,
e-mail: malyarovskaya@yandex.ru

Впервые для видов *Eryngium maritimum* L., *Galanthus woronowii* Losinsk. и *Campanula sclerophylla* Kolak. была выполнена масштабная апробация и поиск информативных ISSR и IRAP ДНК-маркеров, перспективных для выполнения генотипирования и анализа генетической стабильности растений-регенерантов из культуры *in vitro*. В выборке из 33 ISSR маркеров апробированных на генотипах целевых видов дали ПЦР-продукты различной степени выраженности. Для растений синеголовника приморского среди ISSR-маркеров, для которых была выявлена амплификация, идентифицировали от 1 (маркеры X11 и UBC 853) до 13 фрагментов (маркер UBC818) в электрофоретическом спектре. По маркерам UBC 827, UBC 817, 3A30, 3A35, 3A37, M8 и UBC 826 амплификации выявлено не было. Для вида *C. sclerophylla* выявлено 7 высокоинформативных маркеров. При этом количество ДНК-фрагментов у маркеров варьировало от 1 (маркеры 3A21, X9, UBC 853, UBC 826, X 11) до 8 (маркеры UBC 864, ASSR 29 и UBC 818). Для другого вида *G. woronowii* из использованного в работе набора ISSR маркеров 8 не дали ПЦР-продукта: UBC 813, ASSR20, 3A39, 3A30, M8, UBC 826, X 11, UBC 807. По остальным 25 маркерам прошла амплификация с различной степенью эффективности. При этом ISSR-маркеры, по которым прошла ПЦР, в электрофоретическом спектре обладали от 1 (маркеры UBC 810, M1, UBC 815) до 9 фрагментов (маркер UBC 844).

Из составленных наборов ISSR отобраны 5 наиболее информативных маркеров для проведения генотипирования выборок регенерантов и маточных растений каждого вида. Для генотипирования растений *E. maritimum* были использованы: UBC 811, UBC 844, UBC 813, X10 и UBC 824. В результате анализа микрорастений из культуры *in vitro* и маточных растений, из которых были получены регенеранты, установлено, что по всем маркерам наблюдались идентичные фингерпринты как между регенерантами так и у маточного растения. Генотипирование регенерантов колокольчика твердолистного проводилось с использованием следующих 5 маркеров: ASSR15, UBC 824, UBC 818, ASSR 20, UBC864. Генотипирование проводилось на 33 образцах, 30 регенерантов и маточного растения, и двух образцов отобранных из природной популяции. У маточного растения и регенерантов наблюдались идентичные фингерпринты, в свою очередь растения из природной популяции обладали специфическими ДНК-фингерпринтами отличными от выборки регенерантов.

Исследования проведены при финансовой поддержке РФФИ и администрации Краснодарского края (проект № 16-44-230274)

Prospects of the use of ISSR and IRAP DNA markers for the analysis of genetic fidelity of species *Eryngium maritimum* L., *Galanthus woronowii* Losinsk., *Campanula sclerophylla* Kolak. after *in vitro* propagation

Suprun I. I.¹, Malyarovskaya V. I.², Stepanov I. V.¹, Samarina L. S.²

¹ North-Caucasian Federal Scientific Center of Horticulture, Viticulture and Wine-Making, 39, im. 40-letiya Pobedi st., 350901, Krasnodar, Russian Federation, fax: +7(861)257-57-02, tel.: +7(918)018-02-88

² Russian Research Institute of Floriculture and Subtropical Crops, 2/28 Yana Fabriciusa st., 354002, Sochi, Russian Federation, fax: +7(862)246-80-16, tel.: +7(918)409-48-66, e-mail: malyarovskaya@yandex.ru

.....

Comprehensive testing and search of informative ISSR and IRAP DNA markers for genotyping and analysis of genetic fidelity of regenerated plants propagated *in vitro* was performed for the first time for species *Eryngium maritimum* L., *Galanthus woronowii* Losinsk. and *Campanula sclerophylla* Kolak. A set of 33 ISSR markers tested on the genotypes of the species was resulted PCR products of varying performance degrees. For *Eryngium maritimum* plants from 1 (markers X11 and UBC 853) to 13 amplified fragments (marker UBC818) were detected among the ISSR markers in the electrophoresis spectrum. Using the markers of UBC 827, UBC 817, 3A30, 3A35, 3A37, M8 and UBC 826, no amplification was detected. For the species *C. sclerophylla*, 7 highly informative markers were identified. The number of DNA fragments in the markers varied from 1 (markers 3A21, X9, UBC 853, UBC 826, X11) to 8 (markers UBC 864, ASSR 29 and UBC 818). For another species of *G. woronowii*, 8 ISSR-marker resulted no PCR product: UBC 813, ASSR20, 3A39, 3A30, M8, UBC 826, X11, UBC 807. The other 25 markers resulted amplification with varying degrees of efficacy. In this case, the ISSR markers with positive PCR amplification showed from 1 (markers UBC 810, M1, UBC 815) to 9 fragments (UBC 844 marker) in the electrophoresis spectrum.

The 5 most informative markers were selected from the set of ISSR, for genotyping of regenerants and stock plants of each species. For the genotyping of *E. maritimum* plants, UBC 811, UBC 844, UBC 813, X10 and UBC 824 were selected. Analysis of *in vitro* propagated plants and the stock plants from which regenerants were obtained revealed that all markers had identical fingerprints as between regenerants and in the stock plant. Genotyping of the regenerants of the *C. sclerophylla* was carried out using the following 5 markers: ASSR15, UBC 824, UBC 818, ASSR 20, UBC864. Genotyping was performed on 33 samples, 30 regenerants and a stock plant, and two samples taken from a natural population. Identical fingerprints were observed between the stock plant and regenerants, however, plants from the natural population had specific DNA fingerprints different from the set of regenerants.

Acknowledgement: Research was supported by Russian Foundation of Basic Research together with Administration of Krasnodar region (Project No. 16-44-230274).

Получение культуры клеток *Ajuga turkestanica* (Regel) Briq. — продуцента экдистероидов

Суханова Е. С.^{1,2}, Собољкова Г. И.²

¹ Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, биологический факультет, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, Москва, 119234, Россия, тел.: +7(495)939-27-76

² Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, ул. Ботаническая, 35, Москва, 127276, Россия, тел.: +7(499)678-53-91, e-mail: mushilda@mail.ru

Живучка туркестанская (*Ajuga turkestanica*) — эндемик Западного Тянь-Шаня, произрастает на территории Узбекистана и Таджикистана, полукустарник семейства Яснотковые. Побеги живучки туркестанской применяются в спортивной медицине и косметологии, благодаря наличию в них специфического фитоэкдистероида — туркестерона, который по анаболическому эффекту не уступает синтетическим препаратам, не являясь при этом допингом. Туркестерон не токсичен, проявляет тонизирующее действие, стимулирует работоспособность, предохраняет от негативного воздействия различных стрессорных факторов.

Для получения культуры клеток живучки туркестанской в качестве эксплантов использовали листья, черешки, завязи. Образцы растений для получения были привезены из горных районов Узбекистана. Для инициации каллусообразования живучки туркестанской использовали среду Гамборга, для последующего выращивания — среду Гамборга и Мурасиге-Скуга с различными вариациями фитогормонов.

В результате проведенных работ была получена хорошо растущая каллусная культура клеток живучки туркестанской, из которой впоследствии была получена суспензионная культура клеток. При культивировании использовали разные варианты сред, отличающиеся по гормональному составу. В результате проведенных работ были получены несколько линий относительно мелко-агрегированной, хорошо растущей суспензии.

Было показано, что полученные штаммы отличаются достаточно высокими ростовыми показателями. Лаг-фаза составляла от 2 до 4 суток в зависимости от линии. Начальная плотность посадки — 1,5–1,6 г/л по сухой массе. Жизнеспособность полученных штаммов на протяжении всего цикла субкультивирования не опускалась ниже 80%. Максимальное накопление сухой биомассы составляло 10,5–11,2 г/л, индекс роста 7,3–7,8, удельная скорость роста в экспоненте 0,11–0,12. Среди полученных штаммов были как довольно мелко агрегированные — с преобладанием агрегатов размером от 21 до 50 клеток, так и крупно агрегированные — с преобладанием агрегатов размером свыше 50 клеток (до 0,5 см в диаметре).

Предварительный химический анализ показал наличие некоторых экдистероидов в биомассе полученных культур клеток живучки туркестанской.

Полученные культуры выращивали в колбах в течение длительного времени. Один из штаммов был депонирован во Всероссийскую коллекцию культур клеток высших растений (ИФР РАН).

Obtaining of *Ajuga turkestanica* (Regel) Briq. cell culture as a producer of ecdysteroids

Sukhanova E. S.^{1,2}, Sobolkova G. I.²

¹ M. V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 1-12 Leninskie Gory, 119234, Moscow, Russian Federation, tel.: +7(495)939-27-76

² K. A. Timiryazev Institute of Plant Physiology Russian Academy of Sciences, 35 Botanicheskaya st., 127276, Moscow, Russian Federation, tel.: +7(499)678-53-91, e-mail: mushilda@mail.ru

.....

Ajuga turkestanica is an endemic of the Western Tien Shan. It is a semishrub of the *Lamiaceae* family, which grows on the territory of Uzbekistan and Tajikistan. *A. turkestanica* shoots are used in sports medicine and cosmetology, thanks to the presence of a specific phytoecdysteroid — turkesteron, which is not worse by its anabolic effect than synthetic drugs, while not being doping. Turkesteron is non-toxic, it shows a tonic effect, stimulates working capacity, protects against the negative impact of various stressors.

To obtain the cell culture, *A. turkestanica* leaves, leafstalks and ovaries were used as the explants. The plant samples were brought from the mountainous regions of Uzbekistan. For the *A. turkestanica* callus initiation, the Gamborg medium was used, and, for the following cultivation — both Gamborg and Murashige and Skoog media with various variations of phytohormones.

As a result of the work, a well-growing callus cell culture of *A. turkestanica* was obtained, which was used subsequently for the suspension cell culture initiation. When cultivation different variants of hormones composition were tried. Several well-growing and suspension cell lines were obtained as a result.

It was shown that the obtained strains are characterized by sufficiently high growth rates. The lag phase was 2–4 days, depending on the line. The initial density of cells during the subcultivation was 1.5–1.6 g/l by dry weight. The viability of the obtained strains did not drop below 80% throughout the subcultivation cycle. The maximum accumulation of dry biomass was 10.5–11.2 g/l, the growth index — 7.3–7.8, the specific growth rate in the exponential phase — 0.11–0.12. Among the obtained strains, there were ones with small aggregates — with a predominance of aggregates from 21 to 50 cells, as well as the others with big aggregates — with a predominance of aggregates with more than 50 cells (up to 0.5 cm in diameter).

Preliminary chemical analysis showed the presence of some ecdysteroids in the biomass of the obtained cell cultures of *A. turkestanica*.

The obtained cell cultures were grown in flasks for a long time. One of the strains was deposited in the All-Russian Plant Cell Culture Collection (IPPRAS).

Получение каллусных культур клеток ценных лекарственных растений Ближнего Востока: *Mandragora turcomanica* и *Alhagi persarum*

Суханова Е. С.^{1,2}, Соболева Г. И.²

¹ Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, биологический факультет, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, Москва, 119234, Россия, тел.: +7(495)939-27-76

² Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, ул. Ботаническая, 35, Москва, 127276, Россия, тел.: +7(499)678-53-91, e-mail: mushilda@mail.ru

Мандрагора туркменская (*Mandragora turcomanica*) — многолетнее растение семейства Паслёновые, произрастающее в горах Туркменистана. В 2001 г. мандрагора была помещена в список видов под угрозой исчезновения. В 1999 г. в естественных условиях произрастало не более 500 растений мандрагоры туркменской. Мандрагора — ядовитое растение, традиционно используемое в медицине.

Верблюжья колючка персидская (*Alhagi persarum*) — ценнейшее средство народной медицины Ближнего Востока. Масло на основе этого растения усиливает процессы регенерации и восстановления клеток, препятствует выпадению волос, тонизирует, разглаживает морщины, эффективно для проблемной кожи, при дерматитах. Пудра цветов верблюжьей колючки имеет сильное антимикробное действие.

Образцы растений для введения в культуру клеток были привезены из Туркменистана.

Для получения каллусной культуры клеток *Mandragora turcomanica* использовали семена и корень 8-летнего растения. После стерилизации семена и экспланты из корня размером от 5×5 мм до 10×10 мм помещали на агаризованную безгормональную среду. Использовали среды с минеральной основой по Мурасиге-Скуга с добавлением сахарозы или глюкозы, а также среду по Гамборгу с сахарозой.

Высаженные на агаризованные среды в стерильные условия семена проросли через 1–2 месяца. Семядольные листья полученных растений были перемещены на гормональные питательные среды для инициации каллусообразования. Часть семян была высажена в грунт, и сформированные настоящие листья молодых растений после стерилизации были также высажены на агаризованные среды для дальнейшего каллусообразования. В результате проведенных работ были получены каллусные культуры мандрагоры туркменской.

Для получения культуры клеток *Alhagi persarum* использовали семена, побеги и листья. И семена, и экспланты из побегов помещали на агаризованную среду в чашки Петри на безгормональные среды с минеральной основой по Мурасиге-Скуга и Гамборгу. Через 4 дня у части проросших семян в стерильных условиях отрезали подсемядольное колено, разрезали его на экспланты и помещали на гормональные среды для инициации каллусообразования. Из остальных проросших семян получали молодые растения, которые впоследствии также использовали для введения в культуру. Для дальнейшего выращивания различных каллусных культур использовали несколько вариантов сред, отличающихся по составу фитогормонов и минеральной основе.

В результате проведенных работ были получены несколько каллусных линий верблюжьей колючки, которые были депонированы во Всероссийскую коллекцию культур клеток высших растений (ИФР РАН).

Obtaining cell cultures of valuable medicinal plants of the Middle East: *Mandragora turcomanica* and *Alhagi persarum*

Sukhanova E. S.^{1,2}, Sobolkova G. I.²

¹ M. V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 1-12 Leninskie Gory, 119234, Moscow, Russian Federation, tel.: +7(495)939-27-76

² K. A. Timiryazev Institute of Plant Physiology Russian Academy of Sciences, 35 Botanicheskaya st., 127276, Moscow, Russian Federation, tel.: +7(499)678-53-91, e-mail: mushilda@mail.ru

.....

Turkmenian mandrake (*Mandragora turcomanica*) is a perennial plants of the Solanaceae family, growing in the mountains of Turkmenistan. In 2001, *M. turcomanica* was placed into the list of species which are under the threat of extinction. In 1999, there were less than 500 *M. turcomanica* in the nature. Mandragora — a poisonous plant, traditionally used in medicine.

Alhagi persarum — one of the camel thorns species — is the most valuable remedy of the Middle East traditional medicine. Oil on basis of this plant enhances the processes of regeneration and cell renewal, prevents hair loss, tones up, smoothes wrinkles, is efficient for problem skin and with dermatitis. The flowers powder has a strong antimicrobial effect.

The plant samples of *Mandragora turcomanica* and *Alhagi persarum* were brought from the mountainous regions of Uzbekistan.

For the *M. turcomanica* callus initiation the seeds and root of the 8-year-old plant were used. After the sterilization, seeds and root explants of 5×5 mm to 10×10 mm size were placed on an agar hormone-free medium. There were used the Murashige and Skoog medium, with sucrose or glucose and Gamborg medium with sucrose. The seeds planted on the agar medium, gave shoots after 1–2 months and the cotyledon leaves of the plants were moved to hormonal nutrient media for the callus initiation. Some of the seeds were planted in the soil, and the formed real leaves of young plants after sterilization were also planted on agar media for further callus formation. As a result of the work, well-growing *M. turcomanica* callus cell cultures were obtained.

In order to obtain the *Alhagi persarum* cell culture, seeds, shoots and leaves were used. Seeds and shoots explants were placed on agar hormone-free media with a mineral base of Murashige and Skoog and Gamborg. After 4 days, some of the young plants were cut under sterile conditions and placed on hormonal media to initiate callus formation. From the other germinated seeds young plants were obtained, and they were subsequently used for the cell culture obtaining. For the further cultivation, several variants of media different in the phytohormones composition and in the mineral base were used.

As a result of the work, several well-growing callus cell lines of *Alhagi persarum* were obtained, which were afterwards deposited in the All-Russian Plant Cell Culture Collection (IPPRAS).

Всероссийская коллекция культур клеток высших растений ИФР РАН (УНУ ВККК ВР)

Суханова Е. С.^{1,2}, Куличенко И. Е.², Соболюкова Г. И.²

¹ Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, биологический факультет, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, Москва, 119234, Россия, тел.: +7(495)939-27-76

² Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, ул. Ботаническая, 35, Москва, 127276, Россия, тел.: +7(499)678-53-91, e-mail: mushilda@mail.ru

В настоящее время культуры клеток растений широко используются в качестве исходного сырья для производства различных продуктов растительного происхождения и для сохранения генофонда и реинтродукции редких и эндемичных видов растений. Клетки растений *in vitro* имеют множество преимуществ в качестве модельных систем в фундаментальных исследованиях в области физиологии и биохимии растений, цитологии, биоинженерии. Все перечисленные выше направления не могут существовать без специализированных коллекций культур клеток.

Лаборатория культуры тканей и морфогенеза ИФР АН СССР была в числе первых лабораторий мира по исследованию культур клеток высших растений. Приоритет идеи использования культур клеток для изучения и получения вторичных метаболитов принадлежит основателю лаборатории, член-корр. РАН Р. Г. Бутенко. Уже в конце 50-х — начале 60-х годов были получены культуры клеток растений, перспективные для использования в медицине. В 1985 г. при Отделе биологии клетки и биотехнологии была создана Всесоюзная (сейчас Всероссийская) коллекция культур клеток высших растений. В течение более, чем тридцатилетней работы коллекции накоплен богатый опыт работ с культурами клеток растений.

Всероссийская коллекция культур клеток высших растений входит в Российскую коллекцию клеточных культур. В настоящее время фонд коллекции представлен более, чем 50 каллусными и суспензионными штаммами 24 видов высших растений. Поддерживаемые в Коллекции штаммы преимущественно являются продуцентами биологически активных веществ, в частности в Коллекции поддерживаются несколько штаммов *Dioscorea deltoidea* (продуценты фураностаноловых гликозидов), штаммы разных видов родов *Panax*, *Polyscias* (продуценты тритерпеновых гликозидов), штаммы разных видов рода *Taxus* (продуценты дитерпеноидов таксанового ряда). Данные об основных направлениях деятельности коллекции и каталог штаммов представлены на WEB-сайте Института физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН — <http://www.ippras.ru/cfc/alccmp/>. В 2014 г. Всероссийская коллекция культур клеток высших растений зарегистрирована как объект УНУ (<http://ckp-rf.ru/usu/308103/>).

За последние 3 года сотрудниками Коллекции были получены каллусные и суспензионные культуры клеток *Ajuga turkestanica*, *Panax vietnamensis*, *Alhagi persarum*, *Mandragora turcomanica*. В процессе получения как каллусных, так и суспензионных культур клеток был оптимизирован состав сред для получения культур, обладающих высокими ростовыми характеристиками. Помимо полученных штаммов в Коллекцию за последнее время депонированы штаммы *Dioscorea deltoidea*, *Taxus wallichiana*, *Trigonella foenum-graecum*, *Vincetoxicum hirundinaria*.

Кроме поддержания и развития Коллекции сотрудниками проводятся и научные исследования — изучение свойств популяций клеток в условиях *in vitro*. Совместно с кафедрой физиологии растений МГУ проводится скрининг содержания вторичных метаболитов в коллекционных штаммах культур клеток растений.

All-Russian Plant Cell Culture Collection of IPPRAS (USU RPCCC)

Sukhanova E. S.^{1,2}, Kulichenko I. E.², Sobolkova G. I.²

¹ M. V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 1-12 Leninskie Gory, 119234, Moscow, Russian Federation, tel.: +7(495)939-27-76

² K. A. Timiryazev Institute of Plant Physiology Russian Academy of Sciences, 35 Botanicheskaya st., 127276, Moscow, Russian Federation, tel.: +7(499)678-53-91, e-mail: mushilda@mail.ru

.....

At present, plant cell cultures are widely used as a raw material for the production of various products of plant origin, as well as for the preservation of the gene pool and the reintroduction of rare and endemic plant species. Plant cells *in vitro* have many advantages as model systems in basic research in the field of plant physiology and biochemistry, cytology, bioengineering. The above directions cannot exist without specialized collections of plant cell cultures.

The laboratory of tissue culture and morphogenesis at the Institute of Plant Physiology of the USSR Academy of Sciences was among the first laboratories in the world to study plant cell cultures. The priority of the idea of plant cell cultures use in order to study and obtain secondary metabolites belongs to the founder of the laboratory, corresponding member of RAS R. G. Butenko. Already in the late 50's — early 60's, were obtained plant cell cultures, which were promising for the medicine: *Panax ginseng*, *Vinca rosea*, *Dichroa febrifuga*, *Rauwolfia serpentina*. In 1985, in the Department of Cell Biology and Biotechnology, the All-Union (now All-Russian) Collection of Plant Cell Cultures was created. During more than thirty-year work of the collection, a rich experience of the work with plant cell cultures has been accumulated. The cycles of studies were conducted where the main characteristics of cell cultures were studied.

The All-Russian Plant Cell Culture Collection is part of the Russian Collection of Cell Cultures. Currently, the fund of the Collection is represented by more than 50 callus and suspension strains of 23 species of higher plants. Mainly the strains maintained in the Collection are producers of biologically active substances, in particular, several strains of *Dioscorea deltoidea* (producers of furostanolic glycosides), strains of various species of the genus *Panax* and *Polyscias* (producers of triterpenoid glycosides), strains of various species of the genus *Taxus* (taxane diterpenoids) are maintained in the Collection. The information about the main activities of the Collection and the catalog of strains are presented on the WEB-site of the K. A. Timiryazev Institute of Plant Physiology — <http://www.ippras.ru/cfc/alccmp/> and on the site <http://ckp-rf.ru/usu/308103/>.

During the last 3 years, the staff of the Collection obtained callus and suspension cell cultures of *Ajuga turkestanica*, *Panax vietnamensis*, *Alhagi persarum*, *Mandragora turcomanica*. Within the plant cell cultures obtaining, the composition of the media was optimized in order to obtain cell cultures with high growth characteristics. Besides the obtained strains, *Dioscorea deltoidea*, *Taxus wallichiana*, *Trigonella foenum-graecum*, *Vincetoxicum hirundinaria* cell cultures were deposited into the Collection.

In addition to the maintenance and development of the Plant Cell Cultures Collection, the research teams of Collection group and the Department of Cell Biology of the IPPRAS conduct researches on the properties of cell populations *in vitro*. In the collaboration with the plant physiology department of the Moscow State University a screening of secondary metabolites composition in the collection plant cell culture strains is being processed.

Биотехнология получения растительного сырья *Potentilla chrysantha* Trev., содержащего биологически активные вещества

Теберекова Т. И., Тихомирова Л. И.

Алтайский государственный университет, пр-т Ленина, 61, Барнаул, 656049, Россия,
факс: +7(385-2)667-626, тел.: +7(385-2)291-291, e-mail: teberkova2014@mail.ru

.....

P. chrysantha Trev. (лапчатка золотистоцветковая) — многолетнее растение 15–40 см высотой. Стебли тонкие, приподнимающиеся, малооблиственные, дихотомически-ветвистые, одеты коротким пушком и более длинными волосками. Корневые и нижние стеблевые листья длинночерешчатые, пятерные, средние также пятерные, верхние тройчатые, короткочерешчатые или почти сидячие, отстоящеволосистые, зеленые. Цветки многочисленные, в соцветии, крупные или довольно мелкие. Лепестки золотисто-желтые. Цветет в мае — июле.

Отвар надземной части лапчатки золотистоцветковой на Алтае применяют при лихорадке. Растение проявляет антибактериальную, антифибринолитическую и тромبوпластическую активность. Надземную часть используют как суррогат чая. *P. chrysantha* пригодна для дубления кож.

Целью данного исследования являлось получение биотехнологического сырья *P. chrysantha* Trev. и анализ его на качественное и количественное содержание биологически активных соединений.

Растения-регенеранты получали в отделе биотехнологии Южно-Сибирского ботанического сада Алтайского государственного университета. В качестве эксплантов использовали семена из коллекции ботанического сада. Для размножения побегов готовили питательные среды на минеральной основе Мурасиге-Скуга, содержащие 1 мкМ БАП (6-бензиламинопурина), 0,5 мкМ ИМК (индолил-3-масляная кислота) и 0,05 мкМ ГК (гибберелловая кислота). Укореняли на средах с 1,0 мкМ ИМК. Адаптацию и выращивание сырья проводили в гидропонной установке типа Минивит.

Спиртовые и водные извлечения из сырья *P. chrysantha* содержали алкалоиды, антраценовые производные, гликозиды, дубильные вещества, ксантоны, фенольные соединения и сумму флавоноидов. Количественное определение флавоноидов показало следующие значения 0,74 %.

P. chrysantha — один из перспективных видов, фитомассу которого можно рассматривать в качестве нового сырья.

Biotechnology of receiving vegetable *Potentilla chrysantha* Trev. raw materials, containing biologically active agents

Teberkova T. I., Tikhomirova L. I.

Altai State University, 61 Lenin ave., 656049, Barnaul, Russian Federation,
fax: +7(385-2)667-626, tel.: +7(385-2)291-291, e-mail: teberkova2014@mail.ru

.....

P. chrysantha Trev. (a silverweed zolotistotsvetkovy) — a perennial plant 15–40 cm high. Stalks are thin, rising, malooblistvenny, dichotomizing and branchy, are dressed by a short down and longer hairs. Root and lower stem leaves dlinnochereshchaty, quintuple, average also quintuple, top ternate, korotkochereshchaty or almost sedentary, otstoyashchevolosisty, green. Flowers numerous, in an inflorescence, large or quite small. Golden-yellow petals. Blossoms in May-July.

Broth of an elevated part of a silverweed zolotistotsvetkovy in Altai is applied at fever. The plant shows antibacterial, anti-fibrinolytic and tromboplastichesky activity. Uses an elevated part as a tea substitute. *P. chrysantha* is suitable for tanning of skin.

Objective of this research was receiving biotechnological *P. chrysantha* Trev. raw materials. and its analysis on the qualitative and quantitative content of biologically active connections.

Rasteniya-regeneranty received in Department of biotechnology of the Southern Siberian botanical garden, Altai state university. As eksplant used seeds from a collection of a botanical garden. For reproduction of escapes prepared the nutrient mediums on a mineral basis of Murasige-Skuga containing 1 micron of BAP (6-benzilaminopurin), 0.5 microns of IMK (indolyl-3-oleic acid) and 0.05 mkm GA (giberelovy acid). Implanted on Wednesdays from 1.0 microns of IMK. Adaptation and cultivation of raw materials were carried out in hydroponic installation like Minivit.

Spirit and water extraction from *P. chrysantha* raw materials contained alkaloids, anthracene derivatives, glycosides, tannins, ksantona, phenolic connections and the sum of flavonoids. Quantitative definition of flavonoids showed the following values of 0.74 %.

P. chrysantha — one of perspective types which phytomass can be considered as new raw materials.

Токсикологическое исследование суспензионной культуры клеток *Panax japonicus*

Титова М. В.¹, Фоменков А. А.¹, Суханова Е. С.¹, Шумило Н. А.¹, Котенкова Е. А.²

¹ Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, ул. Ботаническая, 35, Москва, 127276, Россия, тел.: +7(499)678-53-91.

² Всероссийский научно-исследовательский институт мясной промышленности им. В. М. Горбатова, ул. Талалихина, 26, Москва, 109316, тел.: +7(495)676-92-11, e-mail: Artem.Fomenkov@gmail.com

Традиционно лекарственные растения служат источником разнообразных биологически активных соединений (БАВ). Однако массовая переработка свежесобранного сырья трудоемка ввиду того, что многие растения зацветают и созревают в одно и то же время, причем время сбора их бывает весьма коротким. Ввиду этого весьма перспективным направлением для решения задач расширения источников получения БАВ растительного происхождения, повышения стабильности и качества сырьевой базы является биотехнологический метод выращивания клеток и тканей лекарственных растений на искусственных питательных средах.

Женьшень и его БАВ являются наиболее распространенными средствами в китайской медицине и японской фитотерапии в связи с выраженными иммуномодулирующими, тонизирующими, адаптогенными свойствами, которые обусловлены гинзенозидами (панаксозидами), представителями фармакологически активного класса метаболитов — тритерпеновых гликозидов. В связи с перспективностью использования женьшеня в качестве компонента для создания функциональных продуктов питания очень важно изучение *in vivo* токсичности клеточной биомассы *P. japonicus*.

Исследования острой токсичности проведены на клинически здоровых лабораторных крысах spf-категории стока Wistar, возрастом 10 недель после пятидневного периода адаптации. В эксперименте изучены предельные дозы исследуемого образца — 2000 мг/кг и 5000 мг/кг. Каждую дозу вводили внутривентрикулярно дробно (двукратно) при помощи специального зонда. Клеточная биомасса *P. japonicus* в предельно допустимой дозе (5000 мг/кг) не вызывала каких-либо токсических эффектов — отклонений в состоянии животных не наблюдалось. По результатам аутопсии и макроскопического исследования внутренних органов, различий между животными, получившими разные дозы образца клеток *P. japonicus*, не установлено. Для дозы 5000 мг/кг по сравнению с интактными крысами при оценке лейкоцитов и их субпопуляций, отмечалось недостоверное снижение относительного содержания гранулоцитов до 40 % при увеличении процентного содержания лимфоцитов до 10 % ($P < 0,1$). Интересно отметить, что у животных, получавших дозу 5000 мг/кг, концентрация эритроцитов и гемоглобина, уровень гематокрита, средний объем эритроцита, среднее содержание гемоглобина в эритроците и распределение по размеру достоверно не отличались от показателей интактных крыс. Анализ биохимических показателей выявил, что *P. japonicus*, возможно, способствует процессам усвоения белка, приводя к интенсификации белкового обмена (снижение общего белка, альбумина, креатинина и мочевины); изменения со стороны ферментов печени (снижение активности аламинотрансфераз, щелочной фосфатазы и гамма-глутамилтранспептидазы на фоне увеличения активности аспартатаминотрансферазы), могут свидетельствовать об интенсификации работы сердечной мышцы.

При пероральном введении предельных доз клеточной биомассы (2000 мг/кг и 5000 мг/кг) гибели и признаков токсичности у лабораторных животных не наблюдалось. Согласно ГОСТ 32644 исследуемая клеточная биомасса *P. japonicus* относится к 5 классу; по ГОСТ 12.1.007 — к IV классу опасности (веществам малоопасным).

Toxicological study of a *Panax japonicus* suspension cell culture

Titova M. V.¹, Fomenkov A. A.¹, Sukhanova E. S.¹, Shumilo N. A.¹,
Kotenkova E. A.²

¹ K. A. Timiryazev Institute of Plant Physiology Russian Academy of Sciences, 35 Botanicheskaya st., 127276, Moscow, Russian Federation, tel.: +7(499)678-53-91

² V. M. Gorbatov All-Russian Research Institute of Meat Industry, 26 Talalikhina st., 109316, Moscow, Russian Federation, tel.: +7(495)676-92-11, e-mail: Artem.Fomenkov@gmail.com

.....

Traditionally, medicinal plants serve as a source of various biologically active compounds (BAS). However, the mass processing of freshly harvested raw materials is laborious because of the fact that many plants bloom and ripen at the same time, and the collection period is very short. In view of this, a biotechnological method of medicinal plant cells and tissues cultivation on artificial nutrient media is a very promising way to solve the problems of expanding the BAS sources of plant origin, increasing the raw material base stability and quality.

Ginseng and its BAS are the most common remedies in Chinese medicine and Japanese phytotherapy due to its remarkable immunomodulatory, tonic, adaptogenic properties, which are caused by ginsenosides (panaxosides), representatives of the pharmacologically active metabolite class — triterpene glycosides. In connection with the prospects of ginseng use as a component for functional foods creation, it is very important to study the *in vivo* toxicity of the *P. japonicus* cell culture biomass.

Acute toxicity studies were performed on clinically healthy laboratory Wistar rats of the spf-category, 10 weeks old after a five-day adaptation period. In the experiment, the limit doses of the test sample were studied — 2000 mg/kg and 5000 mg/kg. Each dose was injected intraperitoneally partly (twice) with a special probe. *P. japonicus* cell culture biomass in the maximum permissible dose (5000 mg/kg) did not cause any toxic effects — no abnormalities in the animal state were observed. According to the results of autopsy and macroscopic examination of internal organs, no differences between animals who received different doses of the *P. japonicus* cells sample were determined. For the dose of 5000 mg/kg in comparison with intact rats, in assessing leukocytes and their subpopulations, an unreliable decrease of the relative content of granulocytes till 40 % was noted, within an increase of the lymphocytes percentage up to 10 % ($P < 0.1$). It is interesting to note that in the animals who received the dose of 5000 mg/kg, the erythrocytes and hemoglobin concentration, hematocrit level, the average erythrocyte volume, the mean hemoglobin content in erythrocyte, and the size distribution did not differ significantly from the indices of intact rats. An analysis of biochemical indices revealed that *P. japonicus*, possibly, promotes protein assimilation processes, leading to an intensification of protein metabolism (reduction of total protein, albumin, creatinine and urea). The changes of the liver enzymes (decreased alanine aminotransferase activity, the presence of alkaline phosphatase and gamma-glutamyltranspeptidase within the increased activity of aspartate aminotransferase) may indicate an intensification of cardiac muscle work.

No mortality and signs of toxicity in laboratory animals were observed with the oral administration of the cell biomass limit doses (2000 mg/kg and 5000 mg/kg). According to the GOST (SUST) 32644, the studied cellular biomass of *P. japonicus* belongs to the 5th class; according to the GOST (SUST) 12.1.007 — to the 4th class of danger (substances of low danger).

Некоторые особенности морфогенеза *Iris ensata* Thunb. в культуре *in vitro*

Тихомирова Л. И.

Алтайский государственный университет, пр-т Ленина, 61, Барнаул, 656049, Россия,
факс: +7(385-2)667-626, тел.: +7(385-2)291-291, e-mail: L-tichomirova@yandex.ru

.....

Принципиально важное свойство морфогенеза — универсальность его путей как в условиях *in vivo*, так и в условиях *in vitro*. Изучение морфогенеза растений в культуре *in vitro* способствует решению фундаментальных проблем биологии развития (Батыгина, 1983, 1987, 1993).

Iris ensata Thunb. благодаря яркой окраске цветков культивируется в качестве декоративного растения. Научные исследования химического состава корневища и надземных частей, а также изучение фармакологической активности вторичных метаболитов доказывают актуальность использования данного вида в традиционной и современной фитотерапии (Фруентов 1987; Блиновой К. Ф. и др., 1974, 1977; Денисова и др. 1980; Долганова 2008, 2011). В культуре ткани *Iris ensata* мало изучен.

Целью данной работы является установление зависимости активности побегообразования и анатомического строения проводящих элементов у *Iris ensata* Thunb. в культуре *in vitro* от количественного содержания цитокинина в питательной среде.

В результате исследований представлен протокол культивирования *Iris ensata in vitro*, проведен гистологический анализ этапов морфогенеза. Разработана методика эмбриокультуры для данного вида ириса. Полученные стерильные побеги размножали на питательных средах MS с 6-BA в пределах 5,0–20,0 μM в сочетании с ауксинами NAA(1 μM)+IBA(0,1 μM). Укоренение микропобегов *Iris ensata* проводили на среде, содержащей NAA(3 μM).

Формированию очагов меристематической активности предшествовала изоляция инициальной клетки посредством утолщения клеточной стенки и нескольких последовательных делений, что приводило к образованию полиады — группы клеток под общей оболочкой. В результате лизиса этих оболочек одной или нескольких рядом расположенных полиад и неупорядочных делений, формировался массив мелких клеток меристематического характера — меристемоид. Адвентивные почки у ириса в культуре ткани могут закладываться в субэпидермальном слое материнского побега, в первичной коре, а также в области перицикла. Соответственно адвентивные почки могут быть экзогенными и эндогенными по своему происхождению. Адвентивные корни имели эндогенное происхождение, развивались из растительной ткани, минуя каллусную культуру.

Some features of morphogenesis of *Iris ensata* Thunb. in *in vitro* culture

Tikhomirova L. I.

Altai State University, 61 Lenin ave., 656049, Barnaul, Russian Federation,
fax: +7(385-2)667-626, tel.: +7(385-2)291-291, e-mail: l-tichomirova@yandex.ru

.....

The versatility of morphogenesis under both *in vivo* and *in vitro* conditions is of critical importance. The study of plant morphogenesis in *in vitro* culture contributes to the solution of fundamental problems in developmental biology (Batygina 1983, 1987, 1993).

Due to the bright color of flowers, *Iris ensata* Thunb. is cultivated as an ornamental plant. Scientific studies of chemical composition of roots and aerial parts, as well as investigation of pharmacological activity of secondary metabolites, report the importance of *I. ensata* in traditional and modern phytotherapy (Fruentov 1987; Blinova et al. 1974, 1977; Denisov et al. 1980). *Iris ensata* in tissue culture is still poorly understood.

This research aims to study the morphogenesis stages in *Iris ensata* in *in vitro* culture and to perform the histological analysis of these stages.

This paper presents the protocol for *Iris ensata* *in vitro* culturing and the results of the histological analysis of the morphogenesis stages. The embryo culture technique for *Iris ensata* has been developed. The resulting sterile shoots were propagated on MS media supplemented with 6-BA in the range of 5.0–20.0 μM in combination with auxins NAA(1 μM)+IBA(0.1 μM). The *Iris ensata* microshoots were rooted on culture medium containing NAA(3 μM).

The formation of zones of meristematic activity was preceded by the isolation of the initial cell through thickening of the cell wall and several successive divisions, which resulted in the formation of a polyade — a group of cells with a common wall. Lysis of these walls of one or several adjacent polyades and random divisions caused the formation of a group of small meristematic cells called meristemoid. Adventitious buds in iris tissue culture can be formed in the subepidermal layer of the maternal shoot, in the primary cortex, and in the pericycle. Hence, adventitious buds can be of exogenous and endogenous origin. Adventitious roots were of endogenous origin and developed directly from plant tissue bypassing the stage of callus culture.

Эффективность культивирования клеток и тканей растений *in vitro* в присутствии бактерий и их метаболитов

Ткаченко О. В.¹, Евсеева Н. В.², Бурьгин Г. Л.^{1,2}, Каргаполова К. Ю.¹, Лобачев Ю. В.¹, Матора Л. Ю.², Щеголев С. Ю.²

¹ Саратовский государственный аграрный университет им. Н. И. Вавилова, Театральная пл., 1, Саратов, 410012, Россия, факс: +7(8452)26-27-83, тел.: +7(8452)23-46-97, e-mail: oktkachenko@yandex.ru

² Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, пр-т Энтузиастов, 13, Саратов, 410049, Россия, факс: +7(8452)97-04-44, тел.: +7(8452)97-04-74, e-mail: evseeva@ibppm.ru

Повышение эффективности культивирования клеток и тканей растений *in vitro* является важной задачей для развития агробιοтехнологии. Традиционные подходы решения данной проблемы основаны на поиске химических, физических или генетических параметров культивирования. Гораздо хуже изучена возможность применения биологических факторов, таких как ассоциативные бактерии и их метаболиты. Было показано, что эффект стимулирования роста растений *in vivo* может достигаться воздействием как целых ризосферных ростстимулирующих бактерий (PGPR), так и компонентов их клеток. Одними из активных компонентов бактерий, участвующих в процессах взаимодействия с растениями, являются липополисахарид (ЛПС) наружной мембраны и флагеллины полярных жгутиков азотфиксирующих бактерий рода *Azospirillum*.

Целью данных исследований являлось изучение влияния ассоциативных ростстимулирующих бактерий рода *Azospirillum* или компонентов их клеток (липополисахаридов и флагеллинов) на морфогенез однодольных (пшеница) и двудольных (картофель) растений, находящихся на разных стадиях клеточной организации (клетки, ткани, и органы растений) в культуре *in vitro*.

Исследования проведены на двух типах клеточных культур. Во-первых, в культуре соматических каллусов, полученных из незрелых зародышей сестринских почти изогенных линий пшеницы (генофон сорта 'Саратовская 29'), альтернативных по гену короткостебельности *Rht-B1 c* и отличающиеся по способности к морфогенезу в культуре тканей *in vitro*. Во-вторых, на мериклонах картофеля сорта 'Кондор'. Растительные экспланты инокулировали суспензией бактерий рода *Azospirillum* в концентрациях 10⁶ и 10⁷ кл/мл. Либо в состав питательной среды вводили ЛПС (1, 10, 100 мкг/мл) или флагеллин (0,1, 1, 10 мкг/мл) этих же бактерий.

Было показано, что инокуляция эксплантов пшеницы живыми бактериями приводила к угнетению пролиферации соматических клеток. В то же время использование бактерий *Azospirillum brasilense* Sp245, убитых путем нагревания, и ЛПС бактерий, особенно в концентрации 10 мкг/мл, стимулировало морфогенетические процессы, повышая частоту формирования морфогенного каллуса и регенерацию растений. Кроме того, было показано специфическое действие ЛПС азоспирилл на формирование ответной реакции культуры клеток пшеницы.

В отличие от культуры соматических каллусов пшеницы бактериализация микрорастений картофеля в культуре *in vitro* приводила к достоверному стимулированию роста побегов и корней. Наибольший положительный эффект на рост растений отмечен для штамма *Azospirillum brasilense* Sp245. Экспериментально подобраны оптимальные условия инокуляции. ЛПС бактерий в концентрации 10 мкг/мл также стимулировал рост корней микрорастений. При добавлении флагеллина полярного жгутика азоспирилл к микрорастениям пшеницы и картофеля были выявлены ответные реакции растений, проявляющиеся в незначительном ингибировании роста, возрастании активности антиоксидантных систем и компенсаторном росте к концу эксперимента.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ 16-04-01444.

The efficiency of plant cells and tissues *in vitro* culture in the presence of bacterias and their metabolites

Tkachenko O. V.¹, Evseeva N. V.², Burygin G. L.^{1,2}, Kargapolova K. Yu.¹, Lobachev Yu. V.¹, Matora L. Yu.², Shchyogolev S. Yu.²

¹ Vavilov Saratov State Agrarian University, 1 Theatre square, 410012, Saratov, Russian Federation, fax: +7(8452)26-27-83, tel.: +7(8452)23-46-97, e-mail: oktkachenko@yandex.ru

² Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms Russian Academy of Sciences, 13 Entusiastov ave., 410049, Saratov, Russian Federation, fax: +7(8452)97-04-44, tel.: +7(8452)97-04-74, e-mail: evseeva@ibppm.ru

.....

Increasing of plant cells and tissues efficiency of *in vitro* culture is an important task for the development of agrobiotechnology. Traditional approaches of solving this problem are based on finding chemical, physical or genetic parameters of cultivation. The possibility of using biological factors, such as associative bacteria and their metabolites was studied much less. Nevertheless, it was shown that the effect of stimulating plant growth *in vivo* could be achieved by exposure to both whole plant growth promotion rhizobacteria (PGPR) and their cell components. One of the active components of bacteria involved in the processes of interaction with plants is lipopolysaccharide (LPS) of the outer membrane and flagellins of polar flagellas of nitrogen-fixing bacteria *Azospirillum*.

The purpose of these studies was to investigate the influence of associative plant growth promotion rhizobacteria *Azospirillum* or cell components (lipopolysaccharides and flagellins) on morphogenesis monocotyledon (wheat) and dicotyledons (potato) plants at different stages of cellular organization (cell, tissue, and part of plant) in *in vitro* culture.

Studies were conducted with two types of cell culture. Firstly, the somatic callus culture, derived from immature embryos of near-isogenic lines of wheat (cv. 'Saratovskaya 29') that alternative to the RhtB1 c gene and differing in ability to *in vitro* tissue culture morphogenesis. Secondly, on the potato microclones of cv. 'Condor'. Plant explants were inoculated *Azospirillum* bacterial suspension in concentrations of 10⁶ and 10⁷ cells/ml. Either lipopolysaccharide (LPS) of cell walls (1, 10, 100 µg/ml) or flagellin of polar flagellas (0.1, 1, 10 µg/ml) of the same bacteria was introduced into the nutrient medium.

Inoculation of wheat explants with live bacteria lead to somatic cell proliferation. At the same time, the bacteria *Azospirillum brasilense* Sp245 by heating were killed, and LPS of bacteria, especially at a concentration of 10 µg/ml, stimulated the morphogenetic processes increasing the frequency of morphogenic callus formation and plants regeneration. In addition, the specific effect of *Azospirillum* LPS on the wheat cell culture reaction was shown.

In contrast to somatic wheat callus culture the bacterization of potato microplants in *in vitro* culture led to significant stimulation of shoots and roots growth. The greatest positive effect on plant growth observed for *Azospirillum brasilense* Sp245 strain. Optimal inoculation conditions were experimentally selected. LPS of bacteria at a concentration of 10 µg/ml also stimulated the growth of microplants roots. When the flagellin of the *azospirillum* polar flagellas was added to the microplants of wheat and potato, plant responses were revealed, which manifested itself in insignificant growth inhibition, increased activity of antioxidant systems, but compensatory growth by the end of the experiment.

The work was carried out with the partial support of the RFBR grant 16-04-01444.

Получение и характеристика культур клеток эндемичного вида наперстянки *Digitalis ciliata* Trautv. — продуцента сердечных гликозидов

**Томилова С. В.¹, Глаголева Е. С.¹, Лабунская Е. А.¹, Тухтаманова А. С.¹,
Галишев Б. А.², Кочкин Д. В.¹, Носов А. М.¹**

¹Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, биологический факультет, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, Москва, 119234, Россия, факс: +7(495)939-43-09, тел.: +7(495)939-14-06

²Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина, ул. Куйбышева, 48, Екатеринбург, 620026, Россия, факс: +7(343)261-52-18, тел.: +7(343)261-66-85, e-mail: lanatomilova@yandex.ru

Сердечные гликозиды являются одной из важнейших групп изопреноидов и используются для лечения больных с сердечно-сосудистой недостаточностью свыше 200 лет. В последнее время эти соединения стали активно рассматривать в качестве перспективных противоопухолевых агентов. Наиболее известным продуцентом сердечных гликозидов считается *Digitalis L.* — род травянистых растений, принадлежащий к семейству *Plantaginaceae* и включающий в себя 36 видов. *Digitalis ciliata* Trautv. является эндемичным растением Кавказа и содержит около 50 сердечных гликозидов. Качественное и количественное содержание этих соединений в интактных растениях — непостоянная величина, которая зависит от условий произрастания и срока вегетации растения. В связи с этим, новым источником сердечных гликозидов может выступать культура клеток *D. ciliata*, которая дает возможность получать экологически чистое растительное сырье с контролируемым составом и содержанием целевых веществ независимо от климатических и погодных условий. Согласно анализу доступных данных литературы, культуры клеток *D. ciliata* ранее получены не были. Исходя из вышесказанного, целью данной работы стало получение и характеристика каллусных и суспензионных культур клеток эндемичного вида наперстянки *Digitalis ciliata* Trautv.

Для получения каллусных культур клеток использовали асептические проростки, выращенные из семян *D. ciliata*, взятые из Ботанического сада биологического факультета МГУ имени М. В. Ломоносова. Семена стерилизовали 50 % раствором гипохлорита натрия («Белизна», Россия). Каллусную культуру клеток индуцировали на чашках Петри с агаризованной средой Мурасиге-Скуга (MS), дополненной α -нафтилуксусной кислотой (НУК) и кинетином (Merck, Германия), при 16-часовом световом дне и $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Последующее субкультивирование проводили в темноте при $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Суспензионную культуру клеток *D. ciliata* получали из 4-недельной каллусной культуры клеток в жидкой питательной среде MS, дополненной НУК и кинетином. Выращивание проводили на инкубационном шейкере CERTOMAT IS (Sartorius, Германия) в темноте при скорости вращения — 100 об/мин, температура в камере $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Предварительный фитохимический анализ экстрактов каллусной культуры клеток *D. ciliata* проводили методом HPLC-MS на хроматографе Waters Aquity UPLC (Waters, США).

В ходе выполнения работы было установлено, что на среде MS с НУК и кинетином у *D. ciliata* формировались в основном фотосинтезирующие каллусы с рыхлой структурой и, в некоторых случаях, наблюдался ризогенез. Кроме того, показано, что листовые и гипокотильные экспланты в равной степени обладали небольшой способностью к ризогенезу и активно формировали фотосинтезирующие каллусы. Полученная суспензионная культура клеток имела желто-зеленый цвет, и содержала агрегаты меристемоподобных клеток, а также одиночные паренхимоподобные и удлиненные клетки.

Фитохимический скрининг экстрактов из сухой биомассы каллусной культуры клеток *D. ciliata* методом HPLC-MS не выявил наличия сердечных гликозидов, однако, были обнаружены гликозиды фенилэтаноидов и стероидные гликозиды фураностанолового ряда.

Obtaining and investigation of the cell cultures of the endemic plant of *Digitalis ciliata* Trautv., a producer of cardiac glycosides

Tomilova S. V.¹, Glagoleva E. S.¹, Labunskaya E. A.¹, Tuhtamanova A. S.¹, Galishev B. A.², Kochkin D. V.¹, Nosov A. M.¹

¹ M. V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 1-12 Leninskie Gory, 119234, Moscow, Russian Federation, fax: +7(495)939-43-09, tel.: +7(495)939-14-06

² Ural Federal University named after the first President of Russia B. N. Yeltsin, 48 Kuybysheva st., 620026, Ekaterinburg, Russian Federation, fax: +7(343)261-52-18, tel.: +7(343)261-66-85, e-mail: lanatomilova@yandex.ru

Cardiac glycosides are one of the most important groups of isoprenoids and were used to treat cardiovascular disorders over 200 years. At the present time these compounds have been considered as new promising anti-cancer agents. The most famous producer of cardiac glycosides is *Digitalis* L. — a genus of herbaceous plants belonging to the family of *Plantaginaceae* and including 36 species. *Digitalis ciliata* Trautv. is an endemic plant native to the Caucasus area and contains about 50 cardiac glycosides. The qualitative and quantitative content of these compounds in intact plants is an unstable quantity that depends on the conditions of growth and the vegetative period of the plant. In connection with a new source of cardiac glycosides can be the cell culture of *D. ciliata*, which makes it potential to obtain ecologically pure renewable vegetal materials with a controlled composition and content of chemical compounds independently of climatic and weather conditions. According to the analysis of available literature sources, the cell cultures of *D. ciliata* were not previously obtained. The purpose of this work was to obtain and investigate the callus and suspension cell cultures of the endemic plant of *Digitalis ciliata* Trautv.

To obtain the callus cell cultures were used aseptic seedlings which were grown from seeds of *D. ciliata* taken from the Botanical Garden of the Biological faculty of The Lomonosov Moscow State University. The seeds sterilized with 50% solution of sodium hypochlorite ("Belizna", Russia). The callus cell culture induced on Petri dishes with an agarized Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with α -naphthaleneacetic acid (NAA) and kinetin (Merck, Germany) at 16-hour light and $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Subsequent subcultivation was carried out at dark and $25 \pm 1^\circ\text{C}$. The suspension cell culture of *D. ciliata* was obtained from the 4-week callus cell culture in a liquid medium MS supplemented with NAA and kinetin. Cultivation was carried out on the incubation shaker CERTOMAT IS (Sartorius, Germany) in the dark at a rotation speed of 100 rpm and $25 \pm 1^\circ\text{C}$. A preliminary phytochemical analysis of extracts of the callus cell culture of *D. ciliata* was performed by HPLC-MS on a Waters Aquity UPLC chromatograph (Waters, USA).

As a result of the work, it was found that on MS medium with NAA and kinetin in *D. ciliata* mainly formed photosynthetic calli and, in some cases, was observed rhizogenesis. Furthermore, it was shown that leaf and hypocotyl explants equally possessed a low ability to rhizogenesis and actively formed photosynthetic calli. The suspension cell culture of *D. ciliata* was yellow-green color, and contained aggregates of meristem-like cells, as well as single parenchyma-like and elongated cells.

Phytochemical screening of extracts from the dry biomass of the callus cell culture of *D. ciliata* by HPLC-MS did not reveal the presence of cardiac glycosides, however, there were found phenylethanoid glycosides and steroid glycosides of furostanol type.

Соматический полиэмбриогенез клеточных линий лиственницы сибирской (*Larix sibirica*) *in vitro* (мультипликация, гормональная регуляция и генотипирование)

**Третьякова И. Н.¹, Пак М. Э.¹, Казаченко А. С.¹, Ахиярова Г. Р.²,
Кудоярова Г. Р.²**

¹ Лаборатория лесной генетики и селекции, Институт леса им. В. Н. Сукачева Сибирского отделения РАН — обособленное подразделение ФИЦ КНЦ СО РАН, Академгородок 50, стр. 28, Красноярск, 660036, Россия, факс: +7(391)243-36-86, тел.: +7(391)249-26-25

² Лаборатория физиологии растений, Уфимский Институт биологии РАН, пр-т Октября, 69, Уфа, 450054, факс: +7(347)235-62-47, тел.: +7(347)235-56-55, e-mail: culture@ksc.krasn.ru

Для запуска процесса соматического эмбриогенеза у лиственницы сибирской (*Larix sibirica*) использовали изолированные мегагаметофиты и незрелые половые зародыши на стадии инициации семядолей, полученные от свободного и контролируемого опыления. После стерилизации экспланты в стерильных условиях помещали на среду АИ (RU 2456344 С2). В качестве регуляторов роста применяли 2.4-Д (2 мг/л) и 6-БАП (1 мг/л). В среду добавляли агар в концентрации 7 г/л; рН питательной среды приводили к 5.8 до автоклавирования.

Переход вегетативных клеток на путь соматического эмбриогенеза сопровождался их удлинением, поляризацией и накоплением ИУК у одного из вытянутых концов клетки. Далее шло асинхронное деление и образование глобулы соматического зародыша, на базальной стороне которой формировались эмбриональные трубки, слагающие суспензор. Образовывалась эмбрионально-суспензорная масса (ЭСМ). В результате примененной технологии получено 42 эмбриогенные клеточные линии (Кл), пролиферирующие на среде АИ, от трех деревьев доноров. Возраст эмбриогенных культур составлял от двух до девяти лет. Число глобулярных соматических зародышей у разных Кл линий колебалось от 2000 (2040±189.2 у Клб) до 11 000 (11103±259.6 Кл10) на 1 г ЭСМ. Эмбриогенный потенциал длительно пролиферирующих клеточных линий *L. sibirica* оставался на высоком уровне, как и в молодых культурах.

По данным иммуногистохимического окрашивания клетки глобул содержали ИУК, зеатин и АБК, которые варьировали у разных линий. Гормоны в эмбриональных трубках суспензора отсутствовали. По данным микросателлитного анализа пролиферирующие клеточные линии лиственницы сибирской характеризовались слабой аллельной изменчивостью, четырехлетние клонированные растения были генетически стабильными. Глобулы соматических зародышей сосредотачивались на поверхности культур и формировали агрегаты, а их суспензоры тесно примыкали друг к другу. Формировались полиэмбриональные комплексы. Мультипликация активно происходила путем кливажа зародышей, почкования и расщепления клеток суспензора. Ингибирование полиэмбриогенеза происходило под влиянием АБК. После переноса пролиферирующей ЭСМ на питательную среду АИ, дополненную АБК, кливаж, почкование и расщепление эмбриональных трубок продолжалось. После 1–2 недель культивирования на данной среде, каждый зародыш становился независимым. Способность зародышей созревать у разных Кл варьировала от 0,6% до 33% (относительно первоначального числа глобулярных соматических зародышей). Прорастание соматических зародышей происходило на безгормональной среде ½АИ в течение 28 дней. Регенеранты без утолщений и каллуса в области гипокотилия и корешка для адаптации пересаживали в стерильную почву в условиях ростовой камеры, затем в теплицу и далее в почву лесопитомника, где клонированные растения активно растут в течение пяти лет. Генотипирование клонов по микросателлитным локусам показало полное соответствие их Клб, от которой были взяты регенеранты.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научных проектов № 15-04-01427 и № 18-54-00010 Бел_а.

Somatic polyembryogenesis of cell lines of Siberian larch (*Larix sibirica*) *in vitro* (multiplication, hormonal regulation and genotyping)

**Tretyakova I. N.¹, Pak M. E.¹, Kazachenko A. S.¹, Akhiyarova G. R.²,
Kudoyarova G. R.²**

¹ *Laboratory of Forest Genetics and Breeding, Sukachev Institute of Forest of the Siberian Branch of the RAS — Division of Federal Research Center "Krasnoyarsk Scientific Center of the Siberian Branch of the RAS", 50/28 Akademgorodok, 660036, Krasnoyarsk, Russian Federation, fax: +7(391)243-36-86, tel.: +7(391)249-26-25*

² *Laboratory of Plant Physiology, Institute of Biology of Ufa Federal Research Centre of Russian Academy of Sciences, 69 Prospect Oktyabrya, 450054, Ufa, Russian Federation, fax: +7(347)235-62-47, tel.: +7(347)235-56-55, e-mail: culture@ksc.krasn.ru*

.....

In Siberian larch (*Larix sibirica*) isolated megagametophytes and zygotic embryos at the stages of cotyledon initiation were used as the explants for induction of somatic embryogenesis. After sterilization, under sterile conditions explants were placed in AI media (RU 2456344 C2). 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) (2 mg l⁻¹) and benzyladenine (BA) (1 mg l⁻¹) were used as growth regulators. Agar was added to the culture medium (7 g l⁻¹); medium pH was adjusted to 5.8 before autoclaving. After autoclaving, L-glutamine and ascorbic acid was added to the chilled nutrient medium.

The change in the path of development of vegetative cells on the path of somatic embryogenesis was accompanied by their elongation, polarization and accumulation of IAA at one of the elongated ends of the cell. Then there was the asynchronous division and formation of the globule of the somatic embryo, on the basal side of which the embryonic tubes were formed. The embryonal-suspensor mass (ESM) was formed. As a result of the applied technology 42 proliferating cell lines (CL) from three donor trees were obtained on proliferation AI media. The age of embryogenic cultures ranged from one to nine years. The number of globular somatic embryos in different CL ranged from 2,000 (2040±189.2 in CL6) to 11,000 (11103±259.6 in CL10) in 1 g of fresh ESM. Embryogenic potential in long-proliferating CLs of *Larix sibirica* remained at the same level as in the young cultures. According to immunohistochemical staining of the cells of the globules contained IAA, zeatin and ABA, which varied among different CL. Hormones are absent in embryonic tube of suspensor. Microsatellite analysis of proliferating cell lines of Siberian larch have shown weak allelic variability, and forth-year cloned plants were genetically stable. Globules of somatic embryos often accumulated on a surface of cultures and formed aggregations, and their suspensors closely adjoined to each other. The formed polyembryonic complexes consisted of globules and suspensors.

Multiplication of somatic embryos actively passed as a result of cleavage of embryos, suspensor budding and embryonal tubes of suspensor proliferation. Inhibition of polyembryogenesis, occur under the influence ABA. After transfer of proliferating ESM to a nutrient medium AI with ABA, cleavage, budding and splitting the embryonal tubes of suspensory continued. After 1 week of cultivation in this environment, each embryo was independent. Mature somatic embryos outcome from the primary number of globular somatic embryos in different CLs ranged from 0.6 % to 33 %.

Germination of somatic embryos was carried out on a non-hormonal ½AI medium for 28 days. Regenerants are characterized by the formation of nodosity in the area of the hypocotyl and callus between hypocotyl and root. For adaptation, regenerants were planted in sterile soil in a growth chamber, then in a greenhouse and further into the forest nursery soil, where cloned plants actively grow for six years. Genotyping of microsatellite loci in cloned plants showed full compliance with their CL6 from which they were derived.

The reported study was funded by RFBR according to the research projects No. 15-04-01427 and No. 18-54-00010 Bel_a.

Транзиентная экспрессия гетерологичных генов в растениях — новые возможности исследователя в решении фундаментальных проблем и прикладных задач

Тюрин А. А.¹, Павленко О. С.¹, Кабардаева К. В.¹, Берестовой М. А.¹, Гра О. А.¹, Фадеев В. С.¹, Мустафаев О.², Голденкова-Павлова И. В.¹

¹ Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, ул. Ботаническая, 35, Москва, 127276, Россия, факс: +7(499)977-80-18, тел.: +7(499)678-53-56, e-mail: irengold58@gmail.com

² Бакинский государственный университет, Баку, Азербайджан, e-mail: orkhan@bioset.org

Для экспрессии гетерологичных генов в растениях исследователи используют две основные стратегии: стабильная (постоянная) экспрессия и транзиентная (временная) экспрессия. При этом транзиентная экспрессия гетерологичных генов считается более эффективным подходом как для изучения регуляторных элементов и физиологической роли генов растений, так и для использования растений как продуцентов целевых белков, поскольку требует меньше временных и материальных затрат. Для успешного использования метода транзиентной экспрессии генов в растительных клетках, как в фундаментальных, так и в прикладных исследованиях необходимы удобные векторные системы.

Для этого нами сконструированы серии модульных векторов. В этих векторах учтено большинство факторов, обеспечивающих эффективную экспрессию гетерологичных генов в растениях; обеспечена возможность простых процедур клонирования регуляторных элементов и целевых генов; позволяют использовать только один штамм агробактерий за счет включения в вектор вирусного белка супрессора «замолкания генов» р19, а также имеют дополнительную экспрессионную кассету, которая включает репортерный ген флуоресцентного белка под контролем растительного промотора, что позволяет обеспечить точный, надежный и эффективный анализ регуляторных элементов.

Эти векторные системы успешно апробированы на модельных растениях. В докладе будут представлены экспериментальные результаты, которые получены нами с использованием разработанных векторных систем. А именно: будет продемонстрировано, что они эффективны (1) для оценки функциональности таких регуляторных элементов, как промоторы, трансляционные энхансеры и другие регуляторные мотивы; (2) для оценки локализации белковых продуктов в растительных клетках; (3) при изучении физиологической роли гена, на примере экспрессии гена гетерологичной $\Delta 9$ -десатуразы; (4) для разработки эффективных систем наработки важных целевых в растениях.

Совокупность полученных экспериментальных данных свидетельствуют о том, что метод транзиентной экспрессии перспективен для многих фундаментальных исследований и биотехнологии.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 18-04-00026.

Transient expression of heterologous genes in plants — new possibilities for the researcher to solve the fundamental and applied problems

**Tyurin A. A.¹, Pavlenko O. S.¹, Kabardaeva K. V.¹, Berestovoy M. A.¹,
Gra O. A.¹, Fadeev V. S.¹, Mustafaev O.², Goldenkova-Pavlova I. V.¹**

¹*K. A. Timiryazev Institute of Plant Physiology Russian Academy of Sciences, 35 Botanicheskaya st., 127276, Moscow, Russian Federation, fax: +7(499)977-80-18, tel.: +7(499)678-53-56, e-mail: irengold58@gmail.com*

²*Baku State University, Baku, AZ 1148, Azerbaijan, e-mail: orkhan@bioset.org*

.....

To express heterologous genes in plants, researchers use two main strategies: stable (constant) expression and transient (temporal) expression. Moreover, transient expression of heterologous genes is considered to be a more effective approach for studying regulatory elements and the physiological role of plant genes, and for using plants as producers of target proteins, since it requires less time and material costs. To successfully use the method of transient expression of genes in plant cells, both in fundamental and applied research, convenient vector systems are needed.

For this purpose, we have designed a series of modular vectors. These vectors take into account most of the factors that ensure the effective expression of heterologous genes in plants; provides the possibility of simple procedures for cloning regulatory elements and target genes; only one strain of agrobacteria can be used by including the p19 gene “suppression” suppressor in the vector of the viral protein, and they also have an additional expression cassette that includes the reporter gene of the fluorescent protein under the control of the plant promoter, which allows for an accurate, reliable and efficient analysis of the regulatory elements.

These vector systems are successfully tested on model plants. The report will present the experimental results that we obtained using the developed vector systems. Namely, it will be demonstrated that they are effective (1) for assessing the functionality of such regulatory elements as promoters, translational enhancers and other regulatory motifs; (2) to evaluate the localization of protein products in plant cells; (3) when studying the physiological role of the gene, for example, the expression of the heterologous $\Delta 9$ -desaturase gene; (4) to develop effective systems for the generation of important targets in plants.

A set of experimental data indicate that the method of transient expression is promising for many fundamental research and biotechnology.

The work was supported by a grant from the Russian Science Foundation No. 18-04-00026.

Стимуляция синтеза активных форм кислорода в корнях микроклонов древесных растений при их выведении в условия *ex vitro*

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

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

*e-mail: usnichbio@gmail.com

Микроклональное размножение является одним из наиболее важных биотехнологических приемов при воспроизводстве посадочного материала декоративных древесных растений. Повреждение и смертность молодых микроклонов на этапе выведения в условия *ex vitro* значительно снижает эффективность данного подхода и является лимитирующим фактором его более широкого использования. Решение этой проблемы возможно при развитии технологий, повышающих стрессоустойчивость растений на стадии выведения *ex vitro*. Все виды стрессовых воздействий, наблюдающихся при выведении растений в условия *ex vitro*, вызывают окислительный стресс. 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, производилось при помощи стандартной эпифлуоресцентной микроскопии, среды анализа изображений ImageJ в комбинации с флуоресцентным зондом для $O_2^{\cdot -}$ дигидроэтидиум. 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 дигидроэтидиума, отражающий генерацию АФК, в клетках корня форзиции значительно увеличивался при механическом и осмотическом стрессе, достигая максимума через 60 мин. Максимальное ингибирующее действие имела обработка тиомочевинной (40 %). Отдельно были проведены опыты по анализу укореняемости растений при обработке тиомочевинной перед высадкой в почвенный субстрат (результаты регистрировались через 30 сут после высадки). Было показано, что обработка тиомочевинной увеличивает выживаемость, стимулирует набор биомассы и рост корневой системы адаптирующихся к условиям *ex vitro* растений. Таким образом, полученные в работе результаты позволяют сделать следующие выводы: 1) механический стресс вызывает генерацию АФК, среди которых доминируют формы, устраняемые тиомочевинной, 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 тиомочевинной значительно увеличивает жизнеспособность молодых древесных растений при переводе их из условий *in vitro* в почвенные субстраты и открытый атмосферный газообмен.

Stimulation of synthesis of reactive oxygen forms in the roots of microclones of woody plants during extraction to *ex vitro* conditions

Usnich S. L.*, Mackievic V. S., Przhevalskaya D. A., Charnysh M. A., Shashko A. Yu., Bandarenka V. Yu., Kalbanov D. V., Demidchik V. V.

Belarusian state university, Minsk, Belarus

* e-mail: usnichbio@gmail.com

Microclonal reproduction is one of the most important biotechnological methods in the reproduction of planting material of decorative woody plants. The damage and mortality of young microclones at the stage of excretion into *ex vitro* conditions significantly reduces the effectiveness of this approach and is the limiting factor of its wider use. The solution of this problem is possible with the development of technologies that increase the stress tolerance of plants at the stage of excretion *ex vitro*. All kinds of stressful effects that occur when plants are exposed to *ex vitro* conditions cause oxidative stress. The mechanisms of generation of ROS during the transfer of plants under *ex vitro* conditions in woody plants have not been studied to date. The aim of the present study was to establish the patterns of oxidative stress development during mechanical damage during transfer to non-sterile conditions of clones of model decorative forcing plants (*Forsythia × intermedia*) obtained by the method of vegetative cloning in *in vitro* conditions.

Measurement of the dynamics of generation of ROS in microclones of forcing was performed using standard epifluorescence microscopy, ImageJ image analysis medium in combination with a fluorescent probe for $O_2 \cdot^-$ -dihydroethidium. To reveal the qualitative composition of the formed ROS, superoxide dismutase (600 units), catalase (1000 units), thiourea (1 mM), dimethylsulfoxide (0.3 %) were used; To analyze the involvement of the stress Ca^{2+} signaling system, blockers of Ca^{2+} -permeable cation channels Gd^{3+} (0.3 mM $GdCl_3$) and La^{3+} (0.3 mM $LaCl_3$) were used. The fluorescent signal of dihydroethidium, reflecting the generation of ROS, in the cells of the root of forcing significantly increased under mechanical and osmotic stress, reaching a maximum after 60 minutes. The maximum inhibitory effect was treated with thiourea (40 %). Separately, experiments were conducted on the analysis of plant rooting during the treatment with thiourea before planting in the soil substrate (the results were recorded 30 days after landing). It has been shown that treatment with thiourea increases survival, stimulates biomass recruitment and growth of the root system of plants adapted to *ex vitro* conditions. Thus, the results obtained in the work allow us to draw the following conclusions: 1) mechanical stress causes the generation of ROS, among which the forms eliminated by thiourea, such as hydroxyl radicals, dominate; 2) osmotic stress when exposed to *ex vitro* conditions does not play a significant role in inducing ROS generation; 3) treatment of young plants with thiourea significantly increases the viability of young tree plants when transferring them from *in vitro* conditions to soil substrates and open atmospheric gas exchange.

Молекулярно-биологические особенности культивируемых селекционно-ценных генотипов тополя и осины на основе SSR-маркеров

Федулова Т. П., Ржевский С. Г., Гродецкая Т. А.

Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии, ул. Ломоносова, 105, Воронеж, 394000, Россия, тел.: +7(473)253-71-89, e-mail: biotechnologiya@mail.ru

.....

В настоящее время наиболее перспективными для оценки культивируемого *in vitro* растительного материала являются методы идентификации лесных древесных культур, основанные на использовании ДНК маркеров. Признанное лидерство принадлежит SSR-маркерам (Simple Sequence Repeats). Большинство идентифицированных SSR-локусов являются переменными по длине, что обусловлено различным количеством тандемных последовательностей. Анализ длины микросателлитов позволяет выявить значительное количество аллельных вариантов, а их распространение по всему геному дает возможность охватить значительную его часть.

Объектом исследования являлись образцы ДНК тополя и осины, выделенные из листьев деревьев селекционно-ценных генотипов, собранных на плантации в Семилукском лесопитомнике в Воронежской области, а также полученные из них микроклоны, находящиеся в культуре *in vitro* и микросателлитные маркеры, полиморфность которых оценивали на выделенных образцах ДНК.

Цель настоящего этапа исследований — апробация отобранных перспективных микросателлитных маркеров для оценки полиморфизма ДНК генотипов тополя и осины. В ходе исследования оптимизирован протокол проведения полимеразной цепной реакции.

В результате проведенной работы подтверждена возможность диагностирования индивидуальных генотипов тополя и осины на основе полиморфизма изученных микросателлитных маркеров. Итогом данного этапа работы является набор из 9 ядерных микросателлитных маркеров тополя и осины, выявивший наибольший полиморфизм ДНК в исследованных образцах. С этим набором маркеров проведены работы по оценке полиморфизма ДНК в генотипах тополя и осины. На основе полученных экспериментальных данных выявлены наиболее и наименее полиморфные микросателлитные локусы. Для каждого генотипа установлены уникальные ДНК-профили и составлены генетические паспорта 10 исследованных образцов осины и 13 образцов тополя.

Протестированы двенадцать SSR-локусов, специфичных для тополя и осины, 9 из них дали доступный для интерпретации результат, они могут быть рекомендованы для проведения молекулярно-генетической паспортизации и идентификации образцов данных пород. В результате проведенного анализа генотипов тополя и осины для 9 из 9 исследованных микросателлитных маркеров обнаружен явный полиморфизм.

На основании результатов ПЦР-исследований, исходных и полученных в культуре *in vitro* деревьев, предложены следующие микросателлитные локусы для проведения молекулярно-генетической сертификации и идентификации ценных генотипов тополя и березы: ORPM_92, ORPM_30, ORPM_276, ORPM_489, PMGC_2321, PMGC_2418, WPMS_16, WPMS_19, PMGC_2718.

Molecular-biological features of cultivated selection-valuable genotypes of poplar and aspen on the basis of SSR-markers

Fedulova T. P., Rzhovsky S. G., Grodetzkaya T. A.

All-Russian Research Institute of Forest Genetics, Breeding and Biotechnology, 105 Lomonosov st., 394000, Voronezh, Russian Federation, tel.: +7(473)253-71-89, e-mail: biotechnologiya@mail.ru

Currently, the most promising for the evaluation of cultivated *in vitro* plant material are the methods of identification of forest tree cultures based on the use of DNA markers. Recognized leadership belongs to SSR markers (Simple Sequence Repeats). Most of the identified SSR loci are variable in length, due to the different number of tandem sequences. Analysis of the length of microsatellites allows us to identify a significant number of allelic variants, and their spread throughout the genome give a chance to cover a significant part of it.

The object of the study was DNA samples of poplar and aspen isolated from tree leaves. The probes were collected from selection-valuable genotypes on plantations in the Semiluki forest nursery of the Voronezh region. Microclones obtained in plantations and cultivated in *in vitro* culture were analyzed. Also, microsatellite markers were used for polymorphism evaluation on the released DNA samples.

The purpose of this stage of the research is the approbation of selected prospective microsatellite markers for the evaluation of poplar and aspen genotypes DNA polymorphism. In the course of the study, the polymerase chain reaction protocol was optimized.

As a result of the work carried out, the possibility of diagnosis of poplar and aspen genotypes was confirmed on the basis of microsatellite markers polymorphism. A set of 9 nuclear microsatellite markers of poplar and aspen was developed, which revealed the great DNA polymorphism in the studied samples. With this set of markers, the work was carried out to evaluate DNA polymorphism in poplar and aspen genotypes. Based on the experimental data obtained, the most polymorphic and monomorphic microsatellite loci were identified. For each genotype investigated, genetic passports are compiled on the basis of unique DNA profiles from the samples of 10 aspen and 13 poplar trees.

Twelve SSR markers were intended for the poplar and aspen loci, nine of which gave an interpretable result and could be recommended for molecular-genetic certification and identification of these species. The analysis of the studied poplar and aspen genotypes revealed an obvious polymorphism for 9 out of 9 microsatellite markers.

Based on the PCR studies obtained in *in vitro* culture of the original trees, the following microsatellite loci are proposed for carrying out molecular-genetic certification and identification of valuable poplar and birch genotypes: ORPM_92, ORPM_30, ORPM_276, ORPM_489, PMGC_2321, PMGC_2418, WPMS_16, WPMS_19, PMGC_2718.

Молекулярно-генетическое тестирование ДН-линий сахарной свёклы (*Beta vulgaris* L.)

Федулова Т. П., Подвигина О. А.

Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свёклы и сахара
им. А. Л. Мазлумова, пос. ВНИИСС, д. 86, 396030, Рамонский район, Воронежская область, Россия,
факс: +7(473)405-33-26, тел.: +7(473)405-33-27, e-mail: biotechnologiya@mail.ru

.....

Одной из главных задач биотехнологических исследований по сахарной свёкле является ускорение селекционного процесса путем интеграции новой (маркерной) технологии. Поддержание селекционных линий через культуру *in vitro* (т. е. поддержание банка генов) и получение гомозиготных линий методами удвоенных гаплоидов (ДН), необходимых для создания гетерозисных гибридов, являются приоритетными направлениями исследований. Вместе с тем созданные в культуре *in vitro* ДН-линии необходимо оценить по степени гемизиготности молекулярно-генетическими методами.

Генетическое маркирование по изоферментным спектрам было использовано нами при создании нового исходного материала сахарной свёклы путем индуцирования гаплоидии *in vitro*. Данный метод основан на культивировании неоплодотворенных семязачатков на питательной среде, формировании гаплоидных линий и переводе их на диплоидный уровень путем колхицинирования. Это один из перспективных на сегодняшний день способов, дающий возможность в течение короткого срока, с точки зрения селекционного процесса, получить гомозиготный материал практически по всем генам.

Для индукции гаплоидии донорские растения сахарной свёклы были промаркированы по составу изоферментных локусов: Me-1, Idh-1, Gdh-1, контролирующих малик-энзим, изоцитратдегидрогеназу, глутаматдегидрогеназу соответственно. Изоферментный анализ исходных растений показал, что три растения из восьми были гомозиготны по трем изученным изоферментным локусам, а остальные имели гетерозиготные генотипы, хотя бы по одному маркерному гену. В результате проведенных исследований выявлено, что донорские генотипы, гетерозиготные по изоферментным локусам, сформировали наибольшее количество гаплоидных регенерантов — 64,7% от общего количества полученных микроклонов. Исследуемые регенеранты показали стопроцентную гемизиготность по составу изоферментных локусов: Me-1, Idh-1, Gdh-1. В этой связи нами были изучены по семи изоферментным локусам восемь дигаплоидных (ДН) линий сахарной свёклы, полученных в культуре *in vitro*. На основании частоты встречаемости типов изоферментных спектров у них определен индекс изоферментной гомозиготности ИИЗ. Оценка дигаплоидных линий по семи изоферментным локусам позволила выявить их высокую гомозиготность. Индекс изоферментной гомозиготности ИИЗ у дигаплоидных линий варьирует от 0,81 до 1 и в среднем составляет 0,96. Следует отметить, ИИЗ у линий I3, полученных обычным инцухтированием, составляет всего 0,85. Это свидетельствует о достаточно высокой чистоте дигаплоидных линий, полученных в культуре *in vitro*. В настоящее время для исследования генетической организации селекционируемых форм все чаще используют молекулярно-генетические методы на основе полиморфизма длин рестриктных фрагментов ДНК (PDRF, RFLP), на чем в дальнейшем будут сосредоточены наши исследования.

Таким образом, анализ экспериментальных данных свидетельствует о том, что изоферментное маркирование позволяет надежно и быстро контролировать процесс создания исходного материала методом гиногенеза.

Molecular-genetic testing of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) DH-lines

Fedulova T. P., Podvigina O. A.

The A. L. Mazlumov All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar, 86 VNIISS, 396030,
Ramonsky district, Voronezh region, Russian Federation,
fax: +7(473)405-33-26, tel.: +7(473)405-33-27, e-mail: biotechnologiya@mail.ru

One of the main tasks of sugar beet biotechnological researches is breeding process acceleration by integration of a new (marker) technology. Maintenance of breeding lines through *in vitro* culture (i. e. gene bank maintenance) and obtaining of homozygous lines by methods of doubled haploids (DH) necessary for development of heterosis hybrids are priority directions of investigations. At the same time, produced under *in vitro* culture DH-lines are necessary to evaluate for hemizyosity degree by molecular-genetic methods.

Genetical marking according isozyme spectra has been used by us when developing of a new sugar beet starting material by inducing haploidy *in vitro*. This method is based on cultivation of unfertilized ovules on a nutrient medium, formation of haploid lines and their transfer to diploid level by colchicine treatment. For today, this is a perspective technique that enables obtaining of homozygous material practically for all genes over a short, in terms of breeding process, period of time.

For haploidy induction, donor sugar beet plants have been marked according structure of isozyme loci: Me-1, Idh-1, Gdh-1, which controls the enzyme, izotsitratdegidrogenazy, glutamatdekarboksilazy, respectively. The isozyme analysis of initial plants have showed that three of the eight plants are homozygous according three isozyme loci studied, and the others have heterozygous genotypes, at least, for one marker gene. By the induction process of unfertilized ovules under *in vitro* culture, 17 dihaploid lines have been obtained. As a result of the conducted investigations, it has been revealed that donor genotypes, heterozygous according isozyme loci, generate the greatest quantity of haploid regenerants — 64.7% of the total quantity of the microclones obtained. The investigated regenerants have showed absolute hemizyosity of isozyme loci structure: Me-1, Idh-1, Gdh-1. In this connection, we studied eight dihaploid (DH) sugar beet lines obtained under *in vitro* culture for seven isozyme loci. Based on frequency of occurrence of isozyme spectra, index of isozyme homozygosity (IIZ) have been determined for them. Evaluation of dihaploid lines according seven isozyme loci has allowed revealing their high homozygosity level. The index of isozyme homozygosity (IIZ) in dihaploid lines varies from 0.81 to 1 and is 0.96 on average. It should be noted that IIZ of the 13 lines obtained by common inbreeding is 0.85 only. This is the evidence of a sufficient purity of the dihaploid lines obtained under *in vitro* culture. Now, molecular-genetic methods on the basis of restriction DNA fragment lengths' polymorphism (PDRF, RFLP) are the most often used to study genome organization of selected forms what our research will focus on in the future.

Thus, the analysis of experimental data testifies that isozyme marking allows reliable and quick control of the starting material development process by a gynogenesis method.

Анаболические свойства суспензионной культуры клеток *Dioscorea deltoidea* Wall.

**Фоменков А. А.¹, Титова М. В.¹, Суханова Е. С.¹, Иванов И. М.¹,
Василевская Е. Р.²**

¹ Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, ул. Ботаническая, 35, Москва, 127276, Россия, тел.: +7(499)678-53-91

² Всероссийский научно-исследовательский институт мясной промышленности им. В. М. Горбатова, ул. Талалихина, 26, Москва, 109316, Россия, тел.: +7(495)676-92-11, e-mail: Artem.Fomenkov@gmail.com

В восточной народной медицине диоскорея дельтовидная (*Dioscorea deltoidea*) — продуцент фураностаноловых гликозидов — используется в качестве элемента здорового питания в связи с выраженными иммуномодулирующими, тонизирующими, противовоспалительными, противокашлевыми и муколитическими свойствами. Кроме того, препараты *D. deltoidea* действуют на репродуктивную систему животных, стимулируя овуляцию и сперматогенез. Для фураностаноловых гликозидов из культуры клеток *D. deltoidea* также была обнаружена способность стимулировать синтез белков и активировать некоторые ферменты (сукцинат-лактатдегидрогеназы и цитохромоксидазы), связанные с энергетическими и анаболическими процессами.

Целью нашего исследования являлось изучение анаболической активности культур клеток диоскореи дельтовидной на лабораторных животных (клинически здоровых крысах стока Wistar, spf-категории), которых после прохождения адаптации распределяли на 2 группы — контрольную и опытную. Опытным животным *per os* вводили культуру клеток *D. deltoidea* в виде 10%-й суспензии в количестве 1 мл/кг массы тела, контрольным крысам — эквивалентный объем дистиллированной воды. Наблюдение в процессе проведения эксперимента показало, что введение крысам исследуемого образца не сказывалось на поведении, состоянии кожи, шерстного покрова и видимых слизистых оболочек подопытных животных, различий в потреблении корма и воды также отмечено не было, общее состояние животных соответствовало физиологической норме. Привесы за 30 суток по отношению к исходной массе у опытной группы превышали контрольные значения на 33%. У крыс, которым вводили культуру клеток *D. deltoidea*, было отмечено некоторое увеличение среднего объема эритроцитов (до 4%, $P < 0,05$) и средней концентрации гемоглобина в эритроците (на 1,5%, $P < 0,05$) при незначительном недостоверном снижении количества эритроцитов, наблюдалось незначительное увеличение содержания тромбоцитов на 7% ($P < 0,05$) и уровня тромбокриты на 6% ($P > 0,05$). Относительно липидов сыворотки крови у экспериментальных животных выявлено снижение концентрации холестерина (на 3%) и триглицеридов (до 30%) относительно контрольной группы. С целью изучения возможности увеличения мышечной массы при введении растущим крысам в течение 30 суток исследуемого образца проведено исследование икроножной мышцы. Установлено, что у животных опытной группы масса икроножной мышцы составляла $1,63 \pm 0,09$ г, у крыс контрольной группы — $1,46 \pm 0,15$ г, т. е. увеличивалась на 7% относительно контрольных животных. В отношении биохимических показателей, характеризующих обмен белка, достоверных отличий не выявлено, однако снижение креатинина (не более 5%, $P > 0,05$) может свидетельствовать о более интенсивном катаболизме белков.

Anabolic properties of the *Dioscorea deltoidea* Wall suspension cell culture

**Fomenkov A. A.¹, Titova M. V.¹, Sukhanova E. S.¹, Ivanov I. M.¹,
Vasilevskaya E. R.²**

¹ K. A. Timiryazev Institute of Plant Physiology Russian Academy of Sciences, 35 Botanicheskaya st., 127276, Moscow, Russian Federation, tel.: +7(499)678-53-91

² V. M. Gorbатов All-Russian Research Institute of Meat Industry, 26 Talalikhina st., 109316, Moscow, Russian Federation, tel.: +7(495)676-92-11, e-mail: Artem.Fomenkov@gmail.com

.....

In eastern tradition medicine, *Dioscorea deltoidea* as a furostanolic glycosides producer is used as a part of healthy nutrition due to its considerable immunomodulatory, tonic, anti-inflammatory, anti-tussive and mucolytic effects. Besides this *D. deltoidea* preparations produce effect on the reproductive system of animals, stimulating ovulation and spermatogenesis. For furostanolic glycosides from the *D. deltoidea* cell culture, the ability to stimulate protein biosynthesis and activate certain enzymes (succinate-lactate dehydrogenase and cytochrome oxidase) associated with energy metabolism and anabolic processes has also been found.

The purpose of the work was to study the anabolic effect of *D. deltoidea* cell cultures on laboratory animals (clinically healthy Wistar rats, spf-category). After the adaptation the animals were divided into 2 groups — control and experimental ones. Experimental animals were given *per os* the *D. deltoidea* cell culture as a 10 % suspension in the amount of 1 ml/kg of body weight, to control rats an equivalent volume of distilled water. Observation during the experiment showed that the test sample injection to the rats did not affect the behavior of the animals and the state of the skin, hair and visible mucous membranes. Neither any differences in feed and water intake were observed, and the general state of the animals corresponded to the physiological norm. The weight gain in the test group after 30 days exceeded the control by 33 % compared to the control group. The rats injected with the *D. deltoidea* cell culture showed a slight increase of the mean erythrocytes volume (up to 4 %, $P < 0.05$) and average hemoglobin concentration per erythrocyte (by 1.5 %, $P < 0.05$) with a slight unreliable decrease of erythrocytes number. Also an increase by 7 % ($P < 0.05$) of platelet quantity and plateletcrit level by 6 % ($P > 0.05$) was observed. As to serum lipids in experimental animals, a decrease of cholesterol concentration (by 3 %) and triglycerides (up to 30 %) in comparison to the control group was revealed. In order to study the possibility of the muscle mass increase, after the test sample injection to the growing rats during 30 days the analysis of the gastrocnemius muscle has been led. It was found out that in the experimental animals the weight of the gastrocnemius muscle was 1.63 ± 0.09 g; in the control rats — 1.46 ± 0.15 g, i. e. increased by 7 % relative to the control. According to the biochemical parameters characterizing protein metabolism, there were no significant differences, but a creatinine decrease (not more than 5 %, $P > 0.05$) may indicate more intensive protein catabolism.

Исследование содержания экдистероидов в культуре клеток *Ajuga turkestanica*

**Харитонов Т. Д.¹, Титова М. В.¹, Собољкова Г. И.¹, Чернобурова Е. И.²,
Заварзин И. В.², Носов А. М.¹**

¹ Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, ул. Ботаническая, 35, Москва, 127276, Россия, факс: +7(499)678-54-20, тел.: +7(499)678-54-00

² Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН, пр-т Ленинский, 47, Москва, 119991, Россия, факс: +7(499)135-53-28, тел.: +7(499)137-29-44, e-mail: Khartimur@mail.ru

Фитоэкдистероиды — широко известная группа природных нетоксичных полиоксистероидов (группа полигидроксилированных стероидных соединений).

Фитоэкдистероиды обладают высокой биологической активностью и выполняют функции гормонов линьки и метаморфоза насекомых. Научным прорывом стало обнаружение этого класса веществ в растениях. В связи с тем, что экдистероиды широко распространены в мировой флоре, интерес к ним не уменьшается и в настоящее время.

Побеги живучки туркестанской (*Ajuga turkestanica*) применяются в спортивной медицине и косметологии благодаря наличию в них специфического фитоэкдистероида — туркестерона, который по анаболическому эффекту не уступает синтетическим препаратам, не являясь при этом допингом. Туркестерон не токсичен, проявляет тонизирующее действие, стимулирует работоспособность, предохраняет от негативного воздействия различных стрессорных факторов. Живучка туркестанская является источником разнообразных фитоэкдистероидов. В связи с этим большой интерес представляет разработка биотехнологического способа получения экдистероидов с использованием культур клеток *Ajuga turkestanica*.

Целью данного исследования являлась разработка оптимальных условий выращивания культур клеток *Ajuga turkestanica* с максимальным накоплением фитоэкдистероидов, преимущественно туркестерона.

Каллусные и суспензионные культуры были получены в Институте физиологии растений РАН. Культуры *Ajuga turkestanica* выращивали на модифицированной среде Мурасиге-Скута с добавлением фитогормонов.

На первом этапе работы было проведено изучение влияния различных условий экстракции на извлечение экдистероидов из лиофилизированной биомассы культуры клеток *Ajuga turkestanica*. Также была проведена оптимизация методики очистки полученных экстрактов. Очищенные экстракты анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

В результате был разработан метод количественного определения содержания экдистероидов в биомассе каллусных и суспензионных культур клеток *Ajuga turkestanica* методом ВЭЖХ. С использованием этого метода проведен скрининг образцов биомассы культур клеток живучки туркестанской на содержание этих соединений. Показано, что в некоторых линиях каллусных и суспензионных культур клеток *Ajuga turkestanica* содержатся туркестерон и экдистерон, при этом в ряде случаев их содержание может быть сопоставимо с интактным растением.

The study of the content of ecdysteroids in the culture of cells of *Ajuga turkestanica*

Kharitonov T. D.¹, Titova M. V.¹, Sobolkova G. I.¹, Chernoburova E. I.², Zavarzin I. V.², Nosov A. M.¹

¹ K. A. Timiryazev Institute of Plant Physiology Russian Academy of Sciences, 35 Botanicheskaya st., 127276, Moscow, Russian Federation, fax: +7(499)678-54-20, tel.: +7(499)678-54-00

² Zelinsky Institute of Organic Chemistry RAS, 47 Leninsky ave., 119991, Moscow, Russian Federation, fax: +7(499)135-53-28, tel.: +7(499)137-29-44, e-mail: Khartimur@mail.ru

Phytoecdysteroids is widely known group of natural non-toxic polyoxysteroids (group of polyhydroxylated steroid compounds).

Phytoecdysteroids have a high biological activity and act as hormones of molting and metamorphosis of insects. The scientific breakthrough was the discovery of this class of substances in plants. Due to the fact that ecdysteroids are widespread in the floraworld, the interest to them is not decreasing at the present time.

Shoots of *Ajuga turkestanica* are used in sports medicine and cosmetology, due to the presence in them of a specific phytoecdysteroid — turkesterone, which in anabolic effect is not inferior to synthetic drugs, without being doping. Turkesterone is non-toxic, has a tonic effect, stimulates efficiency, protects against the negative effects of various stress factors. *Ajuga turkestanica* is a source of various phytoecdysteroids. In this regard, the development of a biotechnological method for producing ofecdysteroids using *Ajuga turkestanica* cell cultures is of great interest.

This study was focused on building to develop optimal conditions for the cultivation of *Ajuga turkestanica* cell cultures with a maximum accumulation of phytoecdysteroids, mainly turkesterone.

Callus and suspension cultures were obtained at the Institute of Plant Physiology, RAS. *Ajuga turkestanica* crops were grown on modified Murashige and Skoog medium with addition of phytohormones.

In the first phase of work was the study of the influence of different extraction conditions on the extraction of ecdysteroids from lyophilized biomass of *Ajuga turkestanica* cell culture. Was also conducted optimization of purification methods of the resulting extracts. The purified extracts were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC).

As a result, a method was developed to quantify the content of ecdysteroids in the biomass of callus and suspension of *Ajuga turkestanica* cell cultures by HPLC. Using this method, more than of biomass of *Ajuga turkestanica* cell cultures were screened for the content of these compounds. It is shown that some lines of callus and suspension cell cultures of *Ajuga turkestanica* contain turkesterone and ecdysterone, and in some cases their content can be comparable with the intact plant.

Асептическая коллекция — биотехнологический подход к омоложению видовой сирени

Хотляник Н. В., Зубарев А. В., Лазарук Г. В., Спиридович Е. В.

Центральный ботанический сад НАН Беларуси, ул. Сурганова, 2 в, Минск, 220012, Беларусь,
тел. +375(17)284-14-74, факс: +375(17)284-14-64,

e-mail: khotlyanik@yandex.ru, a.spirydovich@gmail.com, av.zubarev01@gmail.com

Культурная сирень — одно из самых популярных декоративных древесных растений и является одним из традиционных растений садов, парков, городских скверов и приусадебных участков. В последнее время возрастает интерес к видовой сирени как к объекту получения ценных продуктов вторичного метаболизма, таких как сирингин, возможности использования древесины в строительстве и для изготовления мебели. Фитохимические исследования представителей рода *Syringa* L. позволили идентифицировать в них более 140 вторичных метаболитов, в том числе иридоиды, лигнаны, фенилпропаноиды, органические кислоты и эфирные масла. Из коры *Syringa vulgaris* L. выделены различные вещества фенольной природы. Одним из основных является фенилпропаноид сирингин (элеутерозид В), который входит в состав противомикробных, жаропонижающих и противовирусных препаратов.

Реферируемая коллекция видовой сирени Центрального ботанического сада НАН Беларуси (ЦБС) насчитывает около 23 таксонов. Некоторые растения, представленные в коллекции, являются по происхождению эндемиками Китая. Некоторые виды появились в саду более восьмидесяти лет назад (*Syringa reticulate* subsp. *Amurensis*, *Syringa emodi*, *Syringa tomentella*). В связи с этим на первый план становится вопрос сохранения и омоложения реферируемой коллекции видовой сирени ЦБС.

В ходе исследования выявлена группа таксонов рода *Syringa* L. с высоким содержанием сирингина в коре и наибольшим уровнем комплексной продуктивности, что позволяет определиться с выбором объектов для введения в культуру *in vitro*, закладки плантаций и выращивания для заготовки лекарственного сырья. В эту группу вошли *Syringa oblata* Lindl., *Syringa josikaea* J. Jacq. ex Rchb. f. и *Syringa villosa* ssp. *Wolfii* (C. K. Schneid.) Jin Y. Chen & D. Y. Hong. 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 Мурасиге-Скуга с полуторным содержанием макросолей, добавлением 1 мг/л 2-ип; источник углерода — сахароза (20 г/л), уплотнитель — агар (Sigma) (7 г/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 изучаемых таксонов 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).

Aseptic collection — the biotechnological method of rejuvenation of Lilac species plants

Khatlianik N. V., Zubarev A. V., Lazaruk H. V., Spiridovich E. V.

Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, 2v Surganova st., 220012, Minsk, Republic of Belarus, tel.: +375(17)284-14-74, fax: +375(17)284-14-64, e-mail: khotlyanik@yandex.ru, a.spirydovich@gmail.com, av.zubarev01@gmail.com

Cultural lilacs are one of the most popular ornamental shrubs and are one of traditional plant of gardens, parks, city squares and smallholdings. Nowadays there is an increase of the interest to species of lilacs as an object of producing of valuable secondary metabolism substances, as syringin. Also opportunities of using lilacs wood as material for building of furniture become more and more interesting. Phytochemical researches of representatives of *Syringa* genus allowed to identify more than 140 different secondary metabolites, in that number — iridoids, phenylpropanoids, organic acids, lignans, and essential oils. Different substances of phenolic seria were extracted from bark of *Syringa vulgaris* L. The major fraction of them is phenylpropanoid syringin (eleutheroside B), which is component of anti-bacterial, antipyretic and antiviral drugs.

A collection of lilac species includes about 23 different taxa. Some plants, introduced in collection are endemics of China; some species appeared in garden more then 80 years ago (*Syringa reticulata* subsp. *amurensis*, *Syringa emodi*, *Syringa tomentella*). Due to the high relevance on the foreground appears the question of the importance of conservation and rejuvenation of the collection of lilac species of Central botanical garden of NAS of Belarus.

In the course of research was identified a group of taxa of genus *Syringa* L. With high concentration of syringin in the bark and highest level of complex productivity, what allows to choose objects for introduction to the culture *in vitro*, creation of plantations and cultivation for procurement of medicinal raw materials. This group includes *Syringa oblata* Lindl., *Syringa josikaea* J. Jacq. ex Rchb. f. and *Syringa villosa* ssp. *Wolfii* (C. K. Schneid.) Jin Y. Chen & D. Y. Hong. As a primary explants for introducing were used an axillary buds, which were received from forcings of young branches in laboratory conditions (cutting of branches of parent plants were carried out in the period from january to March). As a sterilizing agents were used laundry soap, 0.4% solution of fungicide “Ridomil-Gold” (exposition 7 min.), 0.06% solution of “Chlorocide” (Belaceptica TM) (exposition 30 min.). For introduction in *in vitro* culture was used a nutrient media of Murashige & Scoog with increased concentration of macrosalts to 150%, relatively to original content, adding a 1 mg/l of 2-ip; source of carbon — sucrose (20 g/l), thickener — agar (Sigma TM) (7 g/l). Explants were cultivated in standard conditions of *in vitro* technique: temperature 24±1°C, 16/8 hours of photoperiod, intensity of illumination 3–4 klux. During the research work was described, that on the stage of introducing culture show very expressed species-specificity of the studied lilac taxa. The highest indexes of morphogenetic potential have shown species *S. villosa* Vahl. (Villous lilac) и *S. vulgaris* L. (Common lilac), the lowest — *S. reticulata* subsp. *pekinensis* (Rupr.) P. S. Green & M. C. Chang (Pekin lilac).

Оценка жизнеспособности эксплантов видов рода *Astragalus* L. *in vitro*

Хуснетдинова Л. З., Фардеева М. Б.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, ул. Кремлевская, 18, Казань, 420008, Россия, факс: +7(843)233-78-14, тел.: +7(843)233-72-92, e-mail: husnetdinova.l@mail.ru; orchis@inbox.ru

В современных условиях сохранение биоразнообразия растений и создание единой базы данных по инвентаризации редких и ценных хозяйственных растений с разработкой системы критериев и определения уровня их охраны, подразумевает также и создание генетических банков *in vitro*. Перспективный метод клонального микро размножения позволяет в кратчайшие сроки получить большое количество растений для реинтродукции редких видов в естественных местообитаниях и интродукции ценных лекарственных или декоративных растений в ботанических садах. На территории Республики Татарстан (РТ), где сельскохозяйственная освоенность земель приводит к трансформации либо уничтожению степных фитоценозов, вопрос сохранения степных видов является актуальным.

В качестве объектов исследования были выбраны растения рода *Astragalus* (*A. falcatus*, *A. varius* — редкие виды РТ; *A. cicer*, *A. austriacus*, *A. onobrychis*), в состав которых входит значительное количество биологически активных веществ. Эти растения используются в официальной и народной медицине при заболеваниях почек, как диуретическое, гипоазотемическое и противовоспалительное средство. Основной целью работы было введение видов рода *Astragalus* в культуру *in vitro*. Для исследований были использованы семена, определены их морфометрические характеристики и проведены эксперименты по прорастанию первичных эксплантов в условиях *in vitro*. Предварительно проводилась поверхностная стерилизация эксплантов стерилизантами. Семена культивировали на стерильных питательных средах Мурасиге-Скуга. Оценка жизнеспособности и всхожести семян проводилась после предварительной скарификации. При изучении жизнеспособности эксплантов *in vitro* было выявлено, что при проращивании в стандартных условиях период от момента закладки семян до начала их прорастания составил в среднем для *A. cicer*, *A. varius* 11 суток, для *A. falcatus* образование побегов не наблюдалось вовсе. Предварительная скарификация способствует сокращению сроков прорастания для двух первых видов в 2 раза (до 5 суток), для *A. falcatus* — до 7 суток, активизируя прорастание и увеличивая число всходов семян в условиях *in vitro*. В целом, оценка всхожести семян степных видов незначительная: *A. cicer* — фоновый вид лугов и луговых степей Татарстана, его всхожесть составляет 12 % в стандартных условиях и 25 % после скарификации, у редких видов — *A. varius* — 4,2 % и 12,5 % соответственно, у *A. falcatus* — 8,3 % только после скарификации. Возможно, низкая всхожесть семян редких видов астрагалов обуславливает их исчезновение в естественных условиях РТ.

Evaluation of explant viability of some species of genus *Astragalus* L. *in vitro*

Khusnetdinova L. Z., Fardeeva M. B.

Kazan (Privolzhsky) Federal University, 18 Kremlevskaya st., 420008, Kazan, Russian Federation,
fax: +7(843)233-78-14, tel.: +7(843)233-72-92, e-mail: husnetdinova.l@mail.ru; orchis@inbox.ru

.....

In modern conditions, the conservation of plant biodiversity and the creation of a single database on the inventory of rare and valuable economic plants, with the development of a system of criteria and the definition of the level of their protection, also implies the creation of genetic banks *in vitro*. A promising method of clonal micropropagation allows a large number of plants to be obtained in the shortest possible time for the reintroduction of rare species in natural habitats and the introduction of valuable medicinal or ornamental plants in botanical gardens. On the territory of the Republic of Tatarstan (RT), where agricultural land development leads to the transformation or destruction of steppe phytocenoses, the conservation of steppe species is urgent.

As objects of research, plants of the genus *Astragalus* (*A. falcatus*, *A. varius* — rare species of RT, *A. cicer*, *A. austriacus*, *A. onobrychis*) which include a significant number of biologically active substances were selected. These plants are used in official and folk medicine for diseases of the kidneys as a diuretic, anti-inflammatory, and gipoazotemicheskoe. This work aims to the introduction of species of *Astragalus* in an *in vitro* culture. Seeds were used as explants for the studies, their morphological characteristics were determined, and experiments were conducted on the germination of primary explants under *in vitro* conditions. Sterilization of explants was carried out under aseptic sterilized conditions. Seeds were cultivated on sterile nutrient media of Murashige and Skoog. Evaluation of viability and germination of seeds was carried out after preliminary scarification. When studying the viability of the explants *in vitro*, it was found that cultured seeds of *A. cicer*, *A. varius* need about 11 days for germination the period from the moment of seed laying to the beginning of germination, on the same time seeds of *A. falcatus* did not show any shoot formations. Preliminary scarifications accelerate seed germination for the first two species by 2 times (up to 5 days), and for *A. falcatus* up to 7 days, it also increases the activity of seed germination and number of *in vitro* shoot formation. In general, the estimation of the germination of seeds of steppe species is insignificant: *A. cicer*, background view of meadows and meadow steppes of Tatarstan, its germination about 12 % under standard conditions and 25 % after scarification, for rare *A. varius* species — 4.2 % and 12.5 %, respectively, in *A. falcatus* — 8.3 % only after scarification. Perhaps, the lowest seed germination of rare species of *Astragalus* causes of their extinction in the wild RT conditions.

Выделение кислотоустойчивых форм сахарной свёклы в условиях *in vitro*

Черкасова Н. Н., Колесникова Е. О., Жужжалова Т. П.

Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свёклы и сахара им. А. Л. Мазлумова, п. Рамонь, Воронежская область, Россия, тел.: +7(473)405-33-27, факс: +7(473)405-33-26, e-mail: biotechnologiya@mail.ru

.....

Сахарная свёкла очень требовательна к условиям произрастания. Высокие урожаи ее можно получить только на высокоплодородных почвах с нейтральной реакцией почвенного раствора, при достаточно высокой обеспеченности элементами минерального питания. Длительное применение минеральных удобрений приводит к глубоким изменениям физико-химических свойств черноземов и часто вызывает повышение кислотности почвы, что губительно сказывается на растениях сахарной свёклы. В связи с этим селекция, направленная на создание толерантных к стрессовым факторам, в частности к кислотности почв, имеет большое значение, так как позволяет существенно увеличить урожайность у адаптивных форм. Селективные системы *in vitro* позволяют имитировать естественные стрессовые условия, что дает возможность проводить отбор толерантных форм на клеточном уровне и создавать новый исходный материал с высокими адаптивными свойствами.

В процессе наших исследований при культивировании зрелых зародышей сахарной свёклы была выявлена селективная питательная среда с сублетальной кислотностью (рН 3,5). Выживаемость проростков, на которой при первичном отборе составила около 50 %.

Проведение повторного отбора регенерантов в селективных условиях (рН 3,5), показало высокую их адаптивную способность. Количество выживших регенерантов составило около 80 %. Дальнейшее культивирование регенерантов на корневой среде при рН 3,8 дало возможность выделить устойчивые микроклоны по индексу длины корня. Уровень устойчивости по величине индекса длины корня (ИДК) варьировал от 1,0 до 1,2. Это позволило повысить толерантность растений-регенерантов в селективных условиях до 87,5 % и впервые создать 5 изогенных линий сахарной свёклы, характеризующихся повышенной устойчивостью к кислотности среды.

В результате исследований разработан метод системного отбора растений-регенерантов сахарной свёклы на селективных средах, позволяющий создавать селекционный материал, устойчивый к повышенной кислотности среды. Весь процесс создания линий занял 3 года, вместо 8–10 лет, что имеет большое значение в процессе селекции при создании новых гибридов сахарной свёклы с устойчивостью к стрессовым абиотическим факторам среды.

Obtaining of acid-resistant sugar beet forms under *in vitro* conditions

Cherkasova N. N., Kolesnikova E. O., Zhuzhzhhalova T. P.

The A. L. Mazlumov All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar, vil. Ramon, Voronezh region, Russian Federation, fax: +7(473)405-33-26, tel.: +7(473)405-33-27, e-mail: biotechnologiya@mail.ru

.....

Sugar beet is very exacting to growth conditions. Big yields of the crop can be obtained only on high-fertile soils with a neutral reaction of soil solution, and high enough supply with elements of mineral nutrition. Long-term application of mineral fertilizers leads to drastic changes of chernozem physical and chemical properties and often invokes increase of soil acidity that adversely affects sugar beet plants. In this connection, breeding directed at development of tolerant to stress factors, in particular, to soil acidity, is of great importance as it allows substantial increase of yield in adaptive forms. Selective *in vitro* systems allow simulation of natural stress conditions that gives the chance to lead selection of tolerant forms at cell level and to create a new starting material with high adaptive properties.

In the course of our investigations, a selective nutrient medium with sublethal acidity (pH 3.5) was revealed when cultivating mature sugar beet embryos. Survival rate of shoots on the medium during primary selection was about 50 %.

Carrying out of secondary selection of regenerants under selective conditions (pH 3.5) showed their high adaptability. Quantity of the survived regenerants was about 80 %. The further cultivation of regenerants on rooting medium with pH 3.8 enabled to select resistant microclones according root length index. Resistance level according root length index (RLI) value varied from 1.0 to 1.2. This allowed increasing tolerance of plants-regenerants under selective conditions up to 87.5 % and, for the first time, producing 5 isogenic lines of the sugar beet characterized by increased resistance to environment acidity.

As a result of the investigations, the method of system selection of sugar beet plants-regenerants on selective media has been developed that allow creation of breeding material resistant to high environment acidity. The whole process of the lines development has occupied 3 instead of 8–10 years that is of great importance for breeding process when producing new sugar beet hybrids with resistance to environment abiotic stress factors.

Толерантность клеток микроводоросли *Dunaliella salina* к низким температурам в зависимости от состава сред культивирования

Чернобай Н. А., Кадникова Н. Г.

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переясловская 23, Харьков, 61016, Украина, факс: +380(57)373-59-52, тел.: +380(57)373-41-43, e-mail: nadiachernobai@gmail.com

.....

На сегодняшний день единственным надежным способом длительного хранения биологических объектов разных таксономических групп является криоконсервирование. Несмотря на достигнутые успехи замораживание ряда микроводорослей остается проблематичным.

В качестве тест объекта использовали одноклеточные галофильные водоросли *D. salina*, предварительно выращенные без аэрирования и темновой фазы освещения на среде культивирования Артари с содержанием хлорида натрия 2М или на модифицированной среде Ramaraj (с 1,5 и 4 М NaCl соответственно).

Установлено, что культура микроводорослей *D. salina*, находящихся в стационарной фазе роста, более резистентна к гипотермии и замораживанию. Так, снижение температуры клеточных суспензий, находящихся в этой фазе роста, до +10°C, +4°C, -10°C и -40°C не влияло на жизнеспособность клеток. Однако после отогрева образцов, охлажденных до -40°C, подвижность клеток снижалась на 10–16%.

Каротиногенез считается адаптивной реакцией, обеспечивающей выживание микроводорослей в экстремальных условиях среды обитания. При изучении динамики роста *D. salina* отмечено, что в стационарной фазе роста существенно изменяется пигментный состав, а именно — уменьшается содержание хлорофиллов и накапливаются каротиноиды. Максимальное накопление β-каротина у микроводоросли индуцируется увеличением концентрации хлорида натрия в составе сред культивирования до 4 М.

Наряду с каротиногенезом клетки *D. salina* с увеличением содержания хлорида натрия повышают синтез внутриклеточного глицерина, который является общеизвестным криопротектором.

Таким образом, установлено, что естественные адаптивные реакции на абиотические стрессы влияют на толерантность клеток *D. salina* к гипотермии и замораживанию-отогреву в экспоненциальной и стационарной фазе роста независимо от состава сред культивирования.

Процессы, происходящие в клетках в ответ на изменение солевого состава среды, очевидно, являются важными для промышленной биотехнологии, так как позволяют стимулировать направленный синтез хлорофилла, каротинов и внутриклеточного глицерина.

Tolerance of *Dunaliella salina* microalgae cells to low temperatures depending on composition of culture media

Chernobai N. A., Kadnikova N. G.

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, 23 Pereyaslavskaya st., 61016, Kharkiv, Ukraine, fax: +380(57)373-59-52, tel.: +380(57)373-41-43, e-mail: nadiachernobai@gmail.com

.....

Today, cryopreservation is the only reliable method of long-term storage of biological objects of various taxonomic groups. Despite the successes achieved, the freezing of a number of microalgae is still problematic.

Single-cell halophilic algae *D. salina* was used as a test object. They were grown without aeration and the dark phase of illumination in an Artari medium containing 2M sodium chloride or a modified Ramaraj medium (with 1.5 and 4 M NaCl, respectively). It has been established that the culture of *D. salina* microalgae in the stationary phase of growth is more resistant to hypothermia and freezing. Thus, a decrease the temperature of cell suspensions in this growth phase to +10, +4, -10°C and -40°C did not affect the viability of the cells. However, after heating the samples (previously cooled to -40°C) the cell motility decreased by 10–16%.

Carotenogenesis is an adaptive response, ensuring the survival of micro-algae in extreme environmental conditions. When studying the growth dynamics of *D. salina* it was noted that in the stationary phase of growth the pigment composition significantly changes, namely, the content of chlorophylls decreased and carotenoids accumulated. The maximum accumulation of β -carotene in microalgae is induced by an increase of the concentration of sodium chloride in the composition of culture media up to 4 M.

Along with carotenogenesis, with increase of sodium chloride content, *D. salina* cells increase the synthesis of intracellular glycerol, which is a well-known cryoprotectant. Thus, it has been established that natural adaptive reactions to abiotic stresses affect on the tolerance of *D. salina* cells to hypothermia and freezing-warming in the exponential and stationary growth phase, regardless of the composition of culture media.

The processes occurring in the cells in response to a change of the salt composition of the medium are obviously important for industrial biotechnology, since they make it possible to stimulate the targeted synthesis of chlorophyll, carotenes and intracellular glycerol.

Воздействие брассиностероидов на рост и морфологические характеристики клеток протокормов *Phalaenopsis* × *hybridum* Blume в культуре *in vitro*

**Черныш М. А.^{1,*}, Пржевальская Д. А.¹, Горский И. А.¹, Цыбульская Л. А.¹,
Жабинский В. Н.², Хрипач В. А.², Демидчик В. В.¹**

¹ Белорусский государственный университет, биологический факультет, пр-т Независимости, 4, Минск, 220030, Беларусь, факс: +375(17)209-58-08, тел.: +375(17)209-58-84

² Институт биоорганической химии НАН Беларуси, ул. Купревича, 5, Минск, 220141, Беларусь, факс: +375(17)267-87-61, тел.: +375(17)267-87-61

* e-mail: chernyshmaryia@gmail.com

Содержание в среде определенных фитогормонов и их соотношение является ключевым фактором для контроля ростовых процессов и развития растений при культивировании *in vitro*. Наиболее часто используются ауксины и цитокинины, однако в последнее время появились данные, указывающие на возможность применения для биотехнологических манипуляций *in vitro* брассиностероидов (БС) — стероидных регуляторов роста растений, обладающих сильным модифицирующим влиянием на ростовые процессы растений. Однако их влияние на рост культур *in vitro* орхидных к настоящему времени практически не изучено, включая наиболее коммерчески важный род *Phalaenopsis*. Целью настоящей работы было установление характера воздействия на рост и анатомические особенности протокормов *Phalaenopsis* × *hybridum* Blume в культуре *in vitro*. Культура протокормов была получена из семян *Phalaenopsis* × *hybridum* Blume с использованием стандартных асептических подходов. Для прорастания семян использовалась 100% безгормональная среда Fast, модифицированная мезоинозитом (10 мг/л), Na₂EDTA (32 мг/л) / FeSO₄ (28 мг/л), гуматом калия (10 мг/л), пептоном (2 г/л), дрожжевым экстрактом (2 г/л), фруктозой (8 г/л), сахарозой (12 г/л), активированным углем (2 г/л). Протокормы, полученные из первичной культуры, переносились на среды, содержащие БС: брассинолид (БЛ), кастастерон, 24-эпикастастерон, 28-гомокастастерон, 24-эпибрассинолид (ЭБ) и 28-гомобрассинолид в диапазоне концентраций 10⁻¹⁰–10⁻⁶ М и четыре ауксина: индолил-3-уксусная кислота, индолил-3-масляная кислота, 1-нафтилуксусная кислота и 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота в концентрациях 0,1; 0,3 и 1 мг/л для каждого ауксина соответственно. Анализировалось изменение ростовых параметров протокормов и на 100 сутки после переноса на среды с тестируемыми гормонами. В результате проведенных исследований показано, что введение БС в среду культивирования вызывает стимуляцию ростовых процессов у протокормов *Phalaenopsis* × *hybridum* Blume. Наибольшее стимулирующее влияние на рост протокормов и набор биомассы оказывают БЛ и ЭБ. При концентрации БЛ 10⁻⁷ М наблюдалось двукратное увеличение длины протокормов по сравнению с контрольными образцами. Схожее влияние БЛ оказывал на массу растений. Наибольшим стимулирующим воздействием на прирост биомассы обладал ЭБ. При концентрации 10⁻⁷ М данного фитогормона в среде масса растения увеличивалась в 2,7 раза по сравнению с контролем. ЭБ демонстрировал также высокую эффективность по отношению к длине растений. 28-гомокастастерон и 28-гомобрассинолид вызывали наименьшую стимуляцию роста по сравнению с другими исследуемыми БС. Сравнение эффектов БС и ауксинов показало, что стероидные гормоны оказывают более сильное стимулирующее воздействие, чем ауксины. Влияние БС на рост протокормов *Phalaenopsis* сопровождается изменениями размеров и формы паренхимных клеток, что указывает на значительные перестройки процессов роста и развития данной ткани. Средний диаметр клеток, культивируемых на средах, содержащих ЭБ в концентрации 10⁻⁷ М был значительно больше ($V = 5933 \pm 2616 \text{ мм}^3$), по сравнению с контролем ($V = 663 \pm 318 \text{ мм}^3$); форма клеток стала более округлая.

Effects of brassinosteroids on growth and cell morphology of *Phalaenopsis* × hybridum Blume protocorms cultivated *in vitro*

Charnysh M. A.^{1,*}, Przhevalskaya D. A.¹, Horski I. A.¹, Tsybulskaya L. A.¹, Zhabinskii V. N.², Khripach V. A.², Demidchik V. V.¹

¹ Belarusian State University, 4 Nezavisimosti ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus

² Institute of Bioorganic Chemistry NAS of Belarus, 5 Kuprevich st., 220141, Minsk, Republic of Belarus

* e-mail: chernyshmaryia@gmail.com

The content of phytohormones and their concentrations in a medium is the determining factor controlling growth and development of plant cultured *in vitro*. The most commonly used phytohormones are auxins and cytokinins. However, studies carried in the last decade have also demonstrated that brassinosteroids (BRs) has a great potential for application in plant biotechnology including *in vitro* cultures. These hormones mainly target growth, development, sex determination and reproduction. BRs were studied in a number of cultures including crop species and some trees; however, their effects on the growth in conditions *in vitro* of *Orchidaceae*, which are one of the two largest families of flowering plants on the Earth were not tested. The aim of this study was to examine the effect of brassinosteroids on growth and cell morphology of *Phalaenopsis* × hybridum Blume protocorms grown *in vitro*. The aseptic culture of protocorms of *Phalaenopsis* × hybridum Blume was generated from seeds using standard techniques. Seeds were germinated on phytohormone-free 100 % Fast medium, supplemented with sucrose (12 g L⁻¹), fructose (8 g L⁻¹), peptone (2 g L⁻¹), yeast extract (2 g L⁻¹), activated charcoal (2 g L⁻¹), myo-inositol (10 mg L⁻¹), Na₂EDTA (32 mg L⁻¹) / FeSO₄ (28 mg L⁻¹) and potassium humate (10 mg L⁻¹) in the dark conditions. Protocorms were isolated from the primary 30 day-old culture and transferred to the medium containing 10⁻¹⁰–10⁻⁶ M of BRs: brassinolide (BL), castasterone, 24-epicastasterone, 28-homocastasterone, 24-epibrassinolide (EB) and 28-homobrassinolide and four auxins: indol-3-acetic acid, indole-3-butyric acid, 1-naphthaleneacetic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid applied at 0.1, 0.3 and 1 mg L⁻¹ for each auxin, respectively. The change of growth parameters of protocorms was monitored after 100 days of cultivation after transferring to test phytohormone-containing media. These experiments showed that incorporation of BRs to the medium stimulated growth processes of protocorms. BL and EB demonstrated the greatest stimulation on both length and biomass of protocorms. For example, protocorms, grown in presence of 10⁻⁷ M BL, had twice bigger length and biomass that control plants. 28-homocastasterone and 28-homobrassinolide were less effective stimulators among the tested BRs. BR-induced stimulation of growth was compared to similar effects induced by auxins. These comparative tests demonstrated that BRs can cause stronger stimulatory action as compared to auxins. The presence of BRs in the medium triggered changes of size and shape of protocorm parenchyma cells, pointing to fundamental modification of growth and development in this orchid tissue. The average volume of cells cultured on media containing 10⁻⁷ M EB was significantly bigger in BR-treated plants ($V = 5933 \pm 2616 \text{ mm}^3$) comparing to control plants ($V = 663 \pm 318 \text{ mm}^3$). Cells of BR-treated protocorms were also more round in shape than cells of non-treated protocorms.

Протеомика в биотехнологии растений

Чижик О. В.

Центральный ботанический сад НАН Беларуси, ул. Сурганова, 2 в, Минск, 220012, Беларусь,
факс: +375(17) 284-14-84, тел.: +375(17)284-14-74, e-mail: chizhikolga17@gmail.com

В настоящее время протеомика является необходимой методологией в различных сферах клеточной биологии. Эффекты мутаций, различного рода воздействия на живой организм, изменения путей метаболизма, процессы дифференциации и дедифференциации клеток растений можно проследить по изменению уровней биосинтеза и функциональной активности белков. Углубление знаний о структуре белков клеточных ядер остро необходимы для развития клеточной биотехнологии и генетической инженерии, поскольку именно клеточное ядро является основной мишенью такого рода воздействий. Изменения структурного состояния хроматина (переходы транскрипционно активного хроматина — эухроматина — в неактивный компактизированный хроматин — гетерохроматин — и обратно) являются универсальным механизмом регуляции генной активности, в том числе и при дифференциации/дедифференциации клеток.

В отделе биохимии и биотехнологии растений разработаны методические подходы к изучению белков интерфазного клеточного ядра высших растений с использованием системы избирательной экстракции отдельных составных частей ядра (функциональных компартментов). На основе этих подходов изучено изменение белкового состава клеточных ядер растений при естественной экспрессии генома (прорастание) и под воздействием различных факторов (обработка КВЧ-излучением в области коротковолнового миллиметрового диапазона нетепловой интенсивности, препаратов, содержащих наночастицы — элиситоры синтеза БАВ), генетической трансформации, а также в ходе дифференциации и дедифференциации растительной ткани.

При генетической трансформации (встраивании в ДНК ядра табака *ipt*-гена) наблюдается изменение гетерогенности полипептидов в скелетных структурах ядра и кариоплазме. Проведены исследования белковых спектров и экспрессии белков генетически модифицированных линий клюквы крупноплодной (введен ген тауматина II) и исходного генотипа методом 2D-электрофореза.

Осуществляется поиск белковых маркеров для идентификации сортов голубики, что позволит расширить критерии паспортизации этого вида растений. Исследованы электрофоретические спектры солерастворимых (альбуминов и глобулинов) и спирторастворимых (глиадинов) белков семян голубики высокой. Определено, что среди солерастворимых белков существует набор полипептидов, который позволяет различать семена различных сортов голубики.

Выявлены особенности протеома растений голубики высокой на этапах стабилизации *in vitro* культуры при переходе из условий *in vitro* в условия естественного автотрофного питания и протеома исходных растений. Определены белки, претендующие на роль белков-маркеров физиологического состояния голубики высокой, культивируемой *in vivo* и *ex vitro*. Протеомы *in vivo* и *ex vitro* (адаптированных *in vitro* растений) образцов голубики в своей основе идентичны друг другу, однако выделяются зоны с дифференциально экспрессирующимися белками, которые могут рассматриваться как маркеры определенного возраста и состояния тканей голубики высокой.

Впервые для детекции аллергенов плодов применен протеомный анализ. Исследован аллергенный потенциал белорусских и молдавских сортов яблок после хранения и переработки. Методом 1D- и 2D-электрофореза на полученных протеомных картах идентифицированы основные белки-аллергены, содержащиеся в мякоти.

Таким образом, протеомика является необходимой методологией в различных областях биотехнологии.

Proteomics in plant biotechnology

Chizhik O. V.

Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, 2v Surganova st., 220012, Minsk, Republic of Belarus, fax +375(17) 284-14-84, tel.: +375(17)284-14-74, e-mail: chizhikolga17@gmail.com

.....

Proteomics is a necessary methodology in various fields of biotechnology. The effects of mutations, various impacts on the living organism, metabolic pathways alteration, the processes of plant cell's differentiation and dedifferentiation can be retraced by changing of protein's biosynthesis and the functional activity levels.

The improving of knowledges about the cell nuclei proteins structure is essential for cellular biotechnology and genetic engineering development because just the cell nucleus is the main target of such influences. Changes in the structural state of chromatin (transitions of transcriptionally active chromatin — euchromatin — into inactive compact chromatin — heterochromatin and vice versa) are the universal mechanism for gene activity regulating, including the process of cell's differentiation / dedifferentiation.

In the research works of the Department of biochemistry and biotechnology of plants the important place occupies the revelation of protein's heterogeneity and the participation of proteins in a supramolecular complex formation. Proteins play a very important role in the cell nuclei of higher plants functional activity during their expression and modification.

Methodical approaches for the proteins of interphase cellular nucleus studying have been developed: the technique of higher plants interphase cellular nuclei obtaining has been developed, the system of selective extraction of separate constituent parts of the nucleus (functional compartments) has been proposed.

On the base of these approaches the alteration in plant cell nuclei protein's composition has been studied: by the natural genome expression (germination), under the influence of various factors (treatment with short-wave frequency radiation in the short-wave millimeter range of nonthermal intensity, with preparations, containing nanoparticles — elicitors of BAS synthesis), genetic transformation and also during the process of tissue differentiation and dedifferentiation.

Genetic transformation (ipt-gene fusion in nucleus DNA) resulted in changes of polypeptid's heterogeneity in the skeletal structures of the nucleus (matrix) and in the karyoplasm.

We carried out studies of protein spectra and protein expression of genetically modified lines of American cranberries (after the thaumatin II gene fusion) and the initial genotype by 2D-electrophoresis method.

The protein markers searching for blueberry cultivars identification is being carried out. This approach will expand the criteria for high bush blueberry passportization. For this purpose, the electrophoretic spectra of soluble soluble (albumins and globulins) and alcohol soluble (gliadins) blueberry proteins have been studied. Among the soluble blueberry proteins a set of polypeptides which allows to distinguish the seeds of different blueberry varieties has been determined.

The specific features of high bush blueberry proteome at the stages of *in vitro* culture, *ex vitro* (after adaptation) and original plants were revealed, from *in vitro* conditions to conditions of autotrophic nutrition. The potential protein markers of the physiological state of blueberry (*in vivo* and *ex vitro*) have been identified.

It is the first time in Belarus when the allergenic potential of domestic apple cultivars is being investigated by means of proteomic analysis in order to reveal the least allergenic genotypes.

The allergenic potential of Belarusian and Moldavian apples cultivars has been studied after storage and processing. By the method of 1D- and 2D- electrophoresis on the obtained proteomic maps the main proteins-allergens contained in the pulp were identified.

Thus, methods of proteomic analysis are widely used in plant biotechnology.

Растения *Nicotiana tabacum*, экспрессирующие ген «внешней» нефосфорилирующей NADH дегидрогеназы — *ndb2* из *Arabidopsis thaliana* в смысловой и антисмысловой ориентации

Шишлова-Соколовская А. М.¹, Савчин Д. Г.¹, Урбанович О. Ю.¹,
Федосеева И. В.², Боровский Г. Б.²

¹ Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, ул. Академическая, 27, Минск, 220072, Беларусь, +375(17)284-18-56, 284-19-17, e-mail: s_anastasia78@mail.ru

² Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения РАН, ул. Лермонтова, 132, а/я 317, Иркутск, 664033, Россия, тел.: 9(395)042-59-51, e-mail: borovskii@sifibr.irk.ru

Важной особенностью ответной реакции растения на стрессовый фактор является изменение напряженности энергетического обмена. В состоянии стресса в клетках растений начинают функционировать альтернативные (второго типа, или NDII) внешние и внутренние NAD(P)H дегидрогеназы и, как следствие, происходит увеличение транскриптов и количества зрелого белка альтернативной оксидазы, что в свою очередь приводит к коэкспрессии ротенон-нечувствительных НАД(Ф)Н-дегидрогеназ (НАД(Ф)Н-ДГ II типа). У растений арабидопсиса обнаружены три группы NAD(P)H-дегидрогеназ: NDA, NDB и NDC. Точные физиологические функции белков семейства NDII не выяснены. Считается, что последние вместе с альтернативной оксидазой (АОХ) участвуют в формировании нефосфорилирующей дыхательной цепи при окислительном стрессе и подавляют генерации активных форм кислорода. Большой интерес представляет белок NDB2. Физиологические функции данного белка окончательно не выяснены. Предполагается, что ген «внешней» нефосфорилирующей NADH-дегидрогеназы (*ndb2*) посредством изменения количества АФК влияет на функционирование митохондрий, экспрессию генов, вовлеченных в стрессовый ответ, реализацию программы стресс-сигналинга. С целью выяснения роли гена *ndb2* в механизмах устойчивости растений в ответ на стрессовые факторы были созданы генетически модифицированные растения *Nicotiana tabacum*, экспрессирующие ген «внешней» нефосфорилирующей NADH-дегидрогеназы (*ndb2*) из *Arabidopsis thaliana* в смысловой и антисмысловой ориентации. В качестве источника для клонирования нативного гена *ndb2* использовали растения *Arabidopsis thaliana* (экотип Columbia). Используя методы генетического клонирования были созданы векторные конструкции pBI121_NDB2 и pBI121_antiNDB2, несущие ген *ndb2* в смысловой и антисмысловой ориентации под промотором 35S РНК CaMV и *nos* терминатором соответственно. Корректность сборки векторных конструкций подтверждали методом NGS секвенирования на приборе Illumina MiSeq, используя набор Nextera XT DNA. Анализ данных NGS выполняли с помощью программ FastQC, Trimmomatic, SPAdes, UGENE, Vector NTI. С помощью данных конструкций методом агробактериальной трансформации листовых дисков были получены трансгенные растения табака T0, T1 поколений. Используя методы ПЦР и ОТ-ПЦР анализа в трансгенных растениях табака T0, T1 поколений была показана инсерция и транскрипционная активность гена *ndb2* в смысловой и антисмысловой ориентации.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов БРФФИ Б16Р-050 и РФФИ № 16-54-00070.

Nicotiana tabacum plants expressing the gene of “external” non-phosphorylating NADH dehydrogenase — *ndb2* of *Arabidopsis thaliana* in a sense and antisense orientation

Shishlova-Sokolovskaya A. M.¹, Savchin D. G.¹, Urbanovich O. Yu.¹,
Fedoseyeva I. V.², Borovsky G. B.²

¹ Institute of Genetics and Cytology of National Academy of Sciences of Belarus, 27 Akademicheskaya st., Minsk, 220072, Republic of Belarus, tel.: +375(17)284-18-56, 284-19-17, e-mail: s_anastasia78@mail.ru

² Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 132 Lermontov st., P. O. Box 317, 664033, Irkutsk, Russian Federation, tel.: +9395042-59-51, e-mail: borovskii@sifibr.irk.ru

.....

An important feature of the plant response to a stress factor is the change in the intensity of energy metabolism. In the state of stress, alternative (type II or NDII) external and internal NAD(P)H-dehydrogenases start functioning in plant cells and this results in the increased transcripts and number of a mature protein of the alternative oxidase, which in turn leads to co-expression of rotenon-insensitive NAD(P)H-dehydrogenases (NAD(P)HdG type II). In *Arabidopsis* plants, three groups of NAD(P)H-dehydrogenases were identified: NDA, NDB, and NDC. Exact physiological functions of the NDII family proteins are not established. It is believed that the latter along with the alternative oxidase (AOX) are involved in the formation of a non-phosphorylated respiratory chain under oxidative stress and suppress the generation of ROS. Of great interest is the protein NDB2. Physiological functions of this protein are not fully established. It is believed that the gene of the “external” non-phosphorylating NADH-dehydrogenase (*ndb2*) by changing the number of ROS affects mitochondria functioning, the expression of genes involved in the stress response and the stress-signaling program implementation. To determine the role of the *ndb2* gene in plant resistance mechanisms in response to stress factors, genetically modified *Nicotiana tabacum* plants were developed expressing the gene of “external” non-phosphorylating NADH-dehydrogenase (*ndb2*) of *Arabidopsis thaliana* in a sense and antisense orientation. For native *ndb2* gene cloning, *Arabidopsis thaliana* plants (Columbia ecotype) were used as a source. Using the methods of genetic cloning, vector constructs pBI121_NDB2 and pBI121_antiNDB2, carrying the *ndb2* gene in a sense and antisense orientation under the 35S RNA CaMV promoter and the *nos* terminator respectively, were developed. Accuracy of the vector constructs’ assembly was confirmed by the NGS sequencing method on the Illumina MiSeq device using the Nextera XT DNA kit. NGS data analysis was performed using FastQC, Trimmomatic, SPAdes, UGENE, and Vector NTI programs. Using such constructs, the transgenic tobacco plants of T0, T1 generations were developed by the agrobacterial transformation of leaf discs. Using the methods of PCR and RT-PCR analysis in transgenic tobacco plants of T0, T1 generations, the insertion and transcriptional activity of the *ndb2* gene in a sense and antisense orientation was demonstrated.

This work was supported by grants from BRFFR B16R-050 and RFBR No. 16-54-00070.

Особенности клонального микроразмножения и сохранения представителей семейства *Liliaceae* Juss. в культуре *in vitro*

Ширнина И. В.

Главный ботанический сад им. Н. В. Цицина РАН, ул. Ботаническая, 4, Москва, 127276, Россия, тел.: +7(495)619-53-41, e-mail: ishirnina@list.ru

На сегодняшний день для решения задач сохранения и восстановления генофонда растений широкое применение получил метод культуры *in vitro* (Андреев, Горбунов, 2000).

Из всего многообразия представителей семейства *Liliaceae* Juss., включающего 45 родов и около 1300 видов, наиболее широко распространены лилии. Род *Lilium* L. насчитывает около 110 видов.

Целью настоящего исследования является изучение особенностей клонального микроразмножения и сохранения представителей семейства *Liliaceae* Juss. в культуре *in vitro*.

Объекты изучения — виды растений, относящиеся к разным родам семейства *Liliaceae*, в том числе занесенные в Красную книгу РФ.

Исходным материалом для включения таксонов в банк *in vitro* были семена, реже — сегменты вегетативных органов растений.

В ходе исследований для ряда таксонов определены оптимальные режимы стратификации: для представителей рода *Fritillaria* L. (1–1,5 месяца при температуре 20–25°C, 3–4 месяца при 3–5°C, 1–2 месяца при 20–25°C, 3–4 месяца при 3–5°C) и для представителей рода *Lilium* L. (1,5–2 месяца при температуре 20–25°C).

Из 31 вида семейства *Liliaceae* Juss. (рода *Fritillaria* L.), введенного в культуру *in vitro*, проросло 64,5% (20 таксонов). Наибольшее количество проростков отмечено у *Lilium callosum* Siebold et Zucc. (70,0%) и у *Fritillaria caucasica* Adam (84,0%).

Проведенные исследования позволили установить, что для культивирования большинства луковичных культур необходимо высокое содержание фитогормонов. Оптимальной является питательная среда MS, содержащая 10 мг/л 6-БАП и 0,1 мг/л НУК, длительность пассажа на этой среде составляет 90 дней.

Хранение в условиях минимального роста — один из наиболее эффективных способов поддержания коллекций *in vitro* (Николаева и др., 1985, Новикова и др., 2008). При этом основной задачей является сохранение жизнеспособности эксплантов в сочетании с максимальным увеличением длительности субкультивирования (Митрофанова и др., 1995, Ветчинкина и др., 2012). Подобраны оптимальные условия длительного хранения: питательная среда, содержащая ½ MS, 5 мг/л 6-БАП и 0,1 мг/л НУК, длительность пассажа на этой среде составляет около года при температуре 3–5°C в условиях климокамеры.

Таким образом, культуру *in vitro* можно рассматривать как достаточно эффективный метод в системе мер сохранения биоразнообразия *ex situ*.

Features of clonal micropropagation and conservation of representatives of the *Liliaceae* Juss. family. *in vitro*

Shirnina I. V.

Main Botanical Garden named after N. V. Tsitsin of Russian Academy of Sciences, 4 Botanical st., 127276, Moscow, Russian Federation, tel.: +7(495)619-53-41, e-mail: ishirnina@list.ru

.....

To date, the method of *in vitro* culture has been widely used to solve the problems of preserving and restoring the genepool of plants (Andreev, Gorbunov, 2000).

From all the variety of *Liliaceae* Juss. Representatives, including 45 genera and about 1,300 species, lilies are the most widespread species. The genus *Lilium* L. includes about 110 species.

The aim of this research is to study the features of clonal micropropagation and conservation of representatives of *Liliaceae* Juss. *in vitro*.

The objects of study — plant species belonging to different genera of the *Liliaceae* family, including species listed in the Red book of the Russian Federation.

The initial material for the inclusion *in vitro* were seeds, less often—segments of vegetative organs of plants.

During the research, optimal modes of stratification were determined for a number of taxa: for representatives of *Fritillaria* L. genus (1–1.5 months under the temperature of 20–25°C, 3–4 months at 3–5°C, 1–2 months at 20–25°C, 3–4 months at 3–5) and for representatives of the genus *Lilium* L. (1.5–2 months at a temperature of 20–25°C).

Of 31 species of the family *Liliaceae* Juss. (of the genus *Fritillaria* L.), introduced *in vitro*, the percentage of germination was 64.5 (20 taxa). The largest amount of seedlings was noted for *Lilium callosum* Siebold et Zucc. (70.0%) and *Fritillaria caucasica* Adam (84.0%).

The conducted researches allowed to establish that the high content of phytohormones is necessary for cultivation of the majority of bulbous cultures. The MS nutrient medium containing 10 mg / l 6-BAP and 0.1 mg / l NUK is the most optimal one, the duration of cultivation on this medium is 90 days.

Storage under conditions of minimal growth is one of the most effective ways to maintain *in vitro* collections (Nikolayeva et al., 1985, Novikova et al., 2008). The main goal is to preserve the viability of explants combined with a maximum increase in the duration of subcultivation (Mitrofanova et al., 1995, Vetchinkina et al., 2012). Optimal conditions for long-term storage: a nutrient medium containing ½ MS, 5 mg/l 6-BAP and 0.1 mg/l NAA, the duration of passage in this medium under the temperature of 3–5°C in terms of klimataria is about a year .

Thus, *in vitro* culture can be considered as a rather effective method in the system of biodiversity conservation measures ex situ.

Изучение каллусообразующей способности различных эксплантов картофеля *Solanum tuberosum* L.

Швидченко В. К.¹, Киргизова И. В.², Гаджимурадова А. М.³

¹ *Казахский агротехнический университет им. С. Сейфуллина, пр-т Победы, 62, Астана, 010011, Казахстан, тел.: +7(7172)31-75-47, e-mail: Shvidchenko50@mail.ru*

² *Омский государственный технический университет, пр-т Мира, 11, Омск, 644050, Россия, тел.: +7(381)265-34-07, e-mail: irina.kz-89@mail.ru*

³ *Евразийский национальный университет им. Л. Н. Гумилева, ул. Сатпаева, 2, Астана, 010008, тел.: +7(7172)70-95-00, e-mail: aisarat3878@mail.ru*

Особенности процессов образования каллусов изучали на сортах картофеля казахстанской селекции 'Альянс', 'Нарли', 'Тохтар', российской селекции 'Ермак', 'Жуковский ранний', 'Сентябрь', а также зарубежной селекции 'Ред Скарлетт', 'Импала', 'Розара'. Индуцирование каллусной ткани проводили из клубневых дисков картофеля размером 6–7 мм сосудисто-камбиального кольца клубня, ориентированных базальной и верхушечной плоскостью, стеблевых и листовых эксплантов на агаризованную питательную среду по прописи минерального состава Мурасиге-Скуга (МС). Питательные среды для формирования каллусных культур отличались различными концентрациями фитогормонов: кинетина (0,25–1,0 мг/л) и 2,4-Д (1–6 мг/л). В качестве контроля была использована безгормональная питательная среда по прописи МС. Культивирование эксплантов осуществлялось в условиях круглосуточного освещения при 5000 лК, а также в условиях полной темноты, при температуре 25±20 °С и относительной влажности воздуха 70–80 %.

В результате экспериментов установлено, что образование каллусов у большинства изучаемых сортов картофеля наблюдалось на 10–14 сутки после высадки эксплантов на питательные среды с содержанием фитогормонов 2,4-Д (4–5 мг/л) и кинетина (0,25–0,5 мг/л). При сравнении с контрольным вариантом питательной среды, на большинстве вариантах сред с внесением фитогормонов наблюдалось начало индукции относительно плотного каллуса в виде ярко-желтых и светло-желтых клеточных структур различной величины. Каллусогенез эксплантов, культивируемых в условиях темноты на средах с содержанием ауксинов и цитокининов, характеризовался разрывом поверхности культивируемых дисков, а так же обильным разрастанием каллусной ткани. При культивировании эксплантов картофеля в условиях освещенности каллус характеризовался наличием белого налета на поверхности клубневых дисков и формированием мелких глобулярных структур по периферии экспланта. В ходе экспериментов установлено, что способность к каллусообразованию у листовых эксплантов наблюдалась выше (75–80 %), по сравнению со стеблевыми эксплантами (25 %) у всех изучаемых сортов картофеля. Отмечено, что у сортов картофеля 'Жуковский ранний', 'Ред Скарлетт', 'Ермак', 'Альянс' стеблевые экспланты индуцировали каллус на 8–10 сутки культивирования до 62 %, а листовые экспланты — на 12 сутки культивирования до 85 %, сорта 'Сентябрь', 'Нарли' индуцировали каллусы на 14 сутки культивирования из стеблевых эксплантов до 60 %, на 14–16 сутки культивирования листовых эксплантов до 80 %. Интенсивный процесс каллусообразования наблюдался на 22–25 сутки культивирования.

Studying of the callus-forming ability of various potato (*Solanum tuberosum* L.) explants

Shvidchenko V. K.¹, Kirgizova I. V.², Gajimuradova A. M.³

¹ S. Seifullin Kazakh Agrotechnical University, 62 Zhenys Ave., 010011, Astana, tel.: +7(7172)31-75-47, e-mail: Shvidchenko50@mail.ru

² Omsk State Technical University, 11 Mira ave., 644050, Omsk, Russian Federation, tel.: +7(381)265-34-07, e-mail: irina.kz-89@mail.ru

³ L. N. Gumilyov Eurasian National University, 2 Satpaev st., 010008, Astana, tel.: +7(7172)70-95-00, e-mail: aisarat3878@mail.ru

Features of the callus processes formation studied on the Kazakhstan selection potato varieties 'Alliance', 'Narli', 'Tokhtar' and on the Russian selection 'Ermak', 'Zhukovsky rannii', 'Sentaybr', as well as on the foreign selection varieties 'Red Scarlett', 'Impala', 'Rosara'. Induction of callus tissue is conducted from the potato tuber disks size 6–7 mm of vascular cambial ring tuber, oriented by basal and apical plane, from stem and leaf explants on agar medium by the prescription mineral composition of Murashige and Skoog (MS). Nutrient media for the formation of callus cultures with different concentrations of phytohormones: kinetin (0.25–1.0 mg/l) and 2,4-D (1–6 mg/l) was used [1]. As a control, a hormone-free nutrient medium was used according to the MS designation. Cultivation of explants was carried out under conditions of round-the-clock illumination at 5000 lx, as well as in conditions of complete darkness, at a temperature of 25±20°C and relative humidity of 70–80%.

The result of the experiments found that the formation of callus most studied potato varieties was observed at day 10–14 after planting explant on a culture medium containing phytohormones 2,4-D (4.5 mg/l) and kinetin (0.25–0.5 mg/l). When compared with control variant of the nutrient medium, in most variants of media with phytohormones was observed beginning of callus induction relatively dense as a bright yellow and light yellow cellular structures of various sizes. Callusogenesis of explants, cultured under dark conditions on media containing auxin and cytokinin, characterized by a break surface cultured discs, as well as an abundant growth of callus tissue. During the cultivation of potato explants under conditions of illumination, the callus was characterized by the presence of a white coating on the surface of the tuber discs and the formation of small globular structures along the explant periphery. The experiments revealed that the ability to callus from leaf explants was observed higher (75–80%), compared to stem explants (25%) in all potato varieties studied. It is noted that the varieties of potatoes 'Zhukovsky rannii', 'Red Scarlett', 'Ermak', 'Alliance' stem explants induced callus on the 8–10 days of cultivation to 62% and leaf explants — to 12 days of cultivation to 85% grade 'Sentaybr', 'Narly' induced callus on the 14th day of cultivation from stem explants to 60%, on the 14–16th day of cultivation of leaf explants to 80%. An intensive process of callus formation was observed on the 22–25th day of cultivation.

Генетически трансформированные растения томата, табака и наперстянки в изучении стероидных гормональных систем и перспективы их использования в агробιοтехнологии и фармакологии

Шпаковский Г. В.¹, Бабак О. Г.², Халилуев М. Р.³, Бердичевец И. Н.², Баранова Е. Н.³, Кубрак С. В.², Клыков В. Н.¹, Словохотов И. Ю.¹, Шпаковский Д. Г.¹, Шематорова Е. К.¹, Спивак С. Г.^{2,4}, Кильчевский А. В.²

¹ Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, ул. Миклухо-Маклая 16/10, Москва, ГСП-7, 117997, Россия, тел.: +7(495)330-65-83, e-mail: gvs@ibch.ru

² Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, ул. Академическая, 27, Минск, 220072, Беларусь, тел.: +375(17)284-19-16, e-mail: babak_olga@mail.ru

³ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, ул. Тимирязевская, 42, Москва, 127550, Россия, тел.: +7(495)976-83-11, e-mail: marat131084@rambler.ru

⁴ Белорусский государственный медицинский университет, пр-т Дзержинского, 83, Минск, 220116, Беларусь, тел.: +375(17)296-35-15, e-mail: sve_spivak@mail.ru

Начальная стадия биосинтеза стероидных гормонов у животных происходит в митохондриях стероидогенных тканей, где цитохром P450SCC (side chain cleaving), кодируемый геном *CYP11A1*, катализирует отщепление боковой цепи холестерина с превращением его в прегненолон — общий предшественник всех стероидных гормонов животных, начиная с прогестерона. Этот первый этап биохимической трансформации стероидов (реакции 22- и 20-гидроксилирования и расщепления связи C20-C22 с удалением боковой цепи) не может быть в точности повторен в растениях, поскольку гены, кодирующие митохондриальные цитохромы P450 (клан 'mito CYP'), в их геномах до сих пор не обнаружены. Для более детального сравнения стероидогенных систем Plantae и Animalia, мы впервые получили и всесторонне охарактеризовали трансгенные растения табака *Nicotiana tabacum* L., наперстянки *Digitalis purpurea* L. и томата *Solanum lycopersicum* L., эффективно экспрессирующие кДНК *CYP11A1* из коры надпочечников быка, доказав, что даже самые эволюционно отдаленные компоненты стероидогенных систем животных и растений функционально совместимы *in vivo*. Изучение пяти поколений трансгенных растений табака показало, что в сравнении с растениями дикого типа они имеют сокращенный период вегетативного развития (раннее цветение и созревание семян), увеличенную биомассу и повышенную продуктивность (количество и качество семян), а также повышенный иммунитет к таким фитопатогенам, как *Botrytis cinerea*. Экспрессирующие кДНК *CYP11A1* трансгенные растения томата, хоть и имеют проблемы в генеративной сфере (низкая завязываемость плодов и пониженное количество семян в них), также отличаются скороспелостью, устойчивостью к абиотическим стрессам (засуха, засоление) и таким фитопатогенам, как *Cladosporium fulvum* (трансгенная линия № 4) и *Botrytis cinerea* (трансгенная линия № 7). Изменяется и метаболизм трансгенных растений наперстянки пурпурной: нами показано, что в них повышается синтез кардиотонических стероидных гликозидов (как первичных, так и вторичных).

Установлено, что в трансгенных растениях синтезируется прегненолон, а содержание в них прогестерона примерно в пять раз превышает его количество в растениях дикого типа. Все эти данные указывают на то, что вдобавок к хорошо известным brassinosterоидам, у растений функционирует и другой, более древний путь стероидной гормональной регуляции, а прогестерон можно считать одним из древнейших биорегуляторов растительных клеток и даже, пожалуй, первым настоящим гормоном, общим для растений и животных. Полученные результаты свидетельствуют о едином эволюционном происхождении путей биосинтеза стероидных соединений и систем стероидного регулирования у растений и животных и могут быть использованы в новых биотехнологиях для сельского хозяйства и фармакологии.

Genetically transformed plants of tomato, tobacco and *Digitalis* in the study of steroid hormonal systems and prospects of their use in agrobiotechnology and pharmacology

**Shpakovski G. V.¹, Babak O. G.², Khaliluev M. R.³, Berdichevets I. N.²,
Baranova E. N.³, Kubrak S. V.², Klykov V. N.¹, Slovokhotov I. Yu.¹,
Shpakovski D. G.¹, Shematorova E. K.¹, Spivak S. G.^{2,4}, Kilchevsky A. V.²**

¹ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 16/10 Miklukho-Maklaya st., 117997, Moscow, GSP-7, Russian Federation, tel.: +7(495)330-65-83; e-mail: gvs@ibch.ru

² Institute of Genetics and Cytology of National Academy of Sciences of Belarus, 27 Akademicheskaya st., Minsk, 220072, Republic of Belarus, tel.: +375(17)284-19-16; e-mail: babak_olga@mail.ru

³ All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, 42 Timiriazevskaya st., 127550, Moscow, Russian Federation, tel.: +7(495)976-83-11 e-mail: marat131084@rambler.ru

⁴ Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus. 220116 Minsk, pr. Dzerzhinskogo 83, tel.: +375(17)296-35-15; e-mail: sve_spivak@mail.ru

The initial stage of steroid hormones' biosynthesis in animals occurs in the mitochondria of steroidogenic tissues, where cytochrome P450 scc (side chain cleaving) encoded by the *CYP11A1* gene catalyzes the side chain cleavage of cholesterol with its transformation into pregnenolone — a common precursor of all steroid hormones in animals, starting with progesterone. The similar 22- and 20-hydroxylations and the subsequent C20-C22 side chain cleavage of phytosterols (b-sitosterol, campesterol, stigmasterol, cholesterol) can not be exactly repeated in plants, as genes encoding mitochondrial cytochrome P450 ('mito CYP' clan) in their genomes are still not found. For a more detailed comparison of steroidogenic systems of Plantae and Animalia, we have obtained and comprehensively characterized transgenic tobacco *Nicotiana tabacum* L., foxglove *Digitalis purpurea* L., and tomato *Solanum lycopersicum* L. plants, effectively expressing *CYP11A1* cDNA from the bovine adrenal cortex — for the first time proving that even the most evolutionarily distant components of steroidogenic systems of plants and animals are functionally compatible *in vivo*.

The study of five generations of transgenic tobacco plants showed that in comparison with wild-type plants, they have a shortened period of vegetative development (early flowering and maturation of bolls), enlarged biomass and higher productivity (quantity and quality of seeds), as well as increased immunity to such phytopathogen as *Botrytis cinerea*. Efficient expression of *CYP11A1* cDNA in transgenic tomato plants, although produced some problems in their generative sphere (lower fruit formation with often lesser seeds in them), has also induced plants' precocity, resistance to abiotic stresses (drought, salinity) and enhanced immunity to such phytopathogens as *Cladosporium fulvum* (transgenic line No. 4) and *Botrytis cinerea* (transgenic line No. 7). There are also subtle changes in metabolism of *Digitalis purpurea* transgenic plants: we have shown that they increase the biosynthesis of cardiostonic steroid glycosides (both primary and secondary).

It is established that pregnenolone is synthesized in all aforementioned transgenic plants, and the content of progesterone in them is about five times higher than its quantity in the wild-type plants. Taken together, all these data indicate that in addition to already well-known brassinosteroids, yet another, more ancient pathway of steroid hormonal regulation operates in plants, and progesterone can be considered as one of the most ancient bioregulator of plant cells and even, perhaps, the first real hormone common to plants and animals. The results obtained testify to the common evolutionary origin of the steroids' biosynthesis pathway and steroid regulation systems in plants and animals, and can be used in new biotechnologies for agriculture and pharmacology.

Оптимизация индукции соматического эмбриогенеза сосны сибирской (*Pinus sibirica*) в культуре *in vitro*

Шуклина А. С.

Институт леса им. В. Н. Сукачева Сибирского отделения РАН — обособленное подразделение
ФИЦ КНЦ СО РАН, Академгородок 50, стр. 28, Красноярск, 660036, Россия,
факс: +7(391)243-36-86, тел.: +7(391)249-46-25, e-mail: Alla.saymova@yandex.ru

Эмбриогенные культуры рода *Pinus* получены *in vitro* у 34 видов, из которых половина были доведены до стадии регенерантов. Сосна сибирская или кедр сибирский (*Pinus sibirica* Du Tour) — вид сосен подрода *Strobus* (пятихвойные сосны) является трудноразмножаемым видом и поэтому требует разработки биотехнологии.

Для введения в культуру *in vitro* производили сбор шишек сосны сибирской в разных районах Красноярского края в первую декаду июля: на клоновых плантациях деревья в возрасте 25 лет, из естественного древостоя — в возрасте 40–250 лет, а также деревья «акселераты» с однолетним циклом развития женских шишек. Для индукции соматического эмбриогенеза мегастробилы подвергались холодовой обработке (при t 3–5 °С) в течение 1–3 недель. В качестве эксплантов использовали зиготические зародыши на стадии инициации семядолей. Всего было введено в культуру около 685 зиготических зародышей с 22 деревьев.

Для индукции соматического эмбриогенеза использовались две различные среды: базовая питательная среда $\frac{1}{2}$ LV, дополненная сахарозой (30 г/л), казеином (0,5 г/л), мезоинозитом (1 г/л) глутамином (1 г/л) и аскорбиновой кислотой (0,3 г/л) и базовая питательная среда DCR, дополненная сахарозой (30 г/л), казеином (1 г/л), мезоинозитом (0,100 г/л), глутамином (0,5 г/л) и аскорбиновой кислотой (0,3 г/л). В качестве регуляторов роста для обеих сред использовали различные комбинации гормонов: 2,4-D и 6-БАП в концентрациях 2 мл/л и 1 мл/л соответственно; ИУК и 6-БАП в концентрациях 2 мл/л и 1 мл/л; 2,4-D, 6-БАП и кинетин в концентрациях 5 мл/л : 2 мл/л : 2 мл/л соответственно. Кроме того в ряде вариантов в базовые среды добавляли абсцизовую кислоту (10 мг/л). рН среды доводили до 5,7 перед автоклавированием. Для пролиферации полученного каллуса использовали питательные среды $\frac{1}{2}$ LV и DCR с пониженным содержанием сахарозы (20 г/л) и 6-БАП (0,5 г/л).

Результаты исследования показали, что при введении в культуру *in vitro* эксплантов в области зародышевого корешка наблюдалось образование каллуса на 4–10 сутки культивирования. Из 685 эксплантов каллус был индуцирован у 50 % зародышей.

Образование каллуса происходило у эксплантов на средах с комбинацией гормонов 2,4-D и 6-БАП. У эксплантов на средах с добавлением АБК наблюдалось разрастание семядолей зародыша, а каллусообразования не происходило. Индукция каллуса на варианте сред с комбинацией гормонов 2,4-D : БАП: кинетин происходила у единичных эксплантов и каллус через 1 месяц отмирал. На стадию пролиферации вышли экспланты, введенные в культуру на среде DCR с комбинацией гормонов 2,4-D и 6-БАП.

Таким образом, было выявлено, что успешная индукция соматического эмбриогенеза сосны сибирской идет на среде DCR с комбинацией гормонов 2,4-D и 6-БАП в концентрациях 2 мл/л и 1 мл/л, на которой впервые получены глобулярные зародыши. Несколько клеточных линий сохраняют жизнеспособность и успешно продуцируют соматические зародыши в течение двух лет.

Исследование выполнено при поддержке краевого государственного автономного учреждения «Красноярский краевой фонд поддержки научной и научно-технической деятельности» в рамках участия в мероприятии: «XI международная конференция “Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология”» и при поддержке гранта РФФИ № 18-54-00010.

Optimization of somatic embryogenesis induction of siberian pine (*Pinus sibirica*) in culture *in vitro*

Shuklina A. S.

Federal Research Center, Krasnoyarsk Scientific Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Special Department of the Forest Institute, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, 50/28 Akademgorodok, 660036, Krasnoyarsk, Russian Federation, fax: +7(391)243-36-86, tel.: +7(391)249-46-25, e-mail: Alla.saymova@yandex.ru

.....

Embryogenic cultures in the genus *Pinus* were obtained *in vitro* in 34 species, half of which were brought to the stage of regenerants. Siberian pine (*Pinus sibirica* Du Tour) is recalcitrant species of pines genus of the *Strobilus* subgenus (five-needle), therefore requires the development of biotechnology.

For inoculation, Siberian pine cones were collected in different regions of the Krasnoyarsk Territory in the first decade of July: trees age of 25 years in the clonal plantations, trees age of 40–250 years from a natural stand, as well as “accelerated” trees with a one-year cycle development of female cones. To induce somatic embryogenesis, megastrobils underwent cold treatment (at 3–5°C) for 1–3 weeks. Zygote embryos were used as explants at the stage of cotyledon initiation. In total, about 685 zygotic embryos from 22 trees were introduced into the culture. Two different media were used to induce somatic embryogenesis: a basic nutrient medium ½ LV supplemented with sucrose (30 g/l), casein (0.5 g/l), meso-inositol (1 g/l) glutamine (1 g/l) and ascorbic acid (0.3 g/l) and the basic nutrient medium DCR supplemented with sucrose (30 g/l), casein (1 g/l), mesoinositol (0.100 g/l), glutamine (0.5 g/l) and ascorbic acid (0.3 g/l). As growth regulators for both media, various combinations of hormones were used: 2,4-D and 6-BAP at concentrations of 2 mL/l and 1 mL/l, respectively; IAA and 6-BAP in concentrations of 2 mL/l and 1 mL/l; 2,4-D, 6-BAP and kinetin, in concentrations of 5 mL/l : 2 mL/l : 2 mL/l, respectively. In addition, abscisic acid (10 mg/l) was added to base media in a number of versions. pH of the medium was adjusted to 5.7 before autoclaving. For the proliferation of the obtained callus 1/2 LV and DCR nutrient media with a reduced sucrose content (20 g/l) and 6-BAP (0.5 g/l) were used.

The results of the study showed that when explants were inoculation, the formation of callus was observed in the site of the embryonic root on the 4th–10th day of cultivation. Callus was induced in 50 % of the embryos of the 685 explants. Callus formation occurred in explants on media with a combination of hormones 2,4-D and 6-BAP. The cotyledons of the embryo were growing, but callus formation did not occur in explants on media with ABA. Induction of callus in the case of media with a combination of hormones 2,4-D: BAP: kinetin occurred in single explants and callus after 1 month died off. Explants induced on DCR medium with the combination of hormones 2,4-D and BAP continue to proliferate.

Thus, it was found that the successful induction of somatic embryogenesis of Siberian pine takes place on a DCR medium with the combination of hormones 2,4 D and 6-BAP at concentrations of 2 mL/l and 1 mL/l, at this medium globular embryos were first obtained. Several cell lines remain viable and successfully produce somatic embryos within two years.

The reported study was funded by Krasnoyarsk Regional Fund of Science and Technology Support according to the participation in the event “XI international conference “Biology of plant cells *in vitro* and biotechnology” and was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project No. 18-54-00010.

Клеточная технология создания сортов ячменя с комплексной устойчивостью к ионной токсичности металлов и засухе

Шуплецова О. Н.

НИИСХ Северо-Востока, Киров, Россия

Вятский государственный университет, Киров, Россия, e-mail: olga.shuplecova@mail.ru,
.....

В рамках технологии разработаны селективные системы *in vitro* для отбора соматклонов ячменя (*Hordeum vulgare* L.), устойчивых к комплексному эдафическому стрессу: токсичности ионов H^+ , Al^{3+} , Cd^{2+} и водному дефициту. Выявлены оптимальные параметры отбора каллусных линий: более отзывчивый и менее уязвимый для селективных факторов этап онтогенеза каллусной ткани, критические концентрации селективных агентов в среде, сопутствующие анионы, уровень кислотности среды. Определены общие закономерности при разработке селективных схем: создание более благоприятных условий для отбора каллусных культур при последовательном внесении селективных агентов на этапе пролиферации и морфогенеза по сравнению с одновременным их применением. Отмечено повышение уровня выживаемости и регенерационной способности генотипа в комплексных селективных системах при его повторном введении в культуру *in vitro*. Изучены проявления соматклональной изменчивости в каллусной культуре ячменя на физиологическом, биохимическом и цитологическом уровнях. Выявлено, что применение клеточной селекции более эффективно для чувствительных к стрессу генотипов. Отмечены эффекты кросс-адаптации на уровне изолированной ткани и регенерантных растений. Использование разработанных селективных систем позволило изменить существующие генотипы в следующих направлениях: снижение оксидативного стресса, активизация фотосинтеза, повышение эффективности водного обмена и продуктивности растений.

Получено более тысячи соматклонов ячменя, индуцированных 98 различными генотипами. Проведена комплексная оценка семенного потомства регенерантных линий на всех этапах селекционного процесса. На формирование количественных признаков регенерантов оказывали влияние как генотип исходного растения, так и схема отбора. Преимущество регенерантов относительно исходных сортов проявлялось на стрессовых фонах. Установлено, что в зависимости от генотипа достоверное изменение количественных признаков регенерантных растений может происходить в результате проведения селективного отбора различной жесткости и в его отсутствие. Однако вероятность проявления соматклональной изменчивости в отсутствие стресса достаточно низкая и не поддается прогнозированию. Устойчивость регенерантных растений к токсичности кислых почв обусловлена высокой средообразующей активностью корневой системы, активированной в процессе клеточной селекции. Показатель подщелачивания в зоне ризосферы регенерантов в стрессовых условиях вегетационных опытов коррелировал с показателем — массы зерна с растения ($r = 0,908$ при $p > 0,95$).

По итогам конкурсных испытаний регенерантные линии ячменя 917-01 и 496-07 получили статус сортов с названием 'Форвард' и 'Бионик'. Имеются патенты на селекционные достижения. В условиях эдафического стресса (рН 3,8–4,5; Al^{3+} 0,5–9,6 мг/100 г почвы) — урожайность сорта 'Форвард' достигала 5,5 т/га, 'Бионик' — 6,6 т/га, превышение над стандартом 113–128 %.

Cell technology to create barley varieties with complex resistance to ion toxicity of metals and drought

Shupletsova O. N.

North-East Agricultural Research Institute, Kirov, Russia,

Vyatka State University, Kirov, Russia, e-mail: olga.shupletsova@mail.ru

The technology developed selective *in vitro* systems for the selection of barley (*Hordeum vulgare* L.), somaclones resistant to complex edaphic stress: toxicity of H⁺ ions, Al³⁺, Cd²⁺ and water deficiency. The optimal parameters of selection of callus lines are revealed: a more responsive and less vulnerable to selective factors stage of ontogenesis of callus tissue, critical concentrations of selective agents in the medium, concomitant anions, the level of acidity of the medium. The General regularities in the development of selective schemes: the creation of more favorable conditions for the selection of callus cultures with the sequential introduction of selective agents at the stage of proliferation and morphogenesis, compared with their simultaneous application. The increase in the level of survival and regenerative capacity of the genotype in complex selective systems with its repeated introduction into the culture *in vitro* was noted. Manifestations of somaclonal variability in barley callus culture at physiological, biochemical and cytological levels were studied. It is revealed that the use of cell selection is more effective for stress-sensitive genotypes. The effects of cross-adaptation at the level of isolated tissue and regenerative plants are noted.

In the course of many-year experiments on media with different combinations of selective agents, more than a thousand somaclones of barley induced by 98 different genotypes were obtained. Conducted complex evaluation of the seed progeny regenerant lines at all stages of the breeding process.

Use of the developed selective systems allowed to change the existing genotypes in the following directions: reduction of oxidative stress, activation of photosynthesis, increase of efficiency of water exchange and productivity of plants.

On the formation of quantitative characteristics of regenerants, had a significant effect the genotype of the original plants and the selection scheme. The advantage of regenerants with respect to the original varieties was shown to a greater extent on stressful backgrounds compared to the control. It is established that depending on the genotype, a significant change in the quantitative signs of regenerative plants can occur as a result of selective sampling of various stiffness and in its absence. However, the probability of somaclonal variability in the absence of stress is quite low and can not be predicted.

An important component in the mechanism of resistance of regenerative plants to the toxicity of acidic soils is the high environmental activity of the root system, activated during cell selection. The indicator of leaching in the zone of the regenerant rhizosphere under stressful conditions of vegetation experiments correlated with the productive indicator — grain weight from the plant ($r = 0.908$ at $p > 0.95$).

According to the results of competitive tests, regenerative barley lines 917-01 and 496-07 received the status of varieties called 'Forward' and 'Bionic'. There are patents for selection achievements. Under conditions of edaphic stress (pH 3.8–4.5; Al³⁺ 0.5–9.6 mg/100 g soil) including in drought conditions variety 'Forward' has productivity up to 5.5 t/ha, variety 'Bionic' — 6.6 t/ha that is 113–1285 higher than standard.

Генетическая трансформация для улучшения питательной ценности зернового сорго

Эльконин Л. А., Итальянская Ю. В., Панин В. М.

Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Юго-Востока, ул. Тулайкова, 7, Саратов, 410010, Россия, тел./факс: +7(8452)64-76-88, e-mail: lelkonin@gmail.com

.....

Генетическая трансформация является одним из наиболее эффективных способов генетического улучшения растений. Введение искусственно созданных генетических конструкций в геном растений позволяет менять их метаболизм, в том числе, регулировать накопление разных классов запасных белков. Это направление имеет особую актуальность для сорго — высокоурожайной засухоустойчивой злаковой культуры, отличающейся более низкой, по сравнению с другими злаками, питательной ценностью зерна, в основе которой лежит устойчивость его запасных белков (кафиринов) к действию протеаз. Нами ранее посредством агробактериальной трансформации были получены трансгенные растения сорго, несущие генетическую конструкцию для РНК-сайленсинга гена гамма-кафирина — проламина, располагающегося по периферии белковых телец клеток эндосперма и препятствующего перевариванию основных запасных белков сорго — альфа-кафиринов. Было обнаружено, что полученные трансгенные растения характеризуются значительно улучшенной перевариваемостью запасных белков зерна в системе *in vitro*, повышенным содержанием лизина (в 1,6–1,7 раза), а также модифицированной структурой эндосперма, отличающегося полной или частичной редукцией стекловидного слоя. Целью дальнейших исследований являлось изучение стабильности наследования и экспрессии данных признаков у потомства (поколения Т3–Т4). Выявлено, что перевариваемость белков эндосперма у растений из трех изученных семей поколения Т4 достигает 85–90 % (против 52–53 % у исходной нетрансгенной линии Желтозерное 10). Установлено, что данный признак проявляется у растений, выращиваемых как в тепличных условиях, так и в естественных условиях внешней среды. Однако при выращивании в условиях опытной грядки различия между исходной линией и потомством трансгенных растений были менее выражены. Уровень перевариваемости также сильно различался у зерновок, завязавшихся на разных метелках одного и того же растения. Полученные результаты свидетельствуют, что функционирование механизма РНК-сайленсинга, обусловливаемого введенной генетической конструкцией, в значительной мере подвержено воздействию эпигенетических факторов, варьирующих, в том числе, от условий выращивания растений. В одной из изученных семей высокая перевариваемость сочеталась с уменьшенной массой зерновок (в 3 раза, по сравнению с исходной линией). Выявлены растения, у которых высокая перевариваемость кафиринов сочеталась с формированием модифицированного эндосперма, в котором стекловидный слой был представлен в виде тонкого «серпика». Зарегистрированы факты элиминации маркерного гена *bar* при сохранении в генотипе конструкции для РНК-сайленсинга гамма-кафирина. Данный факт свидетельствует о возможности получения агрономически ценных линий сорго с высокой перевариваемостью кафиринов.

Genetic transformation for improvement of the nutritional value of grain sorghum

Elkonin L. A., Italianskaya Yu. V., Panin V. M.

Agricultural Research Institute of South-East Region, 7 Tulaikov st., 410010, Saratov, Russian Federation, tel./fax: +7(8452)64-76-88, e-mail: lelkonin@gmail.com

.....

Genetic transformation is one of the most effective methods of plant genetic improvement. The introduction of artificial genetic constructs into the plant genome allows to change their metabolism, in particular, to regulate the accumulation of different classes of seed storage proteins. This approach is of particular relevance for sorghum — a high-yielding drought-resistant cereal crop, which is characterized by a lower nutritional value of the grain, in comparison with other cereals. The main reason of lower nutritional value of sorghum grain is the resistance of its seed storage proteins, kafirins, to protease digestion. Earlier, by *Agrobacterium*-mediated genetic transformation, we obtained transgenic sorghum plants carrying a genetic construct for the RNA-silencing of the gamma-kafirin gene. Gamma-kafirin located on the periphery of the protein bodies of endosperm cells and prevents the digestion of the main sorghum storage proteins, alpha-kafirins. It was found that these transgenic plants are characterized by significantly improved *in vitro* kafirin digestibility, increased lysine content (by 1.6–1.7 times), and modified endosperm that characterized by complete or partial reduction of the vitreous layer. The aim of further studies was to investigate the stability of inheritance and expression of these traits in the progeny of transgenic plants (T3-T4 generation). It was revealed that *in vitro* protein digestibility in plants from three studied families of the T4 generation reaches 85–90 % (versus 52–53 % in the original non-transgenic line Zheltozernoe 10). It was established that this trait is manifested in plants grown both in greenhouse conditions and in the natural environment. However, when growing under experimental plots, the differences between the original line and offspring of transgenic plants were less pronounced. The level of *in vitro* protein digestibility also varied between kernels from different panicles of the same plant. These results indicate that the functioning of the RNA-silencing mechanism caused by the introduced genetic construct is to a large extent subject to the influence of epigenetic factors, including, in particular, the conditions of plants growing. In one family, high digestibility was combined with a reduced kernel mass (3 times, compared with the original line). The plants were found in which the high digestibility of kafirins is combined with the formation of a modified endosperm, in which the vitreous layer resembling a thin “sickle”. The facts of elimination of the marker *bar* gene have been registered, while the construct for gamma-kafirin silencing has been inherited stably. These data indicate the possibility of obtaining of agronomically valuable sorghum lines with high digestibility of kafirins.

Технология получения линий с повышенным содержанием ценных фармакологически активных соединений на основе иммобилизованных клеток лекарственных растений

Юрин В. М.¹, Дитченко Т. И.¹, Молчан О. В.², Филиппова С. Н.¹

¹ Белорусский государственный университет, биологический факультет, пр-т Независимости, 4, Минск, 220030, Беларусь, тел./факс: +375(17)209-58-50, e-mail: yurin@bsu.by

² Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси, ул. Академическая, 27, Минск, 220072, Беларусь, тел./факс: +375(17)284-20-12, e-mail: olga_molchan@mail.ru

Культуры *in vitro* исследуемых растений (*Echinacea purpurea*, *Catharanthus roseus*, *Vinca minor*) могут быть альтернативным экологически чистым сырьем для производства лекарственных субстанций. В условиях *in vitro* растительные клетки могут сохранять способность интактного растения к синтезу широкого спектра вторичных метаболитов. Однако одним из недостатков клеточных культур зачастую является низкий выход целевого продукта. Разработка приемов и подходов, основанных на использовании методов иммобилизации, позволяет значительно повысить продуктивность суспензионных культур, на которых основано биотехнологическое получение экономически важных фармакологически активных веществ.

В результате проведенных исследований установлены закономерности продукции ряда соединений иммобилизованными в гранулы Са-альгинатного геля клетками суспензионных клеточных культур, а также их экскреция в питательную среду. Показано, что проведение процедуры иммобилизации наиболее целесообразно для клеток гетеротрофной культуры, в которой при стандартном варианте культивирования накопление вторичных метаболитов, в частности, фенольной природы, находится на невысоком уровне. С целью наработки биомассы культивируемых *in vitro* клеток с высоким удельным содержанием фармакологически ценных соединений наиболее эффективным подходом является двухстадийное культивирование суспензионной культуры в накопительном режиме: первый этап заключается в создании условий для роста клеток, для чего может быть использована стандартная питательная среда Мурасиге-Скуга, содержащая фитогормоны из группы ауксинов (2,4-Д, ИУК) и цитокининов (кинетин); для второго этапа, который предполагает создание условий для максимальной наработки целевых продуктов, разработана продукционная питательная среда и определены оптимальные физические параметры культивирования. Выявлено, что важным моментом для повышения синтетической способности иммобилизованных клеток является добавление в питательную среду веществ предшественников (L-фенилаланина), а также свойства и комбинации различных полисахаридных носителей (создание Са-альгинат-хитозанового комплекса).

Совместное использование нескольких стратегий — иммобилизация клеток, сочетанный состав носителей и внесение в питательную среду предшественника биосинтеза целевых продуктов — позволяет добиться значительного повышения продукционного потенциала клеток суспензионной культуры в качестве источника целевых продуктов фармакологической природы. На основании апробированных подходов достигнуто существенное повышение продукционного потенциала культур клеток, что позволяет рассматривать их в качестве эффективной альтернативы традиционно используемому природному источнику лечебных субстанций.

На основе проведенных исследований и установленных закономерностей, а также с целью дальнейшей апробации развиваемых подходов на заключительном этапе разработана лабораторная схема культивирования свободных и иммобилизованных в полисахаридный носитель клеток, продуцирующих вторичные метаболиты, обладающие фармакологическими свойствами.

Предлагаемые способы разделения и идентификации фармакологически ценных веществ являются теоретической основой методов стандартизации растительного сырья и получаемых из него препаратов.

The technology of medicinal plant cell lines obtaining with an increased content of pharmacologically valuable compounds based on immobilization method

Yurin V. M., Ditchenko T. I., Molchan O. V., Filippova S. N.

¹ Belarusian State University, Biological Faculty, 4 Nezavisimosti ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus, tel./fax: +375(17)209-58-50, e-mail: yurin@bsu.by

² Institute of Experimental Botany V. F. Kuprevich National Academy of Sciences of Belarus, 27 Akademicheskaya st., Minsk, 220072, Republic of Belarus, тел./факс +375(17)284-20-12, e-mail: olga_molchan@mail.ru

Plant cell and tissue cultures of pharmacologically valuable medicinal plants — *Echinacea purpurea*, *Catharanthus roseus*, *Vinca minor* represent a potential renewable and alternative source of medicinal substances. *In vitro* plant cells can preserve the ability of an intact plant to synthesize a wide range of secondary metabolites. However, one of the drawbacks of cell cultures is often the low yield of the desired product. The development of techniques based on the use of immobilization methods makes it possible to significantly increase the productivity of suspension cultures.

The regularities of production of compounds by immobilization of suspension cell cultures in Ca-alginate gel and their excretion into the nutrient medium were found. It is shown that the immobilization procedure is the most expedient for a heterotrophic culture cell, in which the accumulation of secondary metabolites, in particular the phenolic nature, is at a low level under a standard cultivation mode.

In order to obtain a biomass of cells cultured *in vitro* cells with a high content of pharmacologically valuable compounds, the best approach is a two-stage cultivation of the suspension culture in a cumulative mode: the first step is to create conditions for cell growth, for which there can be a standard Murashige and Skoog medium containing phytohormones of auxin group (2,4-D, IAA) and cytokinins (kinetin); for the second stage, which involves creating the conditions for maximum production of target products, developing a productive medium and the optimal physical cultivation options.

It was found that the addition of precursor substances, improving of properties and combinations of various polysaccharide carriers, for example, the creation of the alginate-chitosan complex, is an important moment for increasing the productivity of immobilized cells of pharmacologically valuable medicinal plants.

Joint use of several strategies such as: immobilization of cells, the combined composition of carriers and addition of precursor in the nutrient medium make it possible to increase the productive potential of suspension culture. Based on the tested approaches, a significant increase in the productivity of cultured cells has been achieved, which makes it possible to use them as an effective alternative to the traditionally used natural source of medicinal substances.

A laboratory scheme for the cultivation of free and immobilized cells in the polysaccharide carrier producing secondary metabolites with pharmacological properties was developed at the final stage as a result of a study undertaken by the Biological Faculty of Belarusian State University based on the conducted studies and established regularities, and also with the aim of further approbation of the developed approaches.

The proposed approaches for the separation and identification of pharmacologically valuable substances are the theoretical basis for methods of standardization of plant raw materials and biologically active substances derived from them.

Первичная и вторичная соматическая гибридизация картофеля

Яковлева Г. А.¹, Семанюк Т. А.², Дубинич В. Л., Кондратюк А. В.², Родькина И. А.²

¹ Белорусский государственный медицинский университет, пр-т Дзержинского, 83, Минск, 220116, Беларусь, факс: +375(17)277-12-02, тел.: +375(17)277-12-01, e-mail: y_galina@tut.by

² Научно-практический центр НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству, ул. Ковалева, 2 а, аг. Самохваловичи, Минский район, 223013, Беларусь, тел./факс: +375(17)506-67-79, e-mail: safto@rambler.ru.

Первичная и вторичная соматическая гибридизация картофеля используются для преодоления репродуктивных барьеров между культурным картофелем (*Solanum tuberosum* L. (tbr-4 x) и дикими видами, а также расширения генофонда, доступного для селекции. Соматическая гибридизация предполагает слияние протопластов двух различных генотипов с последующей регенерацией растений и отбором гибридов. При вторичной соматической гибридизации (ВСГ) один из партнеров или оба представлены соматическими гибридами.

Межвидовые соматические гибриды картофеля получены химическим слиянием протопластов из мезофилла листочков растений *in vitro* в 19 комбинациях, в том числе 5 — ВСГ. Партнеры для слияния включали 10 видов *Solanum* [*boliviense* (blv), *bulbocastanum* (blb), *cardiophyllum* (cph), *caripense*, *circaeifolium* (crc), *etuberosum* (etb), *jamesii* (jam), *neoantipoviczii*, *polyadenium* (pld), tbr: 2x and 4x), три половых гибрида [*brevidens* (brd) × etb, tbr-2x × *chacoense*, etb × brd] и 3 первичных соматических гибрида: 10D-1 [pld + (etb × brd)], 1D37-4 [cph + (tbr-2x × *chacoense*)], L30-1-2 [*S. caripense* + 78563-76 (tbr-4x)].

Отбор гибридов проводили с учетом 2–5 критериев: морфологический, анализ изозимов пероксидазы, профиля белков паренхимы клубня, протеомные карты, RAPD, SSR и другие ДНК-маркеры (видовые, геномные и гено-специфические).

Соматические гибриды картофеля с *S. neoantipoviczii* устойчивы к фитофторозу. Межвидовые гибриды с blb и их половые поколения устойчивы к фитофторозу и YBK, а с не клубненосными видами *Solanum* (etb, brd) — к вирусам YBK и ВСЛК.

Критический момент соматической гибридизации — проблема с фертильностью соматических гибридов и их способностью к генерации жизнеспособного потомства в беккроссах с культурным картофелем. Генерация полового потомства соматических гибридов имеет самостоятельную ценность независимо от наличия ценных для селекции признаков вследствие увеличения генофонда доступного селекционеру.

Соматические гибриды практически всех комбинаций проявили мужскую стерильность и слабую женскую фертильность. Для создания ВС1 необходимо не менее трех лет вегетативного размножения соматических гибридов. Эффективны следующие приемы: проведение максимально возможного количества опылений бутонов пылью многочисленных селекционных образцов, культура *in vitro* для проращивания ботанических семян, использование полового потомства от свободного опыления соматических гибридов (F1) в скрещиваниях с tbr-4x и ВСГ для стерильных первичных соматических гибридов.

Жизнеспособные беккроссы получены при скрещиваниях соматических гибридов (или их F1) с tbr-4x в 7 комбинациях из 19, включая комбинацию ВСГ — 7D (1D37-4 + L30-1-2), где 1D37-4 — стерилен, L30-1-2 — фертилен. Стерильность 1D37-4 была преодолена при ВСГ с ди-гаплоидом LDG (P: 10D-1 + tbr-2x). Для гибрида P2-17 получено жизнеспособное половое поколение при свободном опылении и бессемянные ягоды при скрещиваниях с tbr-2x.

Исходные формы, устойчивые к фитофторозу и YBK, отобраны среди ВС2-ВС4 соматических гибридов SB [tbr-4x (78563-76) + blb (Sb)]. Для них характерна продуктивность в пределах 800–1380 г/куст и содержание крахмала 15–22,7%. Присутствие генетического материала blb в половых поколениях соматических гибридов SB подтверждено с использованием различных белковых (1–2) и ДНК маркеров (1–6), включая положительный ответ с маркерами генов устойчивости к *Ph. infestans* из blb — *Rpi*: *blb1*, *blb2*, *blb2*. Некоторые из них также содержали гены устойчивости к фитофторозу *R1*, *R3b* из *S. demissum*.

Primary and secondary potato somatic hybridization

Yakovleva G. A.¹, Semanyuk T. V.², Dubinitch V. L., Kandratiuk A. V.², Rodzkina I. A.²

¹ Belarusian State Medical University, 83 Dzerzhinski ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus, fax: +375(17)277-12-02, tel: +375(17)277-12-01, e-mail: y_galina@tut.by

² Research and Practical Center of National Academy of Sciences of Belarus of Potato, Fruit and Vegetable Growing, 2 a Kovaleva st., Samokhvalovichi, Minsk region, 223013, Republic of Belarus, tel./fax: +375(17)506-67-79, e-mail: safto@rambler.ru

Primary and secondary somatic hybridization is used in potato to overcome the sexual barriers between the cultivated (*Solanum tuberosum* L. (tbr-4 x) and wild species and broadening potato germplasm accessible for breeding. The technique involves the fusion of protoplasts of the two different genotypes followed by regeneration of plantlets and selection of hybrids. One of partners or both are presented by the primary somatic hybrids in secondary somatic hybridization (SSH).

In our experiments the interspecific potato somatic hybrids were obtained by chemical fusion of mesophyll leaf protoplasts from plants *in vitro* in 19 combinations including 5 combinations of secondary somatic hybridization. The parents (partners for fusion) were 10 species of *Solanum* [*boliviense* (blv), *bulbocastanum* (blb), *cardiophyllum* (cph), *caripense*, *circaeifolium* (crc), *etuberosum* (etb), *jamesii* (jam), *neoantipoviczii*, *polyadenium* (pld), tbr: 2x and 4x), 3 sexual hybrids [*brevidens* (brd) × etb, tbr-2x × *chacoense*, etb × brd] and 3 primary somatic hybrids: 10D-1 [pld + (etb × brd)], 1D37-4 [cph + (tbr-2 x × *chacoense*)], L30-1-2 [*S. caripense* + 78563-76 (tbr-4 x)].

The selection of hybrids included the positive results of analysis on 2–5 criteria: morphological, isoenzyme peroxidase patterns, profiles of soluble proteins, proteomic maps, RAPD, SSR and different DNA-markers (species, genome and gene specific).

Somatic hybrids with *S. neoantipoviczii* had resistance to late blight. Interspecific hybrids with blb and their backcrosses were resistant to late blight and PVY, and somatic hybrids with non-tuberous species and their sexual generations — to viruses PVY and PLRV.

Crucial moment in somatic hybridization is the problem of fertility of obtained somatic hybrids and their capacity to generate the viable progeny in crosses with cultivated potato. Generation of sexual progeny of somatic hybrids is of great original importance irrespective of the presence of agricultural useful traits because it enhances the gene pool of the classical breeder.

Somatic hybrids of almost all combinations showed male sterility and weak female fertility. It took at least three years of vegetative reproduction of somatic hybrids to generate BC1 in result of sexual hybridization with tbr-4 x. We also used such methods as the pollinations of the maximum possible number of flower buds of somatic hybrids by numerous breeding samples, the culture *in vitro* for germination of botanical seeds, using the descendants from free pollination of somatic hybrids (F1) in sexual hybridization with tbr-4 x, SSH for sterile primary somatic hybrids.

The viable backcrosses with tbr-4 x were obtained in sexual hybridization of somatic hybrids (or their F1) which originated in 7 from 19 combinations including the combination of secondary somatic hybridization 7D (1D37-4 + L30-1-2). Primary somatic hybrid L30-1-2 was fertile and 1D37-4 sterile in numerous crosses with breeding samples. The sterility of primary somatic hybrid 10D-1 [pld + (etb × brd)] was partly overcome in the SSH with dihaploid LDG (P: 10D-1 + tbr-2 x). Secondary somatic hybrid P2-17 formed the viable generation from free pollination and the seedless berries in crosses with tbr-4 x.

The advanced late blight and PVY resistant forms were selected from BC2-BC4 of somatic hybrids of combination SB [tbr-4 x (78563-76) + blb (Sb)]. They formed the medium yield of ware tubers from 800 to 1380 kg/bush with starch content from 15.0 to 22.7%. The presence of blb material in sexual progeny of somatic hybrids SB was confirmed by 4–6 bands specific to genotype Sb in the profiles of soluble proteins and (or) peroxidase isoenzymes, SCAR-Sblb and positive results with markers to *Ph. infestans* resistant gene from blb — *Rpi*: *blb1*, *blb2*, *blb2*. Some of them also had DNA-markers to late blight resistant gene from *S. demissum*: *R1*, *R3 b*.

Наследование маркерного гена *npt II* в генеративных поколениях трансгенного картофеля при анализирующих скрещиваниях

Яхонт Ю. В., Родькина И. А.

Научно-практический центр НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству,
ул. Ковалева, 2 а, аг. Самохваловичи, Минский район, 223013, Беларусь, e-mail: y_yakhont@mail.ru

Основными критериями при проведении первичного скрининга по проявлению маркерного признака гена *npt II* у генеративного потомства трансгенного картофеля являются укоренение и окраска сеянцев на селективной среде. Укоренившиеся на селективной среде формы однозначно являются трансгенными. Промежуточные фенотипы («зеленые без корней» и «мозаичные»), которые выживают на селективной среде, но не укореняются, требуют дополнительного проведения ПЦР-анализа на наличие маркерного гена *npt II*.

Оценка генеративного потомства от скрещиваний трансгенного картофеля и соматических межвидовых гибридов по фенотипическому проявлению маркерного признака гена *npt II* проводилась по двум направлениям скрещиваний: 1) в качестве материнской формы были использованы соматические гибриды на основе *Solanum bulbocastanum* и *Solanum etuberosum*, а в качестве опылителя — трансгенный картофель с геном БО УВК и маркерным геном *npt II* (♀МВГ × ♂ТГ); 2) материнская форма — трансгенный картофель с геном БО УВК и маркерным геном *npt II*, а опылитель — соматические гибриды на основе *S. bulbocastanum* и *S. etuberosum* (♀ТГ × ♂МВГ). Четкой зависимости от выбора направления скрещивания и фенотипического проявления маркерного признака гена не обнаружено.

Согласно ранее полученным экспериментальным данным для отбора трансгенных форм среди гибридного материала по фенотипическому проявлению маркерного признака гена *npt II* была использована селективная среда с концентрацией канамицина 220 мг/л. Обязательным этапом эксперимента являлся ПЦР-анализ на наличие маркерного гена *npt II* для всех морфотипов сеянцев, отмеченных на селективной среде. Согласно полученным данным низкие концентрации канамицина в селективной среде (до 200 мг/л) ведут к ошибочному отбору большой доли нетрансгенных форм, а высокие концентрации (300 мг/л и выше) приводят к отравлению и обесцвечиванию растений и не пригодны для первичного скрининга гибридного материала.

Наиболее оптимальными концентрациями канамицина в селективной среде для отбора преимущественно трансгенных форм являются концентрации антибиотика 220–250 мг/л. Однако, для окончательного подтверждения трансгенности гибридов необходимо проведение дополнительного тестирования на наличие маркера методом ПЦР.

При культивировании гибридного потомства на селективной среде у части образцов с морфотипом «зеленые без корней» было отмечено образование воздушных корней из верхней пазушной почки, расположенной выше уровня селективной среды. Для того, чтобы установить, связано ли корнеобразование из пазушных почек с экспрессией маркерного признака гена *npt II* был проведен ПЦР-анализ для гибридов комбинации Т1301, у которых при культивировании на селективной среде доля такого корнеобразования преобладала. В соответствии с полученными данными корнеобразование из пазушных почек не связано с экспрессией маркерного гена и отмечено как у трансгенных форм, так и у нетрансгенных гибридов.

Inheritance marker gene npt II in sexual generations of transgenic potato in test crosses

Yakhont Yu. V., Rodzkina I. A.

*Research and Practical Center of National Academy of Sciences of Belarus of Potato, Fruit and Vegetable Growing, 2 a Kovaleva st., Samokhvalovich, Minsk region, 223013, Republic of Belarus,
e-mail: y_yakhont@mail.ru*

The main criterions of the initial screening in manifestation of marker trait of gene npt II in sexual generations of transgenic potato are rooting and coloring seedlings on a selective medium. Rooted plants on a selective medium are uniquely transgenic forms. Intermediate phenotypes (“green unrooted seedlings” and “mosaic seedlings”) which stay alive on a selective medium but don't have roots need to be evaluated by PCR with marker gene npt II.

Assessment of sexual generations of transgenic potato plants was conducted by two directions of crosses: 1) female form — interspecies hybrids (IH) based on *S. bulbocastanum* and *S. etuberosum*, as pollenizer — transgenic potato plants (T) with coat protein gene PVY and marker gene npt II ($\text{♀IH} \times \text{♂T}$); 2) $\text{♀T} \times \text{♂IH}$. No dependence on the choice of breeding direction and phenotypic manifestation of marker gene traits was found.

Kanamycin concentration 220 mg/l was accepted for selection transgenic forms among sexual generations of transgenic potato plants in phenotypic manifestation of marker trait of gene npt II on a selective medium. PCR for the presence marker gene npt II in selection phenotypes was necessary step for studying nature of manifestation phenotype on a selective medium depending on gene presence or gene absence. As the result low kanamycin concentrations in a selective medium (up to 200 mg/l) lead to wrong selection of a large proportion of nontransgenic forms, but high concentrations (300 mg/l and above) lead to poisoning and discoloration of plants.

The most optimal kanamycin concentrations in a selective medium are concentrations 220–250 mg/l. More tests should be made by PCR method for final confirmation of transgenic hybrids.

Some hybrids with morphotype “green unrooted” were indicated air-roots from upper lateral buds which located above the level of a selective medium. PCR for hybrids of combination T1301 was conducted to find out how rooting from lateral buds related to expression of marker trait of gene npt II. Finally, rooting from lateral buds was unrelated to marker gene expression and was noted for both in transgenic and nontransgenic forms.

Micropagation of common lilac (*Syringa vulgaris* L.) cultivars

Dapkuniene S.^{1,2}, Ziemyte I.²

¹ Plant Gene Bank, Stoties st. 2, Akademija LT-58343, Kedainiai distr., Lithuania,
e-mail: stase.dapkuniene@bs.vu.lt

² Botanical Garden of Vilnius University Kairenu st. 43, Vilnius, LT-10239, Lithuania,
e-mail: irutezie@gmail.com

.....

The common lilacs are very popular plant in Lithuanian landscape. Propagation plants by tissue culture is important for obtain large number of lilacs plants in a comparative short time. The goal of our research is to present information about the micropropagation of lilacs cultivars growing in the Lilacs exposition collection of Botanical garden of Vilnius university. The experimental work of was carried out at the Biotechnology and Genetics laboratory of Vilnius University Botanical Garden in 2012–2013. The material for the *in vitro* cultures were fragments of the young shoots from the *Syringa vulgaris* L. cultivars ('Adelaide Dunbar', 'Andenkenan Ludwig Spath', 'Fraincheur', 'Geantdes Batailles', 'Leon Simon', 'Pasteu', 'Paul Hariott', 'Primrose', 'Red Giant', 'William Robinson' and 'Woodland Blue') growing in the exposition collection of the our garden. The material intended for the culture stabilization was rinsed under running water for 2 hours, after was submerged in commercial bleach ACE for 10 minutes, then in 0.05 % HgCl₂ and 70 % ethylalcohol for 10 minutes. The disinfected fragments of shoots were rinsed in sterilized tiled water three times. One explant per tube was plated and 25 tubes per treatment were prepared. Explants were grown under white luminescent lamps. The data was analysed by tree-way analysis of variance, with the cultivar and growth medium as a fixed factors and the block as the random factor where the normality assumption of data and homogeneity of variance were tested through the Shapiro–Wilk test and Levene test, respectively. *Post hoc* comparisons of means among examined treatment variants were made using Tukey's honestly significant difference (HSD) test at a significance level of $P < 0.05$. We recommend to use *in vitro* culture for obtain planting material of lilac cultivars. The medium used for stabilization and propagation *in vitro* was based on Murashige and Skoog (Murashige, Skoog, 1962) in organic salts and vitamins with 3.0 % sucrose with 1 mg/l BA 0.05 mg IBA (for stabilization *in vitro* culture) and with 0.1 mg/l 2-ip and BA, 0.05 mg/l IBA and IAA.

ROS sensors in the plant plasma membrane: study using *Arabidopsis thaliana* whole plant culture

Demidchik V. V.

*Department of Plant Cell Biology and Bioengineering, Biological Faculty, Belarusian State University,
4 Independence ave., 220030, Minsk, Belarus, e-mail: dzemidchik@bsu.by*

.....

Reactive oxygen species (ROS) are involved in all major physiological processes in higher plants. ROS are produced by intracellular and extracellular mechanisms and accumulate in the cell wall (apoplast), where the antioxidant capacity is much lower than in cytosol. The moderate generation of ROS is involved in normal plant physiology and adaptation needs but their overproduction, for example during the environmental stress, results in irreversible oxidative damage and dysfunction of cell components (Demidchik 2015, Environ Exp Bot). The question of sensing ROS is still debated in plant physiology. Here, it is demonstrated that the plasma membrane ion channels transporting cations, such as Ca^{2+} and K^+ , function as prime targets of ROS in plants. These systems can catalyse early and rapid sensing of ROS in plants involved in a multitude of physiological reactions, such as adaptation to stresses, control of photosynthesis, cell elongation and gravitropic responses. In the plasma membranes of higher plants (as tested by using *in vitro Arabidopsis thaliana* cultures), ROS instantaneously activate two major classes of ion channels: Ca^{2+} -permeable nonselective cation channels (NSCCs) and K^+ outwardly-rectifying channels (KORs encoded by GORK). Activation of cation channels by ROS leads to dramatic influx of Ca^{2+} for signaling, developmental and nutritional needs and K^+ loss (electrolyte leakage) inducing autophagic and necrotic cell death. Ca^{2+} entry also rearranges actin cytoskeleton and modifies vesicular transport. ROS-activated ion channels reveal complex nature of activation, depending on the developmental stage and oxidative capacity of tested ROS. The transition metal binding centres have recently been identified in some members of cyclic nucleotide-gated channels, a subclass of NSCCs (Demidchik *et al.* 2014, JXB). These centers potentially produce hydroxyl radicals from H_2O_2 (Haber-Weiss reaction) directly in the channel's macromolecule. Mutations in ROS-sensitive moieties in K^+ efflux GORK channel leads to the decrease of ROS-sensing capacity, suggesting that distinct molecular groups are responsible for ROS sensing by ion channels. These moieties probably confer physiological properties related to ROS, such as programmed cell death and autophagy. This study was supported by Russian Science Foundation grant No. 15-14-30008 to VD.

In vitro direct regeneration of *Viola caspia* subsp. *sylvestrioides* Marcussen from petiole and leaf explants

Gharari Z.¹, Sharafi A.², Bagheri K.¹, Yazdinejad A.³

¹ Agronomy and Plant Breeding Department, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran

² Zanjan Pharmaceutical Biotechnology Research Center, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran, e-mail: sharafi.a@gmail.com

³ School of Pharmacy, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

.....

Viola caspia belongs to family *Violaceae*, commonly known as “Banafsha” is a small ornamental, perennial and an important medicinal herb which is restricted to Crimea, northeastern Turkey, Caucasus and the Caspian coast. Leaf and petiole explants excised from *in vitro* cultures of *Viola caspia* subsp. *sylvestrioides* Marcussen were cultured on half and full strength of Murashige and Skoog (MS) medium solidified with agar and supplemented either with different concentrations of thidiazuron (TDZ) without auxin or 2ip and BA with NAA and evaluated for their organogenic capacity under *in vitro* conditions. Direct organogenesis was induced on half and full strength MS supplemented with TDZ (0.7–3.5 mg/l) and indirect organogenesis (via callus) was induced on half strength MS supplemented with 2ip (3.5 mg/l) and NAA (2 and 3 mg/l) followed by callus transfer on 0.5 mg/l BA. Leaf and petiole explants formed shoots through direct organogenesis with TDZ. The best shoot proliferation from leaf and petioles was obtained on half strength MS medium supplemented with 2.8 mg/ml TDZ. The highest frequency of shoot regeneration (100 % and 86.66 %) was observed on petiole and leaf explants respectively grown on half-strength MS medium supplemented with 2.8 mg /l TDZ and the highest frequency of mean number of shoots per explant (7.66 and 4.33) were obtained on leaf and petiole explants grown on half-strength MS medium containing 2.8 mg/l TDZ. The regenerated shoots were rooted the best on half strength MS containing 0.5 mg/l IBA and acclimatized. *In vitro*-propagated plants were transferred to soil after 3 months.

Keywords: *In vitro* direct regeneration, *Viola caspia*

Analysis of the chemical composition of the essential oil of *Scutellaria bornmuelleri* using GC-MS

Gharari Z.¹, Sharafi A.², Bagheri K.¹, Danafar H.², Yazdinejad A.³

¹ Agronomy and Plant Breeding Department, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran

² Zanjan Pharmaceutical Biotechnology Research Center, School of Pharmacy, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran, e-mail: sharafi.a@gmail.com

³ School of Pharmacy, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

.....

Scutellaria bornmuelleri Hausskn. ex Bornm. ssp. *mianensis* Rech. f is one of the species of *Scutellaria* genus, *Lamiaceae*, that is used for a long time in traditional medicine of Iran. *S. bornmuelleri* is an annual herb distributed in surroundings of Mianeh city, subdivision in the East Azerbaijan province of Iran. The aim of this study was to analyze essential oils of leaves of *S. bornmuelleri* in flowering stage of development. Chemical composition of the essential oils from aerial parts of *S. bornmuelleri* was investigated by means of gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) after its hydrodistillation using a clevenger-type apparatus in foliation — flowering stage. Hydrodistillation of the dried leaves of *S. bornmuelleri* yielded a yellowish essential oil. One hundred-eight different components were identified in the essential oil of *S. bornmuelleri*. The main component of essential oil were steroids such as 14-.Beta.-H-Pregna (32.92%), 12.08% terpenes (such as Limonene, α -Longipinene, α -Copaene, Germacrene D, β -Cubebene and δ -Cadinene) and 21.68% carbohydrates. In the essential oil obtained from the aerial parts of *S. bornmuelleri*, the steroids such as 14-.Beta.-H-Pregna were at high amounts. The presence of different essential oils can candidate this plant as a medicinal plant for auxiliary medication in different diseases.

Keywords: Chromatography/mass spectrometry (GC/MS), essential oil, *Scutellaria bornmuelleri*

Morphological and molecular response to thermal stress in *in vitro* grown *Cnidium officinale* Makino

Hyung-Eun Kim¹, Yun-Ji Park¹, Jae-Heok Shin², Young-Sik Gil²,
So-Young Park¹

¹ Division of Animal Horticultural and Food Science, Chungbuk National University, Cheongju, 28644, Korea

² Kolmar Pharma Co., Wangam Jecheon-si, Korea

Cnidium officinale Makino belonging to *Apiaceae* family is a medicinal herb that has useful bioactive compounds such as senkyunolide, ligustilide and cnidilide. The rhizomes of the species is effective against pain, inflammation, hypertension, and menstrual disturbance. However, it is difficult to cultivate in summer season due to lack of resistance to high temperature and drought, so need to develop a new cultivar which is heat resistance. Therefore, in this study, we aim to investigate the candidate genes which can be used as a molecular marker on thermal stress using *in vitro* cultured *C. officinale*. For this, the buds obtained from greenhouse-grown rhizomes were cultured in MS medium containing BA after surface sterilization, and subsequently total 22 lines were induced and used for further study. Additionally, to select a heat resistant line among them, heat shock protein (*hsp*), catalase (*cat*), and cysteine protease (*cp*) genes were partially sequenced from *C. officinale* and gene-specific primers were designed for heat resistance marker. After culture for a week, dramatical damages to survival were found in the plantlets placed under 35°C and morphological changes were detected even in 30°C treatment. The number of leaves and roots were decrease due to the influence of high temperatures from 30°C. To investigate the expression of *hsp* and *cat* genes in thermal stress, *in vitro* plantlets were pre-cultured for a week in MS medium, and then moved to growth chambers controlled with 25, 32, 32.5 and 35°C and cultured for 0, 1 and 2 days. As a result, *cat* showed the highest expression level at 6 hours after high temperature treatment, whereas *hsp* and *cp* increased rapidly at 12 hours after treatment. It is indicated that *cat* is expressed immediately to remove the ROS that occurs when the plant is exposed to stress, and then *hsp* and *cp* act to recover or remove the damaged protein such as enzyme. In this study, we could obtain the basic knowledge for high temperature stress and resistance breeding in *C. officinale*. In further study, we will investigate about correlation between the karyotype and the high temperature resistance.

Changes of ginsenosides content by LAB bacteria co-cultivation in adventitious root cultures of *Panax ginseng*

Keon-Il Kim, Thanh-Tam Ho, So-Young Park

Department of Horticulture, Division of Animal, Horticultural and Food Sciences, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Republic of Korea

Lactic acid bacteria (LAB) produces β -glucosidase, and recent studies have suggested that LABs produce β -glucosidase that catalyze ginsenoside bioconversion by removing the glycosyl group of major ginsenosides. In ginseng, which is one of the representative medicinal herbs in Korea, minor ginsenosides (Rg3, Rh2, Rh1, F2, CK etc.) are known to have a greater pharmaceutical potential than major ginsenosides, and they are mostly deglycosylated forms. In this study, we investigated the effects of three kinds LAB (*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Leuconostoc citreum*) on minor ginsenoside production by bioconversion of ginsenosides in *Panax ginseng* adventitious root culture. After one-week of co-culture, the biomass, pH, and electric conductivity (EC) of the culture medium were obtained and total saponin and 12 ginsenoside contents were also analyzed. There has no significant difference in biomass (FW and DW) production among treatments except Lc 0.2 % treatment (12.3 %). EC was gradually decreased in all treatments while the pH increased until day-2 and then decreased. Total saponin content was higher in all treatments than in the control, especially in Lr 0.2 % treatment (35 mg·g⁻¹ DW). In addition, β -glucosidase activity was lower in all treatments than non-treatment and stress signal molecular factor (catalase, peroxidase, malondialdehyde) was also analyzed to understand its relationship between physiological stress and ginsenoside synthesis. Ginsenoside content was analyzed by HPLC. The content of total ginsenoside the highest in Lc 0.02 % (v/v) treatment (4.5 mg·g⁻¹ DW) and productivity also the highest in the treatment. In addition, the content of PPD type ginsenoside was highest Lc 0.02 % treatment (2.8 mg·g⁻¹ DW), but PPT type was the highest Lr 0.02 % treatment (1.8 mg·g⁻¹ DW). This study will be provided the methods to increase pharmaceutical ginsenosides by co-culture with the LAB in adventitious root cultures of *Panax ginseng*.

This work was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (IPET) (Grant number 315013-4).

The role of plant cryopreservation in guaranteeing global food security

Panis B.¹, Popova E.²

¹ Bioversity International c/o KU Leuven, Willem de Croylaan 42 bus 2455, 3001 Leuven, Belgium, b.panis.cgiar.org

² Independent expert, Moscow, Russia, e-mail: plantcryo@gmail.com

Cryopreservation means the storage of biological material in liquid nitrogen (-196°C) or in its vapor phase (-150°C). These temperatures are low enough to arrest all metabolic and physical processes, as such the material can be kept safely for hundreds of years in liquid nitrogen. Cryopreservation plays and can play an essential role in the safe conservation of important plant genetic resources of crops like bananas, cassava, potato, yams, sweet potato, coconut and many fruit trees. In these cases seed preservation at -20°C , the most convenient method to store plant germplasm, is not an option since those crops are (i) sterile (do not produce viable seeds, like banana), (ii) produce only recalcitrant (non-storable) seeds (like cocoa and coconut) or (iii) specific gene combinations need to be maintained (potato and many fruit species such as apple).

Research on cryopreservation of these crops already started in the '80s but it was only with the development of vitrification protocols and more recently with the use of droplet vitrification that a significant portion of important crop collections is now stored in liquid nitrogen. Currently, over 10,000 accessions starting from *in vitro* cultures are safely preserved for the long term through cryopreservation. Significant efforts to introduce and promote cryopreservation were made by CGIAR (the Consultative Group on International Agricultural Research) collections in collaboration with the Global Crop Diversity Trust. More than 80% of cryopreserved accessions belong to 5 crops; potato, cassava, bananas, mulberry and garlic. Other significant cryopreservation collections representing thousands of accessions are those of dormant apple buds.

In this presentation, the state of the art of plant cryopreservation will be presented focusing on its history, the importance of avoiding ice crystal formation during cooling, which protocol to use for your specific tissues, regenerating normal plants after cryopreservation and more practical issues of cryopreservation such as "what is the post-thaw regeneration rate needed in order to consider a cryopreservation protocol as practically useful". Also the need of a safety back-up cryopreservation facility for vegetatively propagated crops will be discussed.

As example, the banana collection at the Bioversity International Musa germplasm Transit Center (ITC) hosted by the University of Leuven, Belgium will be highlighted. There, 1580 banana accessions are stored *in vitro* under minimal growth conditions (15°C). From these, 1104 accessions (70% of the *in vitro* collection) belonging to 30 different genomic banana groups are now safely stored in liquid nitrogen for future generations. A safety back up of this cryopreserved collection is kept at IRD (Institut de recherche pour le développement), Montpellier, France.

Metabolic engineering of morphinan alkaloids in transgenic cultures of *Papaver bracteatum*

Sharafi A.¹, Sharafi A. A.², Yaroshko O.³

¹ Zanzan Pharmaceutical Biotechnology Research Center, School of Pharmacy, Zanzan University of Medical Sciences, Zanzan, Iran, e-mail: alisharafi@zums.ac.ir

² Guilan University, e-mail: atasharafi@yahoo.com

³ Institute of Cell Biology and Genetic Engineering National Academy of Science of Ukraine, Kyiv, Ukraine

.....

Papaver bracteatum has a high content of thebaine. It has strong potential to use as an alternative to *P. somniferum* for the production of benzylisoquinoline alkaloid. Codeinone reductase (CodR) and Salutaridinol 7-o-acetyltransferase (SalAT) is a key gene in morphinan alkaloids biosynthesis pathway. In this study, *P. bracteatum* was genetically engineered to over-express codeinone reductase and salutaridinol 7-o-acetyltransferase gene in hairy root cultures. Transcript level of the codeinone reductase gene in transgenic hairy root lines increased in comparison with hairy roots without CodR over-expression and wild type roots, respectively. Codeine was produced at (0.04 % dry weight) and morphine was at (0.28 % dry weight) in the transgenic hairy root lines. Also, over expression of SalAT gene was used for metabolic engineering in *P. bracteatum* hairy root cultures. Transcript level of the salutaridinol 7-o-acetyltransferase gene in transgenic hairy root lines increased up to 154 and 128 % in comparison with hairy roots without SalAT over expression and wild type roots, respectively. High performance liquid chromatography analysis showed that the transgenic hairy roots relatively improved levels of thebaine (1.28 % dry weight), codeine (0.02 % dry weight) and morphine (0.03 % dry weight) compared to those hairy roots without SalAT over expression. This suggests that *P. bracteatum* hairy roots expressing the SalAT gene could be potentially used for the production of valuable morphinan alkaloids. Our results confirmed that over expression CodR and SalAT genes using *A. rhizogenes* mediated transformation could provide a fast, simple and reliable model system to investigate the molecular regulation of morphinan alkaloids biosynthesis in *P. bracteatum*. Moreover, similar strategy could be used to consider other candidate genes involving in benzylisoquinoline alkaloid pathway in *Papaver* species.

Keywords: Codeinone reductase, Metabolic engineering, Salutaridinol 7-o-acetyltransferase, *Papaver bracteatum*

Genetically transformed root induction and shoot organogenesis of *Dracocephalum kotschyi*

Sharafi A. A.¹, Yaroshko O.², Sharafi A.³

¹ University of Guilan, atasharafi@yahoo.com

² Institute of Cell Biology and Genetic Engineering National Academy of Science of Ukraine, Kyiv, Ukraine

³ Zanjan Pharmaceutical Biotechnology Research Center, School of Pharmacy, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran; *Corresponding author's E. mail: alisharafi@zums.ac.ir

.....

An efficient hairy root induction system for an important endangered medicinal plant, *Dracocephalum kotschyi*, was developed through *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation by modifying the co-cultivation medium using five bacterial strains, A4, ATCC15834, LBA9402, MSU440, and A13 (MAFF-02-10266). A drastic increase in transformation frequency was observed when a Murashige and Skoog medium lacking NH_4NO_3 , KH_2PO_4 and CaCl_2 , was used, resulting in hairy root induction frequencies of 52.3 %, 69.6 %, 48.6 %, 89.0 %, and 80.0 % by A4, A13, LBA9402, MSU440, and ATCC15834 strains, respectively. For shoot induction, hairy roots and unorganized tumors induced by strain ATCC15834 were placed on an MS media supplemented with 0.1, 0.25, 0.5, and 1 mg/l BA plus 0.1 mg/l NAA. The high frequency of shoot regeneration and number of shoot were obtained in the medium containing 0.25 mg/l BA and 0.1 mg/l NAA. Root induction occurred from the base of regenerated shoots on the MS medium supplemented with 0.5 mg/l IBA after 10 days.

Keywords: *Agrobacterium* strains, Co-cultivation medium, *Dracocephalum kotschyi*, Hairy root

Cryopreservation of garlic, grape and sweet potato meristems with modified vitrification solution

Shevchenko N. O.

*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine,
23 Pereyaslavskaya st., Kharkiv, Ukraine 61016, tel.: +380(57)373-41-43, fax: +380(57)373-00-84,
e-mail: cryo@online.kharkov.ua*

.....

Development of the methods for long-term storage of the collections of biological objects at low-temperature banks is urgently needed to reduce the costs for cultivation, to prevent the loss of the samples from diseases and to facilitate their exchange. One of the methods to cryopreserve the biological objects plant origin is vitrification.

The aim of our study was investigation of possible the modification of PVS 2 solution, by excluding Me_2SO from its composition and simplification of cryopreservation protocol for meristems of sweet potato, garlic and grapes.

Meristems of sweet potato, garlic and grapes were dehydrated at temperature of $22\pm 2^\circ\text{C}$ for 60 min with modified plant vitrification solution (1 M sucrose, 2 M glycerol and 2.5 M ethylene glycol) in one step. Meristems were frozen in cryogenic vial by a direct immersion into liquid nitrogen, thawing was performed in 40°C water bath, washing-out from cryoprotectants was done in 0.3 M sucrose solution. Recultivation of meristems was carried out with MS medium. Meristems, which after thawing remained green for 14 days, were considered as preserved ones. Viability was assessed to day 60 after thawing.

It has been shown that modified vitrification solution had no toxic effect on meristems of all the studied cultures. The viability made about 95 %. Cryopreservation led to a reduction in the number of viable meristems. For example, in cultivation of garlic meristems about 60 % of all the apexes were preserved and all of them formed sprouts, i. e. were viable. When cryopreserving the sweet potato meristems their preservation rate was 75 %, but no one of them formed plantlets. The preservation rate for grape meristems was 80 %, among them only 50 % were viable.

Thus, the use of the modified plant vitrification solution allows to significantly simplify the procedure of meristems preparing to cryopreservation and to get a high enough percentage of viability in case of grape and garlic. In the case of sweet potato's meristem, it is promising to use nitrogen sludge as a cooling agent.

Advances in plant tissue culture and their applications in crop improvement

Shri Mohan Jain

Department of Agricultural Sciences, PL-27, Helsinki, Finland, e-mail: mohan.jain@helsinki.fi

Researchers are facing challenges climate change, human population growth, and pollution threatening sustainable food production worldwide. There are already sign of the negative impact on world food production, rise in food price and impact on socio-economy. This may lead to food security and nutrition problem. Plant tissue culture has made rapid progress in plant regeneration from different explants, e. g. immature zygotic embryos, shoot tips, adventitious buds, anther and ovary culture by using *in vitro* techniques including doubled haploidy, somatic embryogenesis, somatic cell fusion, micropropagation, genetic transformation, and somaclonal variation. By using these techniques, plants are readily regenerated in major food and horticultural crops and useful for *in vitro* conservation of genetic material, bioreactor for growing plant cells or embryogenic cells, *in vitro* mutagenesis for inducing mutations, long-term germplasm storage, gene transfer for producing transgenic crops, production of secondary metabolites, and germplasm exchange. Micropropagation via organogenesis is routinely used for clonal propagation of ornamental plants and other vegetative propagated plants, especially woody and fruits trees. *In vitro* mutagenesis is carried out by e. g. using shoot meristem, embryogenic cell suspension, microspores, and protoplasts. For example, shoot meristems are treated with a mutagen and regenerate shoots followed by root formation; mutants are selected under the selection pressure e. g. disease, salt, drought. The selected mutant plants are transferred and evaluated in the greenhouse and finally to the field evaluation and use them for crossing with other varieties.

The influence of different factors on morphological parameters of *Stevia rebaudiana* *in vitro*

Shulgina A. A., Kalashnikova E. A., Tarakanov I. G.

Department of agronomy, biotechnology, plant breeding and seed production, Russian State Agrarian University — Moscow Timiryazev Agricultural Academy, 49 Timirjazevskaja st., 127550, Moscow, Russian Federation, tel.: +7(499)977-88-03, e-mail: alja.shulgina@yandex.ru

Today, sucrose is the main commonly used food sweetener derived from sugar beet or sugarcane. However, excessive sugar consumption could undermine human's health. In the world, where excess weight problem continues to grow, studies on the native sugar substitutes are of an increasing interest. Some of them are widely used, for instance, diterpene glycoside of perennial herbaceous plant *Stevia rebaudiana* Bertoni. Its leaves are rich with sweet glycosides, the major and the most valuable substance of them is stevioside. Stevioside is widely used as sweetener and sugar substitute product in Japan for decades. It is 300 times sweeter than sucrose however it doesn't increase blood sugar level and generally recognized as safe. In addition, it is chemically resistant at high temperatures, so it could be used at hot courses preparation. Among other qualities of stevioside are useful for wound healing acceleration, anti-allergenic and anti-inflammatory action.

Biosynthesis of secondary metabolites in plants directly correlates with the intensity of growth, and therefore our special attention was focused on morphogenetic changes in stevia cultivation *in vitro* in different conditions. The objective of our research is to optimize conditions of *Stevia rebaudiana* cultivation, using various of factors. As hormonal factor we use different growth regulators and substances with hormonal activity. To install the influence of them, isolated stevia explants were propagated by cuttings and cultivated in MS media with various concentrations: 6-benzylaminopurine (BAP), indole acetic acid (IAA), indole butyric acid (IBA), naphthyl acetic acid (NAA), Appin, Kinetin, which action was studied independently and also in combination with each other.

Important physical factor is light, which plays a phyto regulatory role in plants. We studied the influence of innovative irradiators — light emitting diodes (LEDs) with different wavelengths: green 515 nm, red 660 nm, blue 460 nm and white as a control. To identify significant parts of the spectrum, to study their influence on the morphological parameters of stevia plants *in vitro* combined with growth regulators influence, the scheme of our experiment includes both former and latter. Plants were grown within five weeks under above-mentioned four light spectra. According to this scheme, the experiment was carried out on three MS media: with BAP and IAA in concentrations of 1.0 and 0.5 mg/l respectively, hormone-free MS and medium with the 0.1 ml/l Appin and 0.5 ml/l IAA. The last hormonal combination had been selected in our previous studies as the best medium for clonal micropropagation.

It was established that plants under red LEDs show the intensive growth of shoots, on all nutrient media variants. The obvious stimulating effect of red LEDs on shoot height and leaves number was observed on the medium with Appin and IAA. The difference in comparison with control was also established. The positive effect on multiplication factor of *Stevia rebaudiana* explants *in vitro* was found in the variant with blue LEDs. The minimal biometric parameters were observed under green LEDs, especially in the presence of BAP

The conclusion was made that the combination of the two factors (hormonal and physical) gave a synergistic effect and in particular, the effect of red light was intensified in the presence of hormones. Further research will make give possibility to better using the morphogenetic potential of the stevia plant with its intensive cultivation in light culture conditions.

Activity of antioxidant enzymes in chloroplasts and photosynthetic activity transgenic wheat plants with RNA-suppressor of the proline dehydrogenase gene under drought

Sokolovska-Sergiienko O. G., Dubrovna O. V., Kulesh S. S., Kiriziy D. A., Priadkina G. O., Stasik O. O.

Institute of Plant Physiology and Genetics of National Academy of Science of Ukraine, Ukraine, Kyiv, 03022, Vasylykivska st. 31/17, tel./fax: +380(44)257-51-50, e-mail: sokolovskay@gmail.com

Aim of the study: Proline is known as multifunctional protective molecule, accumulating in high concentration in plant tissues in response to various stress factors and alleviating cell damage as both an osmotic agent and a radical scavenger [Vahdati, Lotfi, 2013; Szabad, Savoure, 2009]. It was shown that transgenic plants with double-stranded RNA-suppressor of the gene of prolin dehydrogenase (*pdh*) have higher prolin content and revealed higher drought tolerance [Tischenko, 2015]. Among the cell protective mechanisms against oxidative stress, caused by a drought, the main role belongs to the anti-oxidant enzymes [Hasanuzzaman, 2012]. We assessed the antioxidant enzymes activity in chloroplasts as well as the parameters of photosynthetic apparatus activity in transgenic wheat plants containing the double-stranded RNA-suppressor of the proline dehydrogenase gene comparing to the non-transgenic parent plants under the drought.

Material and methods: The studies were conducted with transgenic lines of common wheat variety Zymoyarka generation T2 obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation *in planta* [Voronova et al., 2015]. The plants were grown in 10 kg pots. The drought was imposed by water limiting at anthesis stage. Soil moisture was controlled gravimetrically and maintained at 30 % of field capacity for 7 days compared with 70 % of field capacity (optimum) in control plants. The free proline content in tissues was estimated in accordance with [Andryushchenko et al., 1981], the activities of superoxide dismutase (SOD) and ascorbate peroxidase (APX) in isolated chloroplasts were assayed as [Beyer, Fridovich, 1987] and [Nacano, Asada, 1981], respectively. The photosynthesis rate was measured under controlled conditions using an infrared gas analyzer GIAM-5M.

Results: Under soil drought conditions, L-proline content in non-transgenic plants variety Zymoyarka was 58 ± 3 mg%/g of fresh weight. At the same time, it fluctuated from 150 to 240 mg%/g of fresh weight in transgenic forms, containing the suppressor of the *pdh* gene. Thus, transgenic plants have prolin content 2.6–4.1 times higher, than non-transgenic parent plants.

Under the optimal watering, the antioxidant system in transgenic plants was more active than non-transgenic genotypes. The activities of SOD and APX in transgenic plants were respectively 30 and 18 % higher. However, the enzymes activities in drought-treated plants significantly decreased for transgenic while increased for non-transgenic ones. Nevertheless, the transgenic plants had 40 % higher leaf photosynthesis rate and practically the same chlorophyll content.

The data obtained allows suggestion on pre-adaptation of protective system in transgenic plants with *pdh* gene suppressor to stress conditions resulting in the rise of antioxidant enzymes activity under normal conditions. When watering was shortened and drought has developed, the transgenic plants having sharply increased (by 4–5 times) proline content could maintain higher photosynthetic activity and survive oxidative stress with lower activity of antioxidant enzymes.

Keywords: *Triticum aestivum* L., transgenic plants, double-stranded RNA-suppressor of the proline dehydrogenase gene, L-proline, antioxidant enzymes.

Acknowledgements: The publication contains the results of research conducted within the framework of the multidisciplinary research program funded by the National Academy of Sciences of Ukraine “Molecular and cellular biotechnologies for the needs of medicine, industry and agriculture” (2015–2019).

Cell morphological structure and hydrogen peroxide metabolism in somatic embryogenesis of hardwood species: a case study in *Fraxinus mandshurica*

Yang L., Shen H. L., Zhang P.

State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, School of Forestry, Northeast Forestry University, Hexing Road No. 26, Harbin, 150040, China, tel.: +86(0451)821-910-44, fax: +86(0451)821-910-44, e-mail: shenhl-cf@nefu.edu.cn

Somatic embryogenesis enables more flexible tree breeding techniques and provides more flexible deployment strategies for traditional orchard approaches. *Fraxinus mandshurica* is a hardwood species in the genus *Fraxinus* in the *Oleaceae*, which has important wood production function and ornamental purpose. In this study, *F. mandshurica* was selected as the research species, and somatic embryogenesis was conducted by using zygotic embryos as explants, and the morphological structure of the somatic embryos and the signal molecules in cells like reactive oxygen species were studied at the same time. Using explants from mature or immature zygotic embryos, the somatic embryos could be successfully induced by osmotic stress treatments. Somatic embryo induction percentage could be reached up to 75% on the MS $\frac{1}{2}$ medium (Murashige and Skoog 1962) supplemented with 5 mg·L⁻¹ NAA, 2 mg·L⁻¹ BA, 400 mg·L⁻¹ casein acid hydrolysate, 75 g·L⁻¹ sucrose and 6.5 g·L⁻¹ agar, and the number of somatic embryos could reach to 100 per explant. Somatic embryo directly originated in single epidermal cell. At the 13th day of culture, some of the explant cells occurred programmed cell death in the forms of DNA fragmentation, nuclear shrinkage, chromatin condensation, nuclear fragmentation, apoptotic body formation, and cell disassembly; and some explant cells had deep dark nuclei staining with unequal division and eventually formed somatic embryos. At the stage prior to the cotyledonary embryo, a suspensor-like structure existed and then degenerated and disappeared. H₂O₂ and NO participated in the regulation of programmed cell death in explants for somatic embryogenesis. H₂O₂ burst could be used as a marker signal of somatic embryogenesis, and NO signal was located upstream of H₂O₂ signal. In the early stage of somatic embryogenesis, accompanied by the chromatin condensation in the nucleus of the explant cells, the mitochondrial structure became blurred, mitochondrial membrane absorbance, mitochondrial membrane potential and the absorbance of cytochrome *c/a* decreased, Caspase-3 enzyme activity increased. Simultaneously, the contents of intracellular H₂O₂ and NO increased, and the activity of SOD, POD, and CAT associated with H₂O₂ metabolism enhanced. The increase of nitric oxide synthase and nitrate reductase enzyme activity caused NO content increased in the explant cells. NO synthesis might be the result of joint action of nitric oxide synthase and nitrate reductase pathways. These results revealed the morphological structure and active oxygen metabolism in the somatic embryogenesis of *F. mandshurica*, which provided the theoretical and experimental evidence for the elucidation of the regulation mechanism of somatic embryogenesis in broad-leaved trees.

Microclonal multiplication and callus formation of *Amaranthus caudatus* L. cv. *Karmin*

Yaroshko O. M.¹, Gajdosova A.², Kuchuk M. V.¹

¹ Institute of Cell Biology and Genetic Engineering NAS, Zabolotnoho, 148, Kyiv, 03143, Ukraine, tel.: +380(96)94-445-15, fax: +380(44)526-71-04

² Institute of Plant Genetics and Biotechnology PSBC SAS, Akademicka 2, P. O. Box 39A, 950 07 Nitra, Slovak Republic, tel.: +421(37)694-33-15, fax: +421(37)733-66-60, e-mail: 90tigeryaroshko90@gmail.com

The object of investigation was *Amaranthus caudatus* L., variety *Karmin*. The aim of work was to evaluate the optimal medium for callus formation as a source of biologically valuable substances and microclonal multiplication as a tool for further biotechnological manipulations.

Different sterilization procedures were tested for seed sterilization: HgCl₂ in concentration 0.1 % and SAVO 30 % (commercial bleach) during several time periods for seed treatment. The most efficient seed sterilization with the lowest contamination and the highest seed germination value was achieved by use of 30 % SAVO — 15 min. After sterilization, the seeds were transferred on hormone-free MS medium or on wet sterile cotton paper in Petri dishes for germination.

Better seed germination was achieved on wet cotton paper in comparison with MS medium. The obtained seedlings of variety *Karmin* were used as a source of explants for *in vitro* experiments. The nutritional medium MS₃₀ (Murashige and Skoog, 1962) with different concentrations and combinations of growth regulators was tested for callus formation and microclonal multiplication: MS₃₀ medium supplemented with 3, 5 and 10 mg/l BAP, KIN, TDZ individually, or MS₃₀ medium with 3 mg/l BAP, KIN, TDZ each variant supplemented with 0.5 mg/l NAA.

The explants taken from 8–10 day-old sterile seedlings were epicotyls with cotyledons and with 1–2 mm of hypocotyl and segments of hypocotyl.

The morphogenic reaction of the explants on the various culture media was evaluated after 4 weeks of cultivation.

Callus formation was observed on the both cut ends of hypocotyl segments in 100 % of explants on all tested medium variants. At cytokinin BAP, KIN, TDZ concentration 3 mg/l, the most intensive callus formation was on medium with TDZ (at both without and with 0.5 mg/l NAA) and the lowest callus formation was on medium with KIN. At cytokinin BAP, KIN, TDZ concentration 5 and 10 mg/l, the callus formation was markedly reduced on all cytokinins.

Epicotyls with cotyledons and with 1–2 mm of hypocotyl cultivated on media with cytokinin BAP, KIN, TDZ concentrations 3, 5 and 10 mg/l formed 1 apical shoot with the best growth on medium with 3 and 5 mg/l KIN. After transfer of shoots on MS medium with 1 mg/l BAP, the shoot elongation and week shoot multiplication (1–6 shoots/explant) was observed.

After multiplication, the shoots were separated and transplanted on MS₃₀ medium with 0.3 mg/l IAA for root induction. After 2 weeks the root formation was observed and the young plants were transplanted from Petri dishes into pots with soil.

Именной указатель

А

Абакумов С. Н. 176
 Абделаиз В. М. А. 4
 Азизбекян С. Г. 96
 Аксенова М. А. 160
 Алоян С. 180
 Амброс Е. В. 6
 Амирбеков А. С. 18
 Анапияев Б. Б. 8, 10
 Антипин М. И. 164, 216, 217
 Анципович В. В. 100
 Ахиярова Г. Р. 242
 Ахметова А. Б. 8, 10

Б

Бабак О. Г. 274
 Базарнова Н. Г. 178
 Баймагамбетова К. 20
 Балковская А. В. 146
 Баранова Е. Н. 274
 Бастракова А. Ю. 76
 Батукаев А. А. 12
 Батукаев М. С. 12
 Бегзат А. Н. 18
 Бейсенбек Е. Б. 8, 10
 Бекенова Л. В. 20
 Белавин П. А. 140
 Белан И. А. 176
 Белинская Е. В. 14
 Белова Л. И. 176
 Бердичевец И. Н. 274
 Берестовой М. А. 16, 244
 Бишимбаева Н. К. 18, 20
 Бободжанова Х. И. 22, 24
 Боднар О. И. 26
 Бойко Е. В. 50
 Бокучава Д. Б. 50
 Большакова Е. В. 28
 Бондаренко В. Ю. 246
 Боровский Г. Б. 268
 Брейгина М. А. 58, 136
 Брель Н. Г. 30, 162
 Бриндза Я. 144
 Бронникова Л. И. 206
 Булахова А. С. 172
 Булко О. В. 132
 Бурыгин Г. Л. 86, 238

В

Вайновская И. Ф. 32, 214
 Василевская Е. Р. 252
 Васильченко Е. В. 204
 Васильченко Е. Н. 34
 Вдовина Н. С. 36
 Ведяшкина О. А. 38
 Веевник А. А. 40, 120, 122
 Верещагина А. В. 204
 Видягина Е. О. 124
 Власова А. Б. 32, 214
 Войников В. К. 168
 Войтехович М. А. 42, 148
 Воронков А. С. 94
 Высоцкая О. Н. 44, 60, 164, 200, 212, 216, 217

Г

Гаджимурадова А. М. 272
 Гайсинский В. В. 48
 Галишев Б. А. 240
 Гаранович И. М. 40
 Гасс О. С. 20
 Геньш К. В. 178
 Глаголева Е. С. 46, 240
 Глоба Е. Б. 48
 Голденкова-Павлова И. В. 16, 82, 244
 Головацкая И. Ф. 50
 Гончарук Е. А. 52
 Горский И. А. 264
 Гра О. А. 82, 244
 Григорьев Г. К. 80
 Григорьев Р. О. 210
 Гриусевич П. В. 42, 166
 Гродецкая Т. А. 248
 Грубинко В. В. 26

Д

Дейнеко Е. В. 140, 142, 174
 Демидова Е. В. 48
 Демидчик В. В. 42, 74, 90, 148, 166, 186, 194, 246, 264
 Деркач Е. В. 54
 Дерябин А. Н. 56
 Дзюбецкий Б. В. 54
 Дитченко Т. И. 282
 Дробот Е. А. 144
 Дубинич В. Л. 198, 284
 Дуплий В. П. 144

Е

Евменьева А. А. 58
 Евсеева Н. В. 238
 Евсюков С. В. 60, 218
 Егорова Н. А. 62
 Емельянова И. С. 28
 Емельянова О. В. 106
 Ермишин А. П. 128
 Ермошин А. А. 64
 Ефимова М. В. 98
 Ефремова Л. Н. 66

Ж

Жабинский В. Н. 264
 Живухина Е. А. 160
 Жужжалова Т. П. 34, 260

З

Заварзин И. В. 254
 Загорская А. А. 140, 142, 174
 Загорская М. С. 62
 Загоскина Н. В. 78, 160
 Зайцева Ю. Г. 70
 Закирова Р. П. 68
 Замбриборщ И. С. 72
 Запрудская Е. В. 132
 Захарова Е. В. 94
 Звонарев С. Н. 74
 Зонтикова С. А. 76
 Зонтиков Д. Н. 76
 Зубарев А. В. 256
 Зубова М. Ю. 78

И

Иванова В. А. 50
 Иванов И. М. 80, 252
 Искакова К. М. 8, 10
 Итальянская Ю. В. 280

К

Кабардаева К. В. 82, 244
 Кабил Ф. 50
 Каган Д. И. 108
 Кадникова Н. Г. 262
 Казакова К. А. 66
 Казаченко А. С. 242
 Каиров У. 18
 Калашникова Е. А. 84
 Капасулы Т. 18
 Карабаев М. К. 20
 Каргаполова К. Ю. 86, 238
 Кардис Т. В. 162

Кастрицкая М. С. 88
 Каухова И. Е. 182
 Кильчевский А. В. 162, 274
 Киракосян Р. Н. 84
 Киргизова И. В. 272
 Кирисюк Ю. В. 90
 Киркач В. В. 124
 Кирпа-Несмиян Т. Н. 132
 Кирьянов П. С. 92
 Киселёва И. С. 64
 Клева О. С. 76
 Клыков В. Н. 274
 Ключин А. Г. 80, 210
 Кобозева Е. В. 156
 Ковалева Л. В. 94
 Ковальская Г. Б. 26
 Ковзунова О. В. 96
 Ковтун И. С. 98
 Козлова О. Н. 214
 Козлов В. А. 100, 198
 Колбанова Е. В. 102
 Колбанов Д. В. 186, 246
 Колесникова Е. О. 34, 260
 Комахин Р. А. 66
 Кондратюк А. В. 100, 198, 284
 Кондрацкая И. П. 134
 Константинов А. В. 92, 104, 106, 108
 Константинова С. В. 46
 Корнацкий С. А. 110
 Корнеева Г. И. 112
 Косандрович С. Ю. 116
 Костень А. А. 186
 Костина Е. Е. 114
 Котенкова Е. А. 234
 Коцупий О. В. 6
 Кочкин Д. В. 46, 48, 80, 210, 240
 Кравцова Л. А. 176
 Красинская Т. А. 116
 Красников А. А. 6
 Криницына А. А. 118
 Куат А. А. 98
 Кубрак С. В. 274
 Кудоярова Г. Р. 242
 Кузнецова Н. А. 148
 Кузнецов В. В. 142, 174
 Кузьменкова С. М. 214
 Кулагин Д. В. 106
 Куличенко И. Е. 230
 Купреенко Н. П. 172
 Кутас Е. Н. 120, 122
 Кухарчик Н. В. 22, 88, 102
 Кучук Н. В. 132

Л

Лабунская Е. А. 240
 Лазарук Г. В. 256
 Ластенко И. И. 146
 Лебедев В. Г. 124, 126
 Левый А. В. 128
 Леконцева Т. Г. 130
 Лёшина Л. Г. 132
 Ли Ч. 18
 Лобачев Ю. В. 114, 238
 Лужанин В. Г. 182
 Лукаткин А. С. 28, 38

М

Маджарова Н. В. 66
 Мазур Т. В. 134
 Майорова А. В. 76
 Максимов Н. М. 58, 136
 Малаева Е. В. 138
 Мальчевский В. А. 220
 Маляровская В. И. 224
 Маренкова Т. В. 140, 142, 174
 Матвеева Н. А. 144
 Матора Л. Ю. 238
 Махонина О. И. 146
 Мацкевич В. С. 74, 148, 194, 246
 Машкина О. С. 150
 Медведева Ю. В. 98
 Месхидзе А. М. 88
 Миронова С. О. 152
 Митра А. 18
 Молканова О. И. 138
 Молкенов А. 18
 Молчан О. В. 132, 282
 Моргун Б. В. 54
 Мохамед Г. Р. А. 154
 Мурасева Д. С. 70, 156
 Мурсалимов С. Р. 142
 Мустафаев О. 82, 244
 Мухаматдинова Е. А. 98

Н

Накисбеков Н. О. 18
 Некрасов Э. В. 158
 Немченко В. В. 176
 Неугодникова Е. А. 64
 Нечаева М. В. 50
 Нечаева Т. Л. 160
 Никитин М. В. 80
 Никишина Т. В. 164
 Никонович Т. В. 162
 Нитовская И. А. 54
 Новикова Т. И. 6, 70, 156
 Новосельский И. Ю. 42, 166

Носов А. В. 16, 140, 142
 Носов А. М. 48, 68, 80, 240, 254
 Нурпеисов И. А. 20

О

Осадчая Т. С. 176
 Осипов В. И. 78
 Остапчук И. Н. 116

П

Павленко О. С. 244
 Павличенко В. В. 168
 Павлова И. А. 170
 Павлова И. В. 172
 Пак М. Э. 242
 Палаева Д. О. 12
 Панин В. М. 280
 Пантелеев С. В. 104
 Пермьякова Н. В. 140, 174
 Першина Л. А. 176
 Петрин Н. И. 178
 Петров Г. В. 108
 Петров С. А. 220
 Петросян М. Т. 180, 190
 Пивоварова Н. С. 182
 Плаксина Т. В. 184
 Повыдыш М. Н. 182
 Подвигина О. А. 196, 250
 Поздняков И. А. 124
 Полевикова Е. Н. 104, 106
 Полубоярова Т. В. 70
 Полухович Ю. В. 128
 Пржевальская Д. А. 186, 246, 264
 Протопопова М. В. 168
 Пушкарева Н. А. 132

Р

Ратушняк Я. И. 144
 Рахимбаев И. Р. 18, 20
 Решетников В. Н. 96, 188, 214
 Ржевский С. Г. 248
 Родькина И. А. 198, 284, 286
 Розов С. М. 140
 Россеева Л. П. 176

С

Саакян Н. Ж. 180, 190
 Савчин Д. Г. 268
 Сагдуллаев Ш. Ш. 68, 192
 Самарина Л. С. 224
 Самохина В. В. 42, 148, 194
 Сатарова Т. Н. 54
 Сащенко М. Н. 196

Светашев В. И. 158
 Семанюк Т. А. 284
 Семанюк Т. В. 100, 198
 Семёнова К. П. 202
 Семенцова М. В. 200
 Сергеева Л. Е. 206
 Сергеева Ю. А. 76
 Сергеев Р. В. 76
 Середа Г. А. 20
 Середа М. М. 204
 Сидорчук Ю. В. 16, 140, 142, 174
 Словохотов И. Ю. 274
 Смагул А. О. 18
 Смирнова А. А. 76
 Смолов А. П. 208
 Собољкова Г. И. 210, 226, 228, 230, 254
 Соколик А. И. 166, 194
 Солдатов В. С. 116
 Соловьёва А. И. 212, 218
 Спивак С. Г. 274
 Спиридович Е. В. 32, 214, 256
 Спринчану Е. К. 216
 Ставцева И. В. 62
 Степанова А. Ю. 218
 Степанов И. В. 224
 Стрельникова С. Р. 66
 Субботин А. М. 220
 Субботина Н. М. 124
 Суворова Г. Н. 222
 Супрун И. И. 224
 Суханова Е. С. 226, 228, 230, 234, 252

Т

Табакцкая Т. М. 150
 Теберекова Т. И. 232
 Тевфик А. Ш. 62
 Тимофеева Г. В. 94
 Титова М. В. 46, 80, 210, 234, 252, 254
 Титок В. В. 120, 122
 Тихомирова Л. И. 36, 152, 178, 202, 232, 236
 Ткаченко О. В. 86, 114, 238
 Томилова С. В. 240
 Третьякова И. Н. 242
 Трофимова Е. Г. 6
 Трофимов Ю. В. 162
 Трубачеева Н. В. 176
 Трунова Т. И. 56
 Трчунян А. 180, 190
 Тузелбаева Ш. С. 8
 Тухтаманова А. С. 240
 Тюрин А. А. 16, 82, 244

У

Уварова Е. А. 140
 Урбанович О. Ю. 268
 Урозалиев Р. А. 20
 Уснич С. Л. 246

Ф

Фадеев В. С. 82, 244
 Фардеева М. Б. 258
 Федоров А. В. 130
 Федосеева И. В. 268
 Федулова Т. П. 248, 250
 Филипеня В. Л. 146, 214
 Филиппова С. Н. 282
 Фоменков А. А. 16, 80, 140, 142, 234, 252

Х

Хаитов А. Ё. 22
 Халилуев М. Р. 274
 Харитонов Т. Д. 254
 Хозеева С. А. 174
 Хоменко Л. А. 206
 Хотляник Н. В. 214, 256
 Хрипач В. А. 264
 Хрупа Д. А. 220
 Хуанг К. 18
 Худякова А. В. 130
 Хуснетдинова Л. З. 258

Ц

Цыбульская Л. А. 264

Ч

Черкасова Н. Н. 260
 Чернобай Н. А. 262
 Чернобутова Е. И. 254
 Черноусова И. А. 146
 Черныш М. А. 186, 246, 264
 Черчель В. Ю. 54
 Чижик О. В. 30, 32, 134, 266
 Чудинов В. А. 20
 Чурикова О. А. 118

Ш

Шабуня П. С. 144
 Шашко А. Ю. 246
 Швидченко В. К. 272
 Шелихан Л. А. 158
 Шематорова Е. К. 274
 Шестибратов К. А. 124, 126
 Шестопап О. Л. 72

Ширнина И. В. 270
Шишлова-Соколовская А. М. 268
Шиш С. Н. 144
Шпаковский Г. В. 274
Шпаковский Д. Г. 274
Шпитальная Т. В. 40
Шуклина А. С. 276
Шумило Н. А. 234
Шуплецова О. Н. 278
Шургин А. И. 76
Шутова А. Г. 144
Щеголев С. Ю. 238

Э
.....
Эльконин Л. А. 280
Эшбакова К. А. 68

Ю
.....
Юрин В. М. 282
Юхимук А. Н. 214

Я
.....
Якимова О. В. 62
Яковлева Г. А. 284
Яхонт Ю. В. 100, 286

Index

A

Abakumov S. N. 177
 Abdelazeez W. M. A. 5
 Ahmetova A. B. 9, 11
 Akhiyarova G. R. 243
 Aksenova M. A. 161
 Aloyan S. 181
 Ambros E. V. 7
 Amirbekov A. S. 19
 Anapiyayev B. B. 9, 11
 Angelis K. J. 74, 75
 Antipin M. I. 165
 Antsipovich V. V. 101
 Azizbekian S. G. 97

B

Babak O. G. 275
 Bagheri K. 290, 291
 Balkovskaya A. V. 147
 Bandarenka V. Yu. 247
 Baranova E. N. 275
 Bastrakova A. U. 77
 Batukaev A. A. 13
 Batukaev M. S. 13
 Baymagambetova K. 21
 Bazarnova N. G. 179
 Begzat A. N. 19
 Beisenbek Y. B. 9, 11
 Bekenova L. V. 21
 Belan I. A. 177
 Belavin P. A. 141
 Belinskaya E. V. 15
 Berdichevets I. N. 275
 Berestovoy M. A. 17, 245
 Bindza J. 145
 Bishimbayeva N. K. 19, 21
 Bobodzhanova Kh. I. 23, 25
 Bodnar O. I. 27
 Bokuchava D. B. 51
 Bolshakova E. V. 29
 Borovsky G. B. 269
 Boyko E. V. 51
 Brel N. G. 31, 163
 Breygina M. A. 59, 137
 Bronnikova L. I. 207
 Bulahova A. S. 173
 Bulko O. V. 133
 Burygin G. L. 87, 239

C

Charnysh M. A. 187, 247, 265
 Cherchel V. Yu. 55
 Cherkasova N. N. 261
 Chernobai N. A. 263
 Chernoburova E. I. 255
 Chernousova I. A. 147
 Chizhik O. V. 31, 33, 135, 267
 Chudinov V. A. 21
 Churikova O. A. 119

D

Danafar H. 291
 Dapkuniene S. 288
 Deineko E. V. 141, 143, 175
 Demidchik V. V. 43, 75, 91, 149, 167, 187, 195,
 247, 265, 289
 Demidova E. V. 49
 Derkach K. V. 55
 Deryabin A. N. 57
 Ditchenko T. I. 283
 Drobot K. A. 145
 Dubinich V. L. 199, 285
 Dubrovna O. V. 300
 Duplij V. P. 145
 Dzyubetsky B. V. 55

E

Efimova M. V. 99
 Efremova L. N. 67
 Elkonin L. A. 281
 Emelyanova I. S. 29
 Emelyanova O. V. 107
 Ermoshin A. A. 65
 Eshbakova K. A. 69
 Evmenyeva A. A. 59
 Evseeva N. V. 239
 Evsyukov S. V. 61, 219

F

Fadeev V. S. 83, 245
 Fardeeva M. B. 259
 Fedorov A. V. 131
 Fedoseyeva I. V. 269
 Fedulova T. P. 249, 251
 Filipenia V. L. 147, 215
 Filippova S. N. 283
 Fomenkov A. A. 17, 81, 141, 143, 235, 253

G

.....
 Gaisinsky V. V. 49
 Gajdosova A. 302
 Gajimuradova A. M. 273
 Galishev B. A. 241
 Garanovich I. M. 41
 Gass O. S. 21
 Gensh K. V. 179
 Tikhomirov L. I. 179
 Gharari Z. 290, 291
 Glagoleva E. S. 47, 241
 Globa E. B. 49
 Goldenkova-Pavlova I. V. 17, 83, 245
 Golovatskaya I. F. 51
 Goncharuk E. A. 53
 Gra O. A. 83, 245
 Grigoriev G. K. 81
 Grigoryev R. O. 211
 Grodetskaya T. A. 249
 Grubinko V. V. 27

H

.....
 Horski I. A. 265
 Hryvusevich P. V. 43, 167
 Huang K. 19
 Hyung-Eun Kim 292

I

.....
 Iskakova K. M. 9, 11
 Italianskaya Yu. V. 281
 Ivanova V. A. 51
 Ivanov I. M. 81, 253

J

.....
 Jae-Heok Shin 292

K

.....
 Kabardaeva K. V. 83, 245
 Kabil F. 51
 Kadnikova N. G. 263
 Kagan D. I. 109
 Kairov U. 19
 Kalashnikova E. A. 85, 299
 Kalbanov D. V. 247
 Kandratiuk A. V. 199, 285
 Kandratskaya I. P. 135
 Kapasuly T. 19
 Karabayev M. K. 21
 Kardis T. V. 163
 Kargapolova K. Yu. 87, 239
 Karneyeva H. I. 113
 Kastritskaya M. S. 89

Kauhova I. E. 183
 Kazachenko A. S. 243
 Kazakova K. A. 67
 Keon-Il Kim 293
 Khaitov A. E. 23
 Khaliluev M. R. 275
 Kharitonov T. D. 255
 Khatlianik N. V. 257
 Khomenko L. A. 207
 Khotlyanik N. V. 215
 Khozeeva S. A. 175
 Khripach V. A. 265
 Khrupa D. A. 221
 Khudyakova A. V. 131
 Khusnetdinova L. Z. 259
 Kilchevsky A. V. 163, 275
 Kirakosyan R. N. 85
 Kirgizova I. V. 273
 Kiriziy D. A. 300
 Kirkach V. V. 125
 Kiryanov P. S. 93
 Kirysiuk Y. V. 91
 Kiseleva I. S. 65
 Kleva O. S. 77
 Klykov V. N. 275
 Klyushin A. G. 81, 211
 Kobozeva E. V. 157
 Kochkin D. V. 47, 49, 81, 211, 241
 Kolbanova E. V. 103
 Kolbanov D. V. 187
 Kolesnikova E. O. 35, 261
 Komakhin R. A. 67
 Kondratiuk A. V. 101
 Konstantinova S. V. 47
 Konstantinov A. V. 93, 105, 107, 109
 Kornatskiy S. A. 111
 Kosandrovich S. U. 117
 Kosten A. A. 187
 Kostina E. E. 115
 Kotenkova E. A. 235
 Kotsupy O. V. 7
 Kovaleva L. V. 95
 Kovalskaya H. B. 27
 Kovtun I. S. 99
 Kovzunova O. V. 97
 Kozlova O. N. 215
 Kozlov V. A. 101, 199
 Krasinskaya T. A. 1 117
 Krasnikov A. A. 7
 Krinitsina A. A. 119
 Kuat A. A. 99
 Kubrak S. V. 275
 Kuchuk M. V. 133, 302
 Kudoyarova G. R. 243
 Kukharchik N. V. 23, 89, 103
 Kulagin D. V. 107

Kulesh S. S. 300
 Kulichenko I. E. 231
 Kupreenko N. P. 173
 Kutas E. N. 121, 123
 Kuzmenkova S. M. 215
 Kuznetsov V. V. 143, 175
 Kuzniatsova N. A. 149
 Kyrpa-Nesmijan T. N. 133

L

Labunskaya E. A. 241
 Lastenko I. I. 147
 Lazaruk H. V. 257
 Lebedev V. G. 125, 127
 Lekontseva T. G. 131
 Levy A. V. 129
 Li Ch. 19
 Lioshyna L. G. 133
 Lobachev Yu. V. 115, 239
 Lukatkin A. S. 29, 39
 Luzhanin V. G. 183

M

Mackievic V. S. 75, 149, 195, 247
 Madzharova N. V. 67
 Mahonina O. I. 147
 Maksimov N. M. 59, 137
 Malaeva E. V. 139
 Malchevsky V. A. 221
 Malyarovskaya V. I. 225
 Marenkova T. V. 141, 143, 175
 Mashkina O. S. 151
 Matora L. Yu. 239
 Matvieieva N. A. 145
 Mayorova A. V. 77
 Mazur T. V. 135
 Medvedeva Yu. V. 99
 Meskhidze A. M. 89
 Mironova S. O. 153
 Mitra A. 19
 Mohamed G. R. A. 155
 Molchan O. V. 133, 283
 Molkanova O. I. 139
 Molkenov A. 19
 Morgun B. V. 55
 Muhamatdinova E. A. 99
 Muraseva D. S. 71, 157
 Mursalimov S. R. 143
 Mustafaev O. 83, 245

N

Nakisbekov N. O. 19
 Navaselskiy I. Y. 167

Navaselsky I. Yu. 43
 Nechaeva M. V. 51
 Nechaeva T. L. 161
 Nekrasov E. V. 159
 Nemchenko V. V. 177
 Neugodnikova E. A. 65
 Nikanovich T. V. 163
 Nikishina T. V. 165
 Nikitin M. V. 81
 Nitovskaya I. O. 55
 Nosov A. M. 49, 69, 81, 241, 255
 Nosov A. V. 17, 141, 143
 Novikova T. I. 7, 71, 157
 Nurpeisov I. A. 21

O

Osadchaya T. S. 177
 Ossipov V. I. 79
 Ostapchuk I. N. 117

P

Pak M. E. 243
 Palaeva D. O. 13
 Panin V. M. 281
 Panis B. 294
 Panteleev S. V. 105
 Pavlenko O. S. 245
 Pavlichenko V. V. 169
 Pavlova I. A. 171
 Pavlova I. V. 173
 Permyakova N. V. 141, 175
 Pershina L. A. 177
 Petrin N. I. 179
 Petrosyan M. T. 181, 191
 Petrov G. V. 109
 Petrov S. A. 221
 Pivovarova N. S. 183
 Plaksina T. V. 185
 Podvigina O. A. 197, 251
 Polevikova E. N. 105, 107
 Poluboyarova T. V. 71
 Polyukhovich Yu. V. 129
 Popova E. 294
 Povydysh M. N. 183
 Pozdnyakov I. A. 125
 Priadkina G. O. 300
 Protopopova M. V. 169
 Przhevskaya D. A. 187, 247, 265
 Puchkareva N. A. 133

R

Rakhimbayev I. R. 19, 21
 Ratushnyak Ya. I. 145

Reshetnikov V. N. 97, 189, 215
 Rodzkina I. A. 199, 285, 287
 Rosseeva L. P. 177
 Rozov S. M. 141
 Rzhovsky S. G. 249

Ѕ

Sagdullaev Sh. Sh. 69, 193
 Sahakyan N. Zh. 181, 191
 Samarina L. S. 225
 Samokhina V. V. 43, 149, 195
 Sashchenko M. N. 197
 Satarova T. M. 55
 Savchin D. G. 269
 Schestibratov K. A. 125
 Semanyuk T. V. 101, 199, 285
 Semenova K. P. 203
 Sementsova M. V. 201
 Sereda G. A. 21
 Sereda M. M. 205
 Sergeeva L. E. 207
 Sergeeva U. A. 77
 Sergeev R. V. 77
 Shabunya P. S. 145
 Sharafi A. 290, 291, 295, 296
 Shashko A. Yu. 247
 Shchyogolev S. Yu. 239
 Shelikhan L. A. 159
 Shematorova E. K. 275
 Shen H. L. 301
 Shestibratov K. A. 127
 Shestopal O. L. 73
 Shevchenko N. O. 297
 Shirnina I. V. 271
 Shishlova-Sokolovskaya A. M. 269
 Shpakovski D. G. 275
 Shpakovski G. V. 275
 Shpitalnaya T. V. 41
 Shri Mohan Jain 298
 Shuklina A. S. 277
 Shulgina A. A. 299
 Shumilo N. A. 235
 Shupletsova O. N. 279
 Shurgin A. I. 77
 Shutava H. G. 145
 Shvidchenko V. K. 273
 Shysh S. N. 145
 Sidorchuk Yu. V. 17, 141, 143, 175
 Slovokhotov I. Yu. 275
 Smagul A. O. 19
 Smirnova A. V. 77
 Smolov A. P. 209
 Sobolkova G. I. 211, 227, 255, 229, 231
 Sokolik A. I. 167, 195
 Sokolovska-Sergiienko O. G. 300

Soldatov V. S. 117
 Solov'eva A. I. 213, 219
 So-Young Park 292, 293
 Spiridovich E. V. 33, 215, 257
 Spivak S. G. 275
 Sprinchanou E. K. 217
 Stasik O. O. 300
 Stavtseva I. V. 63
 Stepanova A. Yu. 219
 Stepanov I. V. 225
 Strelnikova S. R. 67
 Subbotin A. M. 221
 Subbotina N. M. 125
 Sukhanova E. S. 227, 229, 231, 235, 253
 Suprun I. I. 225
 Suvorova G. N. 223
 Svetashev V. I. 159

Т

Tabatskaya T. M. 151
 Tarakanov I. G. 299
 Teberekova T. I. 233
 Tefvik A. Sh. 63
 Thanh-Tam Ho 293
 Tikhomirova L. I. 37, 153, 203, 233, 237
 Timofeeva G. V. 95
 Titok V. V. 121, 123
 Titova M. V. 47, 81, 211, 235, 253, 255
 Tkachenko O. V. 87, 115, 239
 Tomilova S. V. 241
 Trchounian A. 181, 191
 Tretyakova I. N. 243
 Trofimova E. G. 7
 Trofimov Yu. V. 163
 Trubacheeva N. V. 177
 Trunova T. I. 57
 Tsybul'skaya L. A. 265
 Tuhtamanova A. S. 241
 Tyurin A. A. 17, 83, 245
 Tyzelbayeva S. S. 9

У

Urbanovich O. Yu. 269
 Urozaliyev R. A. 21
 Usnich S. L. 247
 Uvarova E. A. 141

У

Vainovskaya I. F. 33
 Vaitsiakhovich M. A. 43, 149
 Vasilchenko E. N. 35
 Vasilchenko E. V. 205
 Vasilevskaya E. R. 253

Vaynovskaya I. F. 215
 Vdovina N. S. 37
 Vedyashkina O. A. 39
 Veevnik A. A. 41
 Vereshchagina A. V. 205
 Veyevnik A. A. 121, 123
 Vidyagina E. O. 125
 Vlasava N. B. 33, 215
 Voinikov V. K. 169
 Voronkov A. S. 95
 Vysotskaya O. N. 45, 61, 165, 201, 213

Y

Yakhont Yu. V. 101, 287
 Yakimova O. V. 63
 Yakovleva G. A. 285
 Yang L. 301
 Yaroshko O. 295, 296, 302
 Yazdinejad A. 290, 291
 Yegorova N. A. 63
 Yermishin A. P. 129
 Young-Sik Gil 292
 Yukhimuk A. N. 215
 Yun-Ji Park 292
 Yurin V. M. 283

Z

Zacharova E. V. 95
 Zagorskaya A. A. 141, 143, 175
 Zagorskaya M. S. 63
 Zagoskina N. V. 79, 161
 Zakirova R. P. 69
 Zambriborshch I. S. 73
 Zaprudskaja E. V. 133
 Zavarzin I. V. 255
 Zaytseva Y. G. 71
 Zhabinskii V. N. 265
 Zhang P. 301
 Zhivukhina E. A. 161
 Zhuzhzhhalova T. P. 35, 261
 Ziemyte I. 288
 Zontikova S. A. 77
 Zontikov D. N. 77
 Zubarev A. V. 257
 Zubova M. Yu. 79
 Zvonarev S. N. 75

Оглавление

Абделаиз В. М. А. Каллусообразование <i>Hyoscyamus muticus</i> L. в культуре <i>in vitro</i>	4
Abdelazeez W. M. A. Induction of callus from <i>Hyoscyamus muticus</i> L. culture <i>in vitro</i>	5
Амброс Е. В., Коцупий О. В., Красников А. А., Трофимова Е. Г., Новикова Т. И. Росторегулирующая активность кремнийсодержащих механокомпозитов на растительной основе в условиях <i>in vitro</i> у <i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i> Duch.	6
Ambros E. V., Kotsupy O. V., Krasnikov A. A., Trofimova E. G., Novikova T. I. <i>In vitro</i> growth regulating activity of silica-based mechanocomposites from vegetable raw materials in <i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i> Duch.	7
Анапияев Б. Б., Исакова К. М., Тузелбаева Ш. С., Ахметова А. Б., Бейсенбек Е. Б. Создание и изучение рабочей коллекции генотипов сахарного сорго (<i>Sorghum bicolor</i> L.) для производства биоэтанола	8
Anapiyayev B. B., Iskakova K. M., Tyzelbayeva S. S., Ahmetova A. B., Beisenbek Y. B. Creation and study of a working collection of sugar sorghum genotypes (<i>Sorghum bicolor</i> L.) for the bioethanolproduction	9
Анапияев Б. Б., Исакова К. М., Ахметова А. Б., Бейсенбек Е. Б. Использование гаплоидной биотехнологии на основе культуры изолированных микроспор <i>in vitro</i> в селекции на скороспелость <i>Triticum aestivum</i> L.	10
Anapiyayev B. B., Iskakova K. M., Ahmetova A. B., Beisenbek Y. B. Applying the haploid biotechnology based on the culture of isolated microspores <i>in vitro</i> in breeding for early maturation of <i>Triticum aestivum</i> L.	11
Батукаев А. А., Батукаев М. С., Палаева Д. О. Использование регуляторов роста при размножении винограда методом <i>in vitro</i>	12
Batukaev A. A., Batukaev M. S., Palaeva D. O. Use of growth regulators in grapes grinding by <i>in vitro</i> method	13
Белинская Е. В. Особенности морфогенеза в культуре <i>in vitro</i> пыльников ярового ячменя при использовании питательных сред с различными гелеобразующими компонентами	14
Belinskaya E. V. Peculiarities of morphogenesis in spring barley anther culture <i>in vitro</i> on the media with different solidifying agents	15
Берестовой М. А., Тюрин А. А., Сидорчук Ю. В., Фоменков А. А., Носов А. В., Голденкова-Павлова И. В. Использование транзientной экспрессии генов для визуализации локализации белков в растительной клетке	16
Berestovoy M. A., Tyurin A. A., Sidorchuk Yu. V., Fomenkov A. A., Nosov A. V., Goldenkova-Pavlova I. V. Transient gene expression for visualization of protein localization in plant cell	17

Бишимбаева Н. К., Митра А., Каиров У., Накисбеков Н. О., Молкенов А., Ли Ч., Хуанг К., Бегзат А. Н., Капасулы Т., Амирбеков А. С., Смагул А. О., Рахимбаев И. Р. Изменения в экспрессии генов в ходе индукции и длительного поддержания эмбриогенного состояния в каллусах пшеницы	18
<i>Bishimbayeva N. K., Mitra A., Kairov U., Nakisbekov N. O., Molkenov A., Li Ch., Huang K., Begzat A. N., Kapasuly T., Amirbekov A. S., Smagul A. O., Rakhimbayev I. R.</i> Alterations in gene expression during the induction and long-term maintenance of embryogenic state in wheat calli	19
Бишимбаева Н. К., Баймагамбетова К., Нурпеисов И. А., Чудинов В. А., Середа Г. А., Бекенова Л. В., Гасс О. С., Карабаев М. К., Урозалиев Р. А., Рахимбаев И. Р. Создание скороспелых продуктивных форм мягкой яровой пшеницы с использованием клеточной технологии	20
<i>Bishimbayeva N. K., Baymagambetova K., Nurpeisov I. A., Chudinov V. A., Sereda G. A., Bekenova L. V., Gass O. S., Karabayev M. K., Urozaliyev R. A., Rakhimbayev I. R.</i> Creation of early maturing productive forms of soft spring wheat using the cell technology	21
Бободжанова Х. И., Кухарчик Н. В., Хаитов А. Ё. Влияние концентрации аммонийного азота на ризогенез микропобегов винограда	22
<i>Bobodzhanova Kh. I., Kukharchik N. V., Khaitov A. E.</i> Influence of ammonium nitrogen concentration on rhizogenesis of micro shoots of grapes	23
Бободжанова Х. И. Использование методов биотехнологии при создании коллекции оздоровленных сортов винограда в Таджикистане	24
<i>Bobodzhanova Kh. I.</i> Use of biotechnology methods in creating a collection of healthy grapes in Tajikistan	25
Боднар О. И., Ковальская Г. Б., Грубинко В. В. Особенности липидного метаболизма у <i>Chlorella vulgaris</i> при действии микроэлементов	26
<i>Bodnar O. I., Kovalskaya G. B., Grubinko V. V.</i> Features of lipid metabolism in <i>Chlorella vulgaris</i> Beij. under the action of trace elements	27
Большакова Е. В., Емельянова И. С., Лукаткин А. С. Эффективность регуляторов роста при клональном размножении декоративных орхидей в культуре <i>in vitro</i>	28
<i>Bolshakova E. V., Emelyanova I. S., Lukatkin A. S.</i> Efficacy of growth regulators in the clonal propagation of decorative orchids <i>in vitro</i>	29
Брель Н. Г., Чижик О. В. Культивирование <i>in vitro</i> тополя <i>Populus pseudo-cathayana</i> × <i>Populus deltoides</i> Barry cv. <i>Shan Hai Guan</i> в Центральном ботаническом саду НАН Беларуси	30
<i>Brel N. G., Chizhik O. V.</i> Cultivation <i>in vitro</i> of poplar <i>Populus pseudo-cathayana</i> × <i>Populus deltoides</i> Barry cv. <i>Shan Hai Guan</i> in the Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus	31
Вайновская И. Ф., Чижик О. В., Власова А. Б., Спиридович Е. В. Введение в культуру <i>in vitro</i> редкого вида <i>Gentiana cruciata</i> L.	32

Vainovskaya I. F., Chizhik O. V., Vlasava N. B., Spiridovich E. V. Introduction to a culture <i>in vitro</i> of a rare species of <i>Gentiana cruciata</i> L.	33
Васильченко Е. Н., Колесникова Е. О., Жужжалова Т. П. Молекулярно-биохимические особенности гаплоидных регенерантов сахарной свёклы	34
Vasilchenko E. N., Kolesnikova E. O., Zhuzhzhhalova T. P. Molecular-biochemical features of sugar beet haploid regenerants	35
Вдовина Н. С., Тухомирова Л. И. Фитохимическое исследование биотехнологического сырья <i>Potentilla longifolia</i> Willd.	36
Vdovina N. S., Tikhomirova L. I. Phytochemical research of biotechnological raw materials <i>Potentilla longifolia</i> Willd.	37
Ведяшкина О. А., Лукаткин А. С. Сравнительная характеристика морфогенеза трансформированных и исходной линий табака <i>in vitro</i>	38
Vedyashkina O. A., Lukatkin A. S. Comparative morphogenesis characteristics of transformed and Wild type tobacco lines <i>in vitro</i>	39
Веевник А. А., Гаранович И. М., Шпитальная Т. В. Ассортимент древесных интродуцентов для микроклонального размножения в ЦБС НАН Беларуси	40
Veevnik A. A., Garanovich I. M., Shpitalnaya T. V. An assortment of wood introducents for microclonal propagation in the CBG of the NAS of Belarus	41
Войтехович М. А., Гриусевич П. В., Новосельский И. Ю., Самохина В. В., Демидчик В. В. Генерация цитоплазматических Ca ²⁺ -сигналов и изменение ростовых процессов под действием экзогенного аскорбата в корнях проростков <i>Arabidopsis thaliana</i> L. Heynh., культивируемых <i>in vitro</i>	42
Vaitsiakhovich M. A., Hryvusevich P. V., Navaselsky I. Yu., Samokhina V. V., Demidchik V. V. Generation of cytosolic Ca ²⁺ signals and modification of growth induced by exogenously-applied ascorbate in roots of <i>Arabidopsis thaliana</i> plants cultivated <i>in vitro</i>	43
Высоцкая О. Н. Долговременное сохранение растительного материала в криобанке Института физиологии растений Российской академии наук	44
Vysotskaya O. N. Long-term preservation of plant material in cryobank of Plant Physiology institute of Russian Academy of Science	45
Глаголева Е. С., Константинова С. В., Титова М. В., Кочкин Д. В. Влияние гормонального состава среды выращивания на накопление гинзенозидов в суспензионной культуре клеток японского женьшеня (<i>Panax japonicus</i> var. <i>repens</i>)	46
Glagoleva E. S., Konstantinova S. V., Titova M. V., Kochkin D. V. The effect of growth media phytohormone composition on ginsenoside profile in <i>Panax japonicus</i> suspension culture	47

Глоба Е. Б., Демидова Е. В., Гайсинский В. В., Кочкин Д. В., Носов А. М. Получение и характеристика культуры клеток тиса Валиха <i>Taxus Walichiana</i> — продуцента противоопухолевых дитерпеноидов	48
<i>Globa E. B., Demidova E. V., Gaisinsky V. V., Kochkin D. V., Nosov A. M.</i> Obtaining and characterization of plant cell cultures of <i>Taxus Walichiana</i> — a producers of antitumor diterpenoids	49
Головацкая И. Ф., Бокучава Д. Б., Нечаева М. В., Бойко Е. В., Иванова В. А., Кабил Ф. Оптимизация условий культивирования <i>Astragalus alopecurus in vitro</i>	50
<i>Golovatskaya I. F., Bokuchava D. B., Nechaeva M. V., Boyko E. V., Ivanova V. A., Kabil F.</i> Optimization of cultivation conditions for <i>Astragalus alopecurus in vitro</i>	51
Гончарук Е. А. Особенности структурной организации <i>in vitro</i> проростков льна-долгунца и льна масличного	52
<i>Goncharuk E. A.</i> Features of the structural organization sprout fiber flax and seed flax <i>in vitro</i>	53
Деркач Е. В., Черчель В. Ю., Дзюбецкий Б. В., Моргун Б. В., Нитовская И. А., Сатарова Т. Н. Характеристика трансгенных растений кукурузы в поколениях от самоопыления	54
<i>Derkach K. V., Cherchel V. Yu., Dzyubetsky B. V., Morgun B. V., Nitovskaya I. O., Satarova T. M.</i> Characteristics of maize transgenic plants in generations from self-pollination	55
Дерябин А. Н., Трунова Т. И. Дрожжевой ген <i>suc2</i> , кодирующий внеклеточную инвертазу, влияет на распределение сахаров в вегетативных органах трансформированных растений картофеля <i>in vitro</i>	56
<i>Deryabin A. N., Trunova T. I.</i> Yeast gene <i>suc2</i> encoding cell-wall invertase influences on sugars distribution in vegetative organs of transformed potato plants <i>in vitro</i>	57
Евменьева А. А., Максимов Н. М., Брейгина М. А. Особенности редокс-регуляции ранних этапов прорастания пыльцевых зерен ели голубой	58
<i>Evmenyeva A. A., Maksimov N. M., Breygina M. A.</i> Redox-regulation of pollen germination in <i>Picea pungens</i> at early stages	59
Евсюков С. В., Высоцкая О. Н. Криосохранение конгломератов клеток, полученных из побегов рябины (<i>Sorbus L.</i>), культивируемых <i>in vitro</i>	60
<i>Evsyukov S. V., Vysotskaya O. N.</i> Cryopreservation of cell conglomerates derived from rowan shoots (<i>Sorbus L.</i>) cultured <i>in vitro</i>	61
Егорова Н. А., Якимова О. В., Ставцева И. В., Загорская М. С., Тевфик А. Ш. Некоторые аспекты размножения <i>in vitro</i> сортов и селекционных образцов эфиромасличных растений семейства <i>Lamiaceae</i>	62
<i>Yegorova N. A., Yakimova O. V., Stavtseva I. V., Zagorskaya M. S., Tefvik A. Sh.</i> Some aspects of propagation <i>in vitro</i> for cultivars and breeding samples of essential oil plants in the family <i>Lamiaceae</i>	63

Ермошин А. А., Неугодникова Е. А., Киселёва И. С. Устойчивость растений <i>Trifolium repens</i> L., полученных путем клеточной селекции, к ионам меди	64
<i>Ermoshin A. A., Neugodnikova E. A., Kiseleva I. S.</i> Tolerance to copper ions in <i>Trifolium repens</i> L. plants, obtained by cell selection	65
Ефремова Л. Н., Казакова К. А., Маджарова Н. В., Стрельникова С. Р., Комахин Р. А. Новые промоторы генов антимикробных пептидов из <i>Stellaria media</i> L. для генетической трансформации растений	66
<i>Efremova L. N., Madzharova N. V., Kazakova K. A., Strelnikova S. R., Komakhin R. A.</i> New promoters of antimicrobial peptides genes from <i>Stellaria media</i> L. for genetic transformation of plants	67
Закирова Р. П., Эшбакова К. А., Сагдуллаев Ш. Ш., Носов А. М. Физиолого-биохимические особенности каллусных тканей <i>Ajuga turkestanica</i>	68
<i>Zakirova R. P., Eshbakova K. A., Sagdullaev Sh. Sh., Nosov A. M.</i> Physiological and biochemical features of callus tissue <i>Ajuga turkestanica</i>	69
Зайцева Ю. Г., Полубоярова Т. В., Мурасева Д. С., Новикова Т. И. Индукция морфогенеза <i>in vitro</i> и гистологический анализ процессов регенерации из флоральных эксплантов <i>Rhododendron dauricum</i> L.	70
<i>Zaytseva Y. G., Poluboyarova T. V., Muraseva D. S., Novikova T. I.</i> Induction of <i>in vitro</i> morphogenesis and histological analysis of regeneration processes from <i>Rhododendron dauricum</i> L. floral explant	71
Замбриборщ И. С., Шестопал О. Л. Использование метода гаплоидии (андрогенез <i>in vitro</i>) в селекционном процессе злаковых культур Юга Украины	72
<i>Zambriborshch I. S., Shestopal O. L.</i> Using of the haploid method (androgenesis <i>in vitro</i>) in the selection process of cereals in the South of Ukraine	73
Звонарев С. Н., Мацкевич В. С., Ангелис К. J., Демидчик В. В. Анализ изменения стабильности ДНК в клетках культуры протонемы мха <i>Physcomitrella patens</i> при засолении	74
<i>Zvonarev S. N., Mackievic V. S., Angelis K. J., Demidchik V. V.</i> NaCl causes DNA instability in the protonema cells of moss <i>Physcomitrella patens</i>	75
Зонтиков Д. Н., Зонтикова С. А., Шургин А. И., Сергеева Ю. А., Бастракова А. Ю., Клева О. С., Майорова А. В., Смирнова А. А., Сергеев Р. В. Клональное микроразмножение <i>Thuja occidentalis</i> L.	76
<i>Zontikov D. N., Zontikova S. A., Shurgin A. I., Sergeeva U. A., Bastrakova A. U., Kleva O. S., Mayorova A. V., Smirnova A. V., Sergeev R. V.</i> Microcloning propagation of <i>Thuja occidentalis</i> L.	77
Зубова М. Ю., Осипов В. И., Загоскина Н. В. Флаван-3-олы в каллусных культурах <i>Camellia sinensis</i> L., выращиваемых в темноте и перенесенных в световые условия	78

Zubova M. Yu., Ossipov V. I., Zagoskina N. V. Flavan-3-ol in callus cultures of <i>Camellia sinensis</i> L. grown in the dark and transferred to light conditions	79
Иванов И. М., Григорьев Г. К., Носов А. М., Кочкин Д. В., Титова М. В., Клюшин А. Г., Фоменков А. А., Никитин М. В. Изучение фармакологического действия экстракта биомассы штамма суспензионной культуры клеток ИФР-ДМ-05-про <i>Dioscorea deltoidea</i> Wall на модели язвенного колита у крыс	80
Ivanov I. M., Grigoriev G. K., Nosov A. M., Kochkin D. V., Titova M. V., Klyushin A. G., Fomenkov A. A., Nikitin M. V. Studying of pharmacological effect of extract of biomass of a strain of suspension culture of cells IFR-DM-05-pro of <i>Dioscorea deltoidea</i> Wall on model of ulcer colitis at rats	81
Кабардаева К. В., Тюрин А. А., Гра О. А., Фадеев В. С., Мустафаев О., Голденкова-Павлова И. В. Поиск мотивов в 5'-НТО для регуляции экспрессии генов растений	82
Kabardaeva K. V., Tyurin A. A., Gra O. A., Fadeev V. S., Mustafaev O., Goldenkova-Pavlova I. V. The search of motifs in the 5'-UTR for the regulation of plants genes expression	83
Калашникова Е. А., Киракосян Р. Н. Действие растительных экстрактов <i>Withania somnifera</i> L. на раковые клетки человека	84
Kalashnikova E. A., Kirakosyan R. N. Effects of herbal extracts <i>Withania somnifera</i> L. on human cancer cells	85
Каргаполова К. Ю., Ткаченко О. В., Бурьгин Г. Л. Использование микроорганизмов для повышения эффективности метода клонального микроразмножения картофеля	86
Kargapolova K. Yu., Tkachenko O. V., Burygin G. L. The use of microorganisms to increase the efficiency of the clonal micropropagation method potato	87
Кастрицкая М. С., Кухарчик Н. В., Месхидзе А. М. Введение в культуру <i>in vitro</i> фейхоа сорта 'Кулиджи'	88
Kastritskaya M. S., Kukharchik N. V., Meskhidze A. M. Initiation of <i>in vitro</i> culture of feyjoa cultivar 'Coolidge'	89
Кирисюк Ю. В., Демидчик В. В. Эффект наночастиц меди на ростовые характеристики калусной культуры, полученной из незрелых зародышей <i>Triticum aestivum</i> L.	90
Kiryshuk Y. V., Demidchik V. V. The effect of copper nanoparticles on the growth characteristics of a callus culture obtained from immature embryos of <i>Triticum aestivum</i> L.	91
Кирьянов П. С., Константинов А. В. Элиминация контаминирующих бактерий рода <i>Lactobacillus</i> ssp. с применением различных антибиотиков и приемов культивирования	92
Kiryaynov P. S., Konstantinov A. V. Elimination of contaminating bacteria of the genus <i>Lactobacillus</i> ssp. with application of various antibiotics and cultivation methods	93

Ковалева Л. В., Тимофеева Г. В., Захарова Е. В., Воронков А. С. ИУК и АБК стимулируют прорастание <i>in vitro</i> мужского гаметофита петунии, активируя Ca ²⁺ -зависимые K ⁺ - каналы и модулируя активность H ⁺ -АТФазы плазмалеммы	94
Kovaleva L. V., Timofeeva G. V., Zacharova E. V., Voronkov A. S. IAA and ABA stimulate <i>in vitro</i> germination of petunia male gametophyte by activating Ca ²⁺ dependent K ⁺ -channels and by modulating the activity of PM H ⁺ -ATPase	95
Ковзунова О. В., Решетников В. Н., Азизбекян С. Г. Влияние наночастиц металлов на вторичный метаболизм <i>Silybum marianum</i>	96
Kovzunova O. V., Reshetnikov V. N., Azizbekian S. G. Influence of metal's nanoparticles on <i>Silybum marianum</i> secondary metabolism	97
Ковтун И. С., Куат А. А., Мухаматдинова Е. А., Медведева Ю. В., Ефимова М. В. Сравнение устойчивости проростков среднеспелых сортов картофеля к хлоридному засолению в культуре <i>in vitro</i>	98
Kovtun I. S., Kuat A. A., Muhamatdinova E. A., Medvedeva Yu. V., Efimova M. V. Comparison of medium-ripened varieties of potato regenerate resistance to chloride salinization <i>in vitro</i>	99
Козлов В. А., Анципович В. В., Семанюк Т. В., Яхонт Ю. В., Кондратюк А. В. Коллекция Республиканского генетического банка картофеля, поддерживаемая в культуре <i>in vitro</i>	100
Kozlov V. A., Antsipovich V. V., Semanyuk T. V., Yakhont Yu. V., Kondratiuk A. V. Maintaining of the Republican collection of potato genebank in culture <i>in vitro</i>	101
Колбанова Е. В., Кухарчик Н. В. Адаптация <i>ex vitro</i> растений-регенерантов жимолости синей (<i>Lonicera caerulea</i> L.)	102
Kolbanova E. V., Kukharchyk N. V. <i>Ex vitro</i> adaptation of microplants of blue honeysuckle (<i>Lonicera caerulea</i> L.)	103
Константинов А. В., Пантелеев С. В., Полевикова Е. Н. Разработка методики акклиматизации микрорастений ясеня обыкновенного (<i>Fraxinus excelsior</i> L.) к условиям <i>ex vitro</i>	104
Konstantinov A. V., Panteleev S. V., Polevikova E. N. Development of acclimatization methods of the common ash (<i>Fraxinus excelsior</i> L.) microplants to <i>ex vitro</i> conditions	105
Константинов А. В., Кулагин Д. В., Полевикова Е. Н., Емельянова О. В. Клональное микроразмножение и доразивание посадочного материала ольхи черной (<i>Alnus glutinosa</i> (L.) Gaertn.)	106
Konstantinov A. V., Kulagin D. V., Polevikova E. N., Emelyanova O. V. Micropropagation and production of planting material of black alder (<i>Alnus glutinosa</i> (L.) Gaertn.)	107
Константинов А. В., Каган Д. И., Петров Г. В. Изучение эффективности стерилизации растительного материала <i>Tilia parvifolia</i> Ehrh. ex Hoffm. для инициации асептических культур	108

<i>Konstantinov A. V., Kagan D. I., Petrov G. V.</i>	
Study of the effectiveness of sterilization of <i>Tilia parvifolia</i> Ehrh. ex Hoffm. plant material for the aseptic cultures initiation	109
<i>Корнацкий С. А.</i>	
Гидропонный способ адаптации пробирочных микрорастений земляники садовой	110
<i>Kornatskiy S. A.</i>	
Hydroponic method of adaptation test-tube microplants of strawberry	111
<i>Корнеева Г. И.</i>	
Проблемы адаптации представителей рода <i>Phalaenopsis Blume</i> при их переносе из изолированных условий <i>in vitro</i> в <i>in vivo</i>	112
<i>Karneyeva H. I.</i>	
Problems of adaptation of representatives of the genus <i>Phalaenopsis Blume</i> when transferred from isolated <i>in vitro</i> conditions <i>in vivo</i>	113
<i>Костина Е. Е., Ткаченко О. В., Лобачев Ю. В.</i>	
Изучение морфогенеза в культуре клеток и тканей <i>in vitro</i> генетически маркированных линий <i>Helianthus annuus</i> L.	114
<i>Kostina E. E., Tkachenko O. V., Lobachev Yu. V.</i>	
Study of morphogenesis in culture of cells and tissues <i>in vitro</i> of genetically marked <i>Helianthus annuus</i> L. lines	115
<i>Красинская Т. А., Остапчук И. Н., Косандрович С. Ю., Солдатов В. С.</i>	
Использование клиноптилолита и БИОНА-111, как компонентов субстратов для адаптации растений винограда к условиям <i>ex vitro</i>	116
<i>Krasinskaya T. A., Ostapchuk I. N., Kosandrovich S. U., Soldatov V. S.</i>	
The using of clinoptilolite and BIONA-111 as components in adaptation substrates for <i>ex vitro</i> adaptation of grape plants	117
<i>Креницына А. А., Чурикова О. А.</i>	
Влияние абиотических факторов на микроклональное размножение <i>Galanthus lagodechianus</i> Kem.-Nath. (Amaryllidaceae) и <i>Viscaria alpina</i> (L.) G. Donf. (Caryophyllaceae)	118
<i>Krinitina A. A., Churikova O. A.</i>	
The influence of abiotic factors on microclonal propagation of <i>Galanthus lagodechianus</i> Kem.-Nath. (Amaryllidaceae) and <i>Viscaria alpina</i> (L.) G. Donf. (Caryophyllaceae)	119
<i>Кутас Е. Н., Веевник А. А., Титок В. В.</i>	
Морфогенез <i>Rhododendron luteum</i> Sweet, интродуцированных сортов <i>Vaccinium corymbosum</i> L., <i>Vaccinium vitis-idaea</i> L. в зависимости от состава питательных сред	120
<i>Kutas E. N., Veyevnik A. A., Titok V. V.</i>	
Morphogenesis of <i>Rhododendron luteum</i> Sweet, introduced varieties of <i>Vaccinium corymbosum</i> L., <i>Vaccinium vitis-idaea</i> L., depending on the composition of the nutrient media	121

Кутас Е. Н., Веевник А. А., Титок В. В. Влияние различных типов эксплантов на регенерационную способность интродуцированных видов рододендронов (<i>Rhododendron</i> L.) <i>in vitro</i>	122
<i>Kutas E. N., Veyevnik A. A., Titok V. V.</i> The effect of different types of explants on the regenerative capacity of introduced rhododendron species (<i>Rhododendron</i> L.) <i>in vitro</i>	123
Лебедев В. Г., Субботина Н. М., Киркач В. В., Видягина Е. О., Поздняков И. А., Шестибратов К. А. Коллекции ягодных культур <i>in vitro</i> как исходный материал для маркерной и геномной селекции	124
<i>Lebedev V. G., Subbotina N. M., Kirkach V. V., Vidyagina E. O., Pozdnyakov I. A., Schestibratov K. A.</i> Collections of berry crops <i>in vitro</i> as initial material for marker and genomic selection	125
Лебедев В. Г., Шестибратов К. А. Широкомасштабное клональное микроразмножение древесных лесных пород для закладки лесных плантаций	126
<i>Lebedev V. G., Shestibratov K. A.</i> Large-scale clonal micropropagation of forest trees for short-rotation plantations	127
Левый А. В., Ермишин А. П., Полюхович Ю. В. Митотическое удвоение хромосом в культуре <i>in vitro</i> с целью вовлечения в селекцию ценного генофонда дикого вида картофеля <i>Solanum stoloniferum</i>	128
<i>Levy A. V., Yermishin A. P., Polyukhovich Yu. V.</i> Mitotic chromosome doubling in <i>in vitro</i> culture aimed at involvement into breeding of valuable germplasm of wild potato species <i>Solanum stoloniferum</i>	129
Леконцева Т. Г., Худякова А. В., Федоров А. В. Размножение плетистых роз сортов 'Pale Royal', 'Camelot' и 'Nahema' в культуре <i>in vitro</i>	130
<i>Lekontseva T. G., Khudyakova A. V., Fedorov A. V.</i> Propagation of climbing roses of 'Pale Royal', 'Camelot' and 'Nahema' sorts <i>in vitro</i>	131
Лёшина Л. Г., Молчан О. В., Булко О. В., Пушкарёва Н. А., Кирпа-Несмиян Т. Н., Запрудская Е. В., Кучук Н. В. Влияние светодиодного освещения разного спектрального состава на морфогенез и вторичный метаболизм <i>Catharanthus roseus</i> (L.) в условиях <i>in vitro</i> и закрытого грунта	132
<i>Lioshyna L. G., Molchan O. V., Bulko O. V., Puchkareva N. A., Kyrpa-Nesmijan T. N., Zaprudskaja E. V., Kuchuk M. V.</i> LED lighting of different spectral composition and its effect on the morphogenesis and secondary metabolism of <i>Catharanthus roseus</i> (L.) <i>in vitro</i> and in greenhouses	133
Мазур Т. В., Кондрацкая И. П., Чижик О. В. Микроклональное размножение межродового гибрида <i>Festulolium</i> морфотипа овсяницы тростниковой (<i>Festuca arundinacea</i>)	134
<i>Mazur T. V., Kandratskaya I. P., Chizhik O. V.</i> Microclonal propagation of an intergeneric hybrid of <i>Festulolium</i> of a morphotype of reed fescue (<i>Festuca arundinacea</i>)	135
Максимов Н. М., Брейгина М. А. Редокс-регуляция ионного транспорта в растущей пыльцевой трубке	136

Maksimov N. M., Breygina M. A. Redox-regulation of ion transport during pollen tube growth	137
Малаева Е. В., Молканова О. И. Использование биотехнологических методов для сохранения редких видов растений	138
Malaeva E. V., Molkanova O. I. Application of biotechnological methods for conservation of rare species plant	139
Маренкова Т. В., Пермьякова Н. В., Сидорчук Ю. В., Загорская А. А., Белавин П. А., Уварова Е. А., Розов С. М., Фоменков А. А., Носов А. В., Дейнеко Е. В. Возможные пути увеличения биосинтеза рекомбинантных белков в культурах клеток высших растений	140
Marenkova T. V., Permyakova N. V., Sidorchuk Yu. V., Zagorskaya A. A., Belavin P. A., Uvarova E. A., Rozov S. M., Fomenkov A. A., Nosov A. V., Deineko E. V. Possible ways to increase the biosynthesis of recombinant proteins of cells culture of higher plants	141
Маренкова Т. В., Сидорчук Ю. В., Носов А. В., Фоменков А. А., Загорская А. А., Мурсалимов С. Р., Кузнецов В. В., Дейнеко Е. В. Вариабельность экспрессии <i>gfp</i> -гена в моноклональных клеточных линиях <i>Arabidopsis thaliana</i>	142
Marenkova T. V., Sidorchuk Yu. V., Nosov A. V., Fomenkov A. A., Zagorskaya A. A., Mursalimov S. R., Kuznetsov V. V., Deineko E. V. Variability in the <i>gfp</i> -gene expression in the monoclonal cell lines of <i>Arabidopsis thaliana</i>	143
Матвеева Н. А., Шутова А. Г., Шиш С. Н., Дробот Е. А., Ратушняк Я. И., Дуплий В. П., Шабуня П. С., Бриндза Я. Сравнительная оценка состава биологически активных соединений и антирадикальной активности трансгенных растений <i>Ruta graveolens</i> L.	144
Matvieieva N. A., Shutava H. G., Shysh S. N., Drobot K. A., Ratushnyak Ya. I., Duplij V. P., Shabunya P. S., Bindza J. Comparative study of biologically active compounds accumulation and antiradical activity of <i>Ruta graveolens</i> L. transgenic plants	145
Махонина О. И., Ластенко И. И., Черноусова И. А., Балковская А. В., Филипена В. Л. Получение <i>in vitro</i> культур жимолости синей сортов 'Лазурная', 'Аврора', 'Камчадалка', 'Ленинградский великан'	146
Mahonina O. I., Lastenko I. I., Chernousova I. A., Balkovskaya A. V., Filipenia V. L. Initiation of blue honeysuckle <i>in vitro</i> cultures of 'Lazurnaya', 'Aurora', 'Kamchadalka', 'Leningrad Giant' cultivars	147
Мацкевич В. С., Самохина В. В., Кузнецова Н. А., Войтехович М. А., Демидчик В. В. Использование вертикальной культуры корневых проростков <i>in vitro</i> для анализа воздействия стрессовых агентов и фитогормонов на рост и развитие корневой системы высших растений	148
Mackievic V. S., Samokhina V. V., Kuzniatsova N. A., Vaitsiakhovich M. A., Demidchik V. V. The use of the vertical root <i>in vitro</i> culture in analysis of the effect of stress agents and phytohormones on the growth and development of the root system of higher plants	149

Машкина О. С., Табацкая Т. М. Коллекция <i>in vitro</i> как инструмент для получения посадочного материала и создания плантационных культур лиственных древесных растений	150
Mashkina O. S., Tabatskaya T. M. <i>In vitro</i> collection as a tool for the production of planting stock and creation of plantations of deciduous woody plants	151
Миронова С. О., Тихомирова Л. И. Анализ экстрактивных веществ из биотехнологического сырья <i>Iris sibirica</i> L., полученных в среде субкритической воды	152
Mironova S. O., Tikhomirova L. I. Analysis of extractives from biotechnological raw materials of <i>Iris sibirica</i> L., obtained in a medium of subcritical water	153
Мохамед Г. Р. А. Влияние фитогормонов на размножение голубики высокорослой (<i>Vaccinium corymbosum</i>) в культуре <i>in vitro</i>	154
Mohamed G. R. A. Effect of plant growth regulators on micropropagation of highbush blueberry (<i>Vaccinium corymbosum</i>) <i>in vitro</i>	155
Мурасева Д. С., Кобозева Е. В., Новикова Т. И. Введение в культуру <i>in vitro</i> редкого вида <i>Fritillaria meleagris</i> L. (<i>Liliaceae</i>) из органов цветка	156
Muraseva D. S., Kobozeva E. V., Novikova T. I. <i>In vitro</i> culture initiation from floral explants of <i>Fritillaria meleagris</i> L. (<i>Liliaceae</i>), a rare species	157
Некрасов Э. В., Шелихан Л. А., Светашев В. И. Полиненасыщенные жирные кислоты гаметофитов <i>Matteuccia struthiopteris</i> , выращенных в условиях <i>in vitro</i>	158
Nekrasov E. V., Shelikhan L. A., Svetashev V. I. Polyunsaturated fatty acids of gametophytes of <i>Matteuccia struthiopteris</i> cultivated <i>in vitro</i>	159
Нечаева Т. Л., Аксенова М. А., Живухина Е. А., Загоскина Н. В. Фенилаланин как возможный регулятор накопления полифенолов в <i>in vitro</i> культурах растений	160
Nechaeva T. L., Aksenova M. A., Zhivukhina E. A., Zagoskina N. V. Phenylalanine as a possible regulator of polyphenol accumulation in plant cultures <i>in vitro</i>	161
Никонович Т. В., Кильчевский А. В., Кардис Т. В., Брель Н. Г., Трофимов Ю. В. Влияние светодиодного освещения на микроклональное размножение растений	162
Nikanovich T. V., Kilchevsky A. V., Kardis T. V., Brel N. G., Trofimov Yu. V. Influence of LED lighting on microclonal propagation of plants	163
Никишина Т. В., Антипин М. И., Высоцкая О. Н. Криосохранение семян <i>Disa uniflora</i> (<i>Orchidaceae</i>)	164
Nikishina T. V., Antipin M. I., Vysotskaya O. N. Cryopreservation of seeds <i>Disa uniflora</i> (<i>Orchidaceae</i>)	165

Новосельский И. Ю., Гриусевич П. В., Соколик А. И., Демидчик В. В. Механизм редокс-зависимой активации калиевого канала плазматической мембраны клеток корня растений <i>Arabidopsis</i> , выращенных в условиях <i>in vitro</i>	166
Navaselskiy I. Y., Hryvusevich P. V., Sokolik A. I., Demidchik V. V. The mechanism of redox-dependent K ⁺ channel activation in the plasma membrane of <i>Arabidopsis</i> plants cultivated <i>in vitro</i>	167
Павличенко В. В., Протопопова М. В., Войников В. К. Особенности микрোকлонального размножения и агробактериальной генетической трансформации тополя берлинского	168
Pavlichenko V. V., Protopopova M. V., Voinikov V. K. The peculiarities of micropropagation and agrobacterium mediated transformation of Berlin poplar	169
Павлова И. А. Вегетирующая коллекция растений винограда <i>in vitro</i> , условия хранения	170
Pavlova I. A. A vegetating collection of grape plants <i>in vitro</i> : storage conditions	171
Павлова И. В., Купреенко Н. П., Булахова А. С. Использование методов <i>in vitro</i> в отечественном селекционном процессе луковых культур	172
Pavlova I. V., Kupreenko N. P., Bulahova A. S. Present state of tissue cultures in belorussian onion breeding	173
Пермякова Н. В., Сидорчук Ю. В., Маренкова Т. В., Кузнецов В. В., Хозеева С. А., Загорская А. А., Дейнеко Е. В. Сайт-специфическое редактирование модельного гена <i>gfp</i> в геноме суспензионной культуры клеток <i>Arabidopsis thaliana</i> L.	174
Permyakova N. V., Sidorchuk Yu. V., Marenkova T. V., Kuznetsov V. V., Khozeeva S. A., Zagorskaya A. A., Deineko E. V. Targeted genome editing of the model gene <i>gfp</i> in the genome of the cell suspension culture of <i>Arabidopsis thaliana</i> L.	175
Першина Л. А., Белова Л. И., Трубачеева Н. В., Осадчая Т. С., Кравцова Л. А., Белан И. А., Россеева Л. П., Немченко В. В., Абакумов С. Н. Методы <i>in vitro</i> для получения аллоплазматических и ДГ линий (<i>H. vulgare</i>)- <i>T. aestivum</i> , используемых в селекции яровой мягкой пшеницы	176
Pershina L. A., Osadchaya T. S., Trubacheeva N. V., Belan I. A., Rosseeva L. P., Nemchenko V. V., Abakumov S. N. <i>In vitro</i> methods for the development of alloplasmic and DH lines (<i>H. vulgare</i>)- <i>T. aestivum</i> used in the breeding of spring common wheat	177
Петрин Н. И., Базарнова Н. Г., Генъш К. В., Тихомирова Л. И. Содержание мангиферина в растениях-регенерантах <i>Iris sibirica</i> L.	178
Petrin N. I., Bazarnova N. G., Gensh K. V., Tikhomirov L. I. The contents mangiferin in plants-regenerante <i>Iris sibirica</i> L.	179

Петросян М. Т., Саакян Н. Ж., Алоян С., Трчунян А. Сравнительный анализ химического состава и биологической активности интактного растения и изолированной культуры <i>Amberboa sosnovskyi</i> ILJIN	180
<i>Petrosyan M. T., Sahakyan N. Zh., Aloyan S., Trchounian A.</i> Comparative analysis of <i>Amberboa sosnovskyi</i> ILJIN intact plant and isolated culture chemical composition and biological activity	181
Пивоварова Н. С., Пovyдыш М. Н., Каухова И. Е., Лужанин В. Г. Коллекция штаммов лекарственных растений СПХФУ, как научная база для разработки инновационных лекарственных средств	182
<i>Pivovarova N. S., Povydysh M. N., Kauhova I. E., Luzhanin V. G.</i> Tissue cultures of medicinal plants in SPCPU as a base for the development of innovative medicines	183
Плаксина Т. В. Оптимизация питательных сред при микроразмножении садовых культур	184
<i>Plaksina T. V.</i> Nutrient media optimization in garden crops micropropagation	185
Пржевальская Д. А., Черныш М. А., Костень А. А., Колбанов Д. В., Демидчик В. В. Воздействие наночастиц серебра, полученных на основе «зеленого» наносинтеза, на развитие корневой системы микроклонов <i>Salix fragilis</i> L. и контаминацию патогенными грибами в культуре <i>in vitro</i>	186
<i>Przhevalskaya D. A., Charnysh M. A., Kosten A. A., Kolbanov D. V., Demidchik V. V.</i> The effect of silver nanoparticles obtained on the basis of “green” nanosynthesis on the development of the root system of microclones <i>Salix fragilis</i> L. and contamination by pathogenic fungi in culture <i>in vitro</i>	187
Решетников В. Н. Биохимическое изучение и биотехнологическое использование асептических коллекционных фондов аборигенных и интродуцированных растений	188
<i>Reshetnikov V. N.</i> Biochemical study and biotechnological use of aseptic collection funds of aborigenic and introduced plants	189
Саакян Н. Ж., Петросян М. Т., Трчунян А. Антиоксидантная активность <i>in vitro</i> культуры <i>Ajuga genevensis</i> L.	190
<i>Sahakyan N., Petrosyan M., Trchounian A.</i> The antioxidant activity of <i>Ajuga genevensis</i> L. <i>in vitro</i> culture	191
Сагдуллаев Ш. Ш. Ценные лекарственные растения флоры Узбекистана и способы их сохранения	192
<i>Sagdullaev Sh. Sh.</i> Valuable medicinal plants of the flora of Uzbekistan and ways to preserve them	193
Самохина В. В., Мацкевич В. С., Соколик А. И., Демидчик В. В. Анализ стресс-индуцированного выхода ионов калия из клеток корня высших растений, культивируемых <i>in vitro</i> , с помощью метода меченых атомов	194

<i>Samokhina V. V., Mackievic V. S., Sokolik A. I., Demidchik V. V.</i> Analysis of the stress-induced efflux of potassium ions from root cells of higher plants cultivated <i>in vitro</i> , using radioactively-labelled ions	195
<i>Сащенко М. Н., Подвигина О. А.</i> Морфологические особенности межвидовых гибридов сахарной свёклы	196
<i>Sashchenko M. N., Podvigina O. A.</i> Morphological features of interventional hybrids sugar beets	197
<i>Семанюк Т. В., Дубинич В. Л., Кондратюк А. В., Родькина И. А., Козлов В. А.</i> Получение и оценка растений регенерантов от слияния протопластов <i>Solanum tuberosum</i> и <i>Solanum neoantipoviczii</i>	198
<i>Semanyuk T. V., Dubinich V. L., Kandratsiuk A. V., Rodzkina I. A., Kozlov V. A.</i> Developing and evaluating of regenerant plants from the fusion of <i>Solanum tuberosum</i> and <i>Solanum neoantipoviczii</i> protoplasts	199
<i>Семенцова М. В., Высоцкая О. Н.</i> Криоустойчивость апикальных меристем купены лекарственной (<i>Polygonatum odoratum</i>), изолированных из растений после длительного культивирования <i>in vitro</i>	200
<i>Sementsova M. V., Vysotskaya O. N.</i> Cryoresistance of meristem apices isolated from Solomon's seal plantlets after long-term <i>in vitro</i> culture (<i>Polygonatum odoratum</i>)	201
<i>Семёнова К. П., Тихомирова Л. И.</i> Содержание суммы флавоноидов в растениях-регенерантах <i>Iris sibirica</i> L. в зависимости от гормонального состава питательных сред	202
<i>Semenova K. P., Tikhomirova L. I.</i> The content of the amount of flavonoids in plants regenerating <i>Iris sibirica</i> L., depending on the hormonal composition of nutrient media	203
<i>Середа М. М., Васильченко Е. В., Верещагина А. В.</i> Микроклональное размножение гибридных сортов гибискуса (<i>Hibiscus</i> sp.)	204
<i>Sereda M. M., Vasilchenko E. V., Vereshchagina A. V.</i> Micropropagation of hybrid <i>Hibiscus</i> sp. varieties	205
<i>Сергеева Л. Е., Хоменко Л. А., Бронникова Л. И.</i> Клеточные культуры как экспериментальные системы исследования генотипов пшеницы, устойчивых к промораживанию	206
<i>Sergeeva L. E., Khomenko L. A., Bronnikova L. I.</i> Cell cultures as experimental systems for investigation of freezing tolerant wheat genotypes	207
<i>Смолов А. П.</i> Формы минерального азота и фактор рН в формировании рибосом растительной клетки культуры <i>in vitro</i>	208
<i>Smolov A. P.</i> The forms of mineral nitrogen and pH factor in ribosomes formation of plant cell <i>in vitro</i>	209

Соболькова Г. И., Кочкин Д. В., Титова М. В., Григорьев Р. О., Ключин А. Г. Получение каллусов женьшеня вьетнамского <i>Panax vietnamensis</i> Ha et Grushv., синтезирующих тритерпеновые гликозиды	210
<i>Sobolkova G. I., Kochkin D. V., Titova M. V., Grigoryev R. O., Klyushin A. G.</i> Preparation of the callus of the Vietnamese ginseng <i>Panax vietnamensis</i> Ha et Grushv., synthesizing triterpene glycosides	211
Соловьева А. И., Высоцкая О. Н. Характер воздействия криосохранения методом дегидратации на генетическую стабильность растительного материала <i>Triticum aestivum</i> и <i>Fragaria vesca</i>	212
<i>Solov'eva A. I., Vysotskaya O. N.</i> Influence character of dehydration cryopreservation on genetic stability of <i>Triticum aestivum</i> and <i>Fragaria vesca</i> plant material	213
Спиридович Е. В., Власова А. Б., Козлова О. Н., Вайновская И. Ф., Филипеня В. Л., Юхимук А. Н., Хотляник Н. В., Кузьменкова С. М., Решетников В. Н. Биотехнологии сохранение растений: коллекция <i>in vitro</i> и банк ДНК редких видов Центрального ботанического сада НАН Беларуси	214
<i>Spiridovich E. V., Vlasava N. B., Kozlova O. N., Vaynovskaya I. F., Filipenia V. L., Khotlyanik N. V., Kuzmenkova S. M., Reshetnikov V. N.</i> Plant biotechnology conservation: collections <i>in vitro</i> and DNA bank of rear species in the Central botanical garden NAS of Belarus	215
Спринчану Е. К., Антипин М. И., Высоцкая О. Н. Прорастание семян шести видов ковылей <i>Stipa</i> L. до и после криосохранения	216
<i>Sprinchanu E. K., Antipin M. I., Vysotskaya O. N.</i> The germination of six needlegrass species (<i>Stipa</i> L.) before and after cryopreservation	217
Степанова А. Ю., Соловьева А. И., Евсюков С. В. Изучение взаимосвязи между активностью глюкуронидазы и образованием флавоно-агликонов в дифференцированных и недифференцированных <i>in vitro</i> культурах шлемника байкальского	218
<i>Stepanova A. Yu., Solov'eva A. I., Evsyukov S. V.</i> Investigation of relationship between β -glucuronidase activity and flavone-aglycones content in differentiated and undifferentiated <i>in vitro</i> Baikal skullcap cultures	219
Субботин А. М., Петров С. А., Мальчевский В. А., Хрупа Д. А. Цитогенетический анализ влияния бактерии <i>Serratia fonticola</i> , выделенных из проб многолетнемерзлых пород, на клетки корневой системы <i>Allium cepa</i> L.	220
<i>Subbotin A. M., Petrov S. A., Malchevsky V. A., Khrupa D. A.</i> The cytogenetic analysis of influence of a bacterium of <i>Serratia fonticola</i> allocated from samples of permafrost rock on cages of the root system <i>Allium cepa</i> L.	221
Суворова Г. Н. Биотехнологические методы в селекции чечевицы	222
<i>Suvorova G. N.</i> Biotechnological approaches in lentil breeding	223

Супрун И. И., Маляровская В. И., Степанов И. В., Самарина Л. С. Перспективность использования ISSR и IRAP ДНК-маркеров для анализа генетической стабильности видов <i>Eryngium maritimum</i> L., <i>Galanthus woronowii</i> Losinsk., <i>Campanula sclerophylla</i> Kolak. при размножении <i>in vitro</i>	224
Suprun I. I., Malyarovskaya V. I., Stepanov I. V., Samarina L. S. Prospects of the use of ISSR and IRAP DNA markers for the analysis of genetic fidelity of species <i>Eryngium maritimum</i> L., <i>Galanthus woronowii</i> Losinsk., <i>Campanula sclerophylla</i> Kolak. after <i>in vitro</i> propagation	225
Суханова Е. С., Соболюкова Г. И. Получение культуры клеток <i>Ajuga turkestanica</i> (Regel) Briq. — продуцента экидистероидов	226
Sukhanova E. S., Sobolkova G. I. Obtaining of <i>Ajuga turkestanica</i> (Regel) Briq. cell culture as a producer of ecdysteroids	227
Суханова Е. С., Соболюкова Г. И. Получение каллусных культур клеток ценных лекарственных растений Ближнего Востока: <i>Mandragora turcomanica</i> и <i>Alhagi persarum</i>	228
Sukhanova E. S., Sobolkova G. I. Obtaining cell cultures of valuable medicinal plants of the Middle East: <i>Mandragora turcomanica</i> and <i>Alhagi persarum</i>	229
Суханова Е. С., Куличенко И. Е., Соболюкова Г. И. Всероссийская коллекция культур клеток высших растений ИФР РАН (УНУ ВККК ВР)	230
Sukhanova E. S., Kulichenko I. E., Sobolkova G. I. All-Russian Plant Cell Culture Collection of IPPRAS (USU RPCCC)	231
Теберекова Т. И., Тихомирова Л. И. Биотехнология получения растительного сырья <i>Potentilla chrysantha</i> Trev., содержащего биологически активные вещества	232
Teberekova T. I., Tikhomirova L. I. Biotechnology of receiving vegetable <i>Potentilla chrysantha</i> Trev. raw materials, containing biologically active agents	233
Титова М. В., Фоменков А. А., Суханова Е. С., Шумило Н. А., Котенкова Е. А. Токсикологическое исследование суспензионной культуры клеток <i>Panax japonicus</i>	234
Titova M. V., Fomenkov A. A., Sukhanova E. S., Shumilo N. A., Kotenkova E. A. Toxicological study of a <i>Panax japonicus</i> suspension cell culture	235
Тихомирова Л. И. Некоторые особенности морфогенеза <i>Iris ensata</i> Thunb. в культуре <i>in vitro</i>	236
Tikhomirova L. I. Some features of morphogenesis of <i>Iris ensata</i> Thunb. in <i>in vitro</i> culture	237
Ткаченко О. В., Евсеева Н. В., Бурьгин Г. Л., Каргаполова К. Ю., Лобачев Ю. В., Матора Л. Ю., Щеголев С. Ю. Эффективность культивирования клеток и тканей растений <i>in vitro</i> в присутствии бактерий и их метаболитов	238
Tkachenko O. V., Evseeva N. V., Burygin G. L., Kargapolova K. Yu.,	

<i>Lobachev Yu. V., Matora L. Yu., Shchyogolev S. Yu.</i> The efficiency of plant cells and tissues <i>in vitro</i> culture in the presence of bacterias and their metabolites	239
<i>Томилова С. В., Глаголева Е. С., Лабунская Е. А., Тухтаманова А. С., Галишев Б. А., Кочкин Д. В., Носов А. М.</i> Получение и характеристика культур клеток эндемичного вида наперстянки <i>Digitalis ciliata</i> Trautv. — продуцента сердечных гликозидов	240
<i>Tomilova S. V., Glagoleva E. S., Labunskaya E. A., Tuhtamanova A. S., Galishchev B. A., Kochkin D. V., Nosov A. M.</i> Obtaining and investigation of the cell cultures of the endemic plant of <i>Digitalis ciliata</i> Trautv., a producer of cardiac glycosides	241
<i>Третьякова И. Н., Пак М. Э., Казаченко А. С., Ахиярова Г. Р., Кудоярова Г. Р.</i> Соматический полиэмбриогенез клеточных линий лиственницы сибирской (<i>Larix sibirica</i>) <i>in vitro</i> (мульти-пликация, гормональная регуляция и генотипирование)	242
<i>Tretyakova I. N., Pak M. E., Kazachenko A. S., Akhiyarova G. R., Kudoyarova G. R.</i> Somatic polyembryogenesis of cell lines of Siberian larch (<i>Larix sibirica</i>) <i>in vitro</i> (multiplication, hormonal regulation and genotyping)	243
<i>Тюрин А. А., Павленко О. С., Кабардаева К. В., Берестовой М. А., Гра О. А., Фадеев В. С., Мустафаев О., Голденкова-Павлова И. В.</i> Транзиентная экспрессия гетерологичных генов в растениях — новые возможности исследователя в решении фундаментальных проблем и прикладных задач	244
<i>Tyurin A. A., Pavlenko O. S., Kabardaeva K. V., Berestovoy M. A., Gra O. A., Fadeev V. S., Mustafaev O., Goldenkova-Pavlova I. V.</i> Transient expression of heterologous genes in plants — new possibilities for the researcher to solve the fundamental and applied problems	245
<i>Уснич С. Л., Мацкевич В. С., Пржевальская Д. А., Черныш М. А., Шашко А. Ю., Бондаренко В. Ю., Колбанов Д. В., Демидчик В. В.</i> Стимуляция синтеза активных форм кислорода в корнях микроклонов древесных растений при их выведении в условия <i>ex vitro</i>	246
<i>Usnich S. L., Mackievic V. S., Przhevalskaya D. A., Charnysh M. A., Shashko A. Yu., Bandarenka V. Yu., Kalbanov D. V., Demidchik V. V.</i> Stimulation of synthesis of reactive oxygen forms in the roots of microcloths of wood plants during extraction to <i>ex vitro</i> conditions	247
<i>Федулова Т. П., Ржевский С. Г., Гродецкая Т. А.</i> Молекулярно-биологические особенности культивируемых селекционно-ценных генотипов тополя и осины на основе SSR-маркеров	248
<i>Fedulova T. P., Rzhovsky S. G., Grodetzkaya T. A.</i> Molecular-biological features of cultivated selection-valuable genotypes of poplar and aspen on the basis of SSR-markers	249
<i>Федулова Т. П., Подвигина О. А.</i> Молекулярно-генетическое тестирование ДН-линий сахарной свёклы (<i>Beta vulgaris</i> L.)	250
<i>Fedulova T. P., Podvigina O. A.</i> Molecular-genetic testing of sugar beet (<i>Beta vulgaris</i> L.) DH-lines	251

Фоменков А. А., Титова М. В., Суханова Е. С., Иванов И. М., Василевская Е. Р. Анаболические свойства суспензионной культуры клеток <i>Dioscorea deltoidea</i> Wall.	252
Fomenkov A. A., Titova M. V., Sukhanova E. S., Ivanov I. M., Vasilevskaya E. R. Anabolic properties of the <i>Dioscorea deltoidea</i> Wall suspension cell culture	253
Харитонов Т. Д., Титова М. В., Собољкова Г. И., Чернобу́рова Е. И., Зава́рзин И. В., Носов А. М. Исследование содержания эктистероидов в культуре клеток <i>Ajuga turkestanica</i>	254
Kharitonov T. D., Titova M. V., Sobolkova G. I., Chernoburova E. I., Zavarzin I. V., Nosov A. M. The study of the content of ecdysteroids in the culture of cells of <i>Ajuga turkestanica</i>	255
Хотляник Н. В., Зубарев А. В., Лазарук Г. В., Спиридович Е. В. Асептическая коллекция — биотехнологический подход к омоложению видовой сирени	256
Khatlianik N. V., Zubarev A. V., Lazaruk H. V., Spiridovich E. V. Aseptic collection — the biotechnological method of rejuvenation of Lilac species plants	257
Хуснетдинова Л. З., Фардеева М. Б. Оценка жизнеспособности эксплантов видов рода <i>Astragalus</i> L. <i>in vitro</i>	258
Khusnetdinova L. Z., Fardeeva M. B. Evaluation of explant viability of some species of genus <i>Astragalus</i> L. <i>in vitro</i>	259
Черкасова Н. Н., Колесникова Е. О., Жужжалова Т. П. Выделение кислотоустойчивых форм сахарной свёклы в условиях <i>in vitro</i>	260
Cherkasova N. N., Kolesnikova E. O., Zhuzhzhhalova T. P. Obtaining of acid-resistant sugar beet forms under <i>in vitro</i> conditions	261
Чернобай Н. А., Кадникова Н. Г. Толерантность клеток микроводоросли <i>Dunaliella salina</i> к низким температурам в зависимости от состава сред культивирования	262
Chernobai N. A., Kadnikova N. G. Tolerance of <i>Dunaliella salina</i> microalgae cells to low temperatures depending on composition of culture media	263
Черныш М. А., Пржевальская Д. А., Горский И. А., Цыбульская Л. А., Жабинский В. Н., Хрипач В. А., Демидчик В. В. Воздействие брассиностероидов на рост и морфологические характеристики клеток протокормов <i>Phalaenopsis</i> × <i>hybridum</i> Blume в культуре <i>in vitro</i>	264
Charnysh M. A., Przhevalskaya D. A., Horski I. A., Tsybulskaya L. A., Zhabinskii V. N., Khripach V. A., Demidchik V. V. Effects of brassinosteroids on growth and cell morphology of <i>Phalaenopsis</i> × <i>hybridum</i> Blume protocorms cultivated <i>in vitro</i>	265
Чижик О. В. Протеомика в биотехнологии растений	266
Chizhik O. V. Proteomics in plant biotechnology	267

Шишлова-Соколовская А. М., Савчин Д. Г., Урбанович О. Ю., Федосеева И. В., Боровский Г. Б. Растения <i>Nicotiana tabacum</i> , экспрессирующие ген «внешней» нефосфорилирующей NADH дегидрогеназы — <i>ndb2</i> из <i>Arabidopsis thaliana</i> в смысловой и антисмысловой ориентации	268
<i>Shishlova-Sokolovskaya A. M., Savchin D. G., Urbanovich O. Yu., Fedoseyeva I. V., Borovsky G. B.</i> <i>Nicotiana tabacum</i> plants expressing the gene of “external” non-phosphorylating NADH dehydrogenase — <i>ndb2</i> of <i>Arabidopsis thaliana</i> in a sense and antisense orientation	269
Ширнина И. В. Особенности клонального микроразмножения и сохранения представителей семейства <i>Liliaceae</i> Juss. в культуре <i>in vitro</i>	270
<i>Shirnina I. V.</i> Features of clonal micropropagation and conservation of representatives of the <i>Liliaceae</i> Juss. family. <i>in vitro</i>	271
Швидченко В. К., Киргизова И. В., Гаджимурадова А. М. Изучение каллусообразующей способности различных эксплантов картофеля <i>Solanum tuberosum</i> L.	272
<i>Shvidchenko V. K., Kirgizova I. V., Gajimuradova A. M.</i> Studying of the callus-forming ability of various potato (<i>Solanum tuberosum</i> L.) explants	273
Шпаковский Г. В., Бабак О. Г., Халилуев М. Р., Бердичевец И. Н., Баранова Е. Н., Кубрак С. В., Клыков В. Н., Словохотов И. Ю., Шпаковский Д. Г., Шематорова Е. К., Спивак С. Г., Кильчевский А. В. Генетически трансформированные растения томата, табака и наперстянки в изучении стероидных гормональных систем и перспективы их использования в агробиотехнологии и фармакологии	274
<i>Shpakovski G. V., Babak O. G., Khaliluev M. R., Berdichevets I. N., Baranova E. N., Kubrak S. V., Klykov V. N., Slovokhotov I. Yu., Shpakovski D. G., Shematorova E. K., Spivak S. G., Kilchevsky A. V.</i> Genetically transformed plants of tomato, tobacco and <i>Digitalis</i> in the study of steroid hormonal systems and prospects of their use in agrobiotechnology and pharmacology	275
Шуклина А. С. Оптимизация индукции соматического эмбриогенеза сосны сибирской (<i>Pinus sibirica</i>) в культуре <i>in vitro</i>	276
<i>Shuklina A. S.</i> Optimization of somatic embryogenesis induction of siberian pine (<i>Pinus sibirica</i>) in culture <i>in vitro</i>	277
Шуплецова О. Н. Клеточная технология создания сортов ячменя с комплексной устойчивостью к ионной токсичности металлов и засухе	278
<i>Shupletsova O. N.</i> Cell technology to create barley varieties with complex resistance to ion toxicity of metals and drought	279
Эльконин Л. А., Итальянская Ю. В., Панин В. М. Генетическая трансформация для улучшения питательной ценности зернового сорго	280
<i>Elkonin L. A., Italienskaya Yu. V., Panin V. M.</i> Genetic transformation for improvement of the nutritional value of grain sorghum	281

Юрин В. М., Дитченко Т. И., Молчан О. В., Филиппова С. Н. Технология получения линий с повышенным содержанием ценных фармакологически активных соединений на основе иммобилизованных клеток лекарственных растений	282
Yurin V. M., Ditchenko T. I., Molchan O. V., Filippova S. N. The technology of medicinal plant cell lines obtaining with an increased content of pharmacologically valuable compounds based on immobilization method	283
Яковлева Г. А., Семанюк Т. А., Дубинич В. Л., Кондратюк А. В., Родькина И. А. Первичная и вторичная соматическая гибридизация картофеля	284
Yakovleva G. A., Semanyuk T. V., Dubinitch V. L., Kondratsiuk A. V., Rodzkina I. A. Primary and secondary potato somatic hybridization	285
Яхонт Ю. В., Родькина И. А. Наследование маркерного гена npt II в генеративных поколениях трансгенного картофеля при анализирующих скрещиваниях	286
Yakhont Yu. V., Rodzkina I. A. Inheritance marker gene npt II in sexual generations of transgenic potato in test crosses	287
Dapkuniene S., Ziemyte I. Micropagation of common lilac (<i>Syringa vulgaris</i> L.) cultivars	288
Demidchik V. V. ROS sensors in the plant plasma membrane: study using <i>Arabidopsis thaliana</i> whole plant culture	289
Gharari Z., Sharafi A., Bagheri K., Yazdinejad A. <i>In vitro</i> direct regeneration of <i>Viola caspia subsp. sylvestrioides</i> Marcussen from petiole and leaf explants	290
Gharari Z., Sharafi A., Bagheri K., Danafar H., Yazdinejad A. Analysis of the chemical composition of the essential oil of <i>Scutellaria bornmuelleri</i> using GC-MS	291
Hyung-Eun Kim, Yun-Ji Park, Jae-Heok Shin, Young-Sik Gil, So-Young Park Morphological and molecular response to thermal stress in <i>in vitro</i> grown <i>Cnidium officinale</i> Makino	292
Keon-Il Kim, Thanh-Tam Ho, So-Young Park Changes of ginsenosides content by LAB bacteria co-cultivation in adventitious root cultures of <i>Panax ginseng</i>	293
Panis B., Popova E. The role of plant cryopreservation in guaranteeing global food security	294
Sharafi A., Sharafi A. A., Yaroshko O. Metabolic engineering of morphinan alkaloids in transgenic cultures of <i>Papaver bracteatum</i>	295
Sharafi A. A., Yaroshko O., Sharafi A. Genetically transformed root induction and shoot organogenesis of <i>Dracocephalum kotschyi</i>	296
Shevchenko N. O. Cryopreservation of garlic, grape and sweet potato meristems with modified vitrification solution	297

<i>Shri Mohan Jain</i> Advances in plant tissue culture and their applications in crop improvement	298
<i>Shulgina A. A., Kalashnikova E. A., Tarakanov I. G.</i> The influence of different factors on morphological parameters of <i>Stevia rebaudiana in vitro</i>	299
<i>Sokolovska-Sergiienko O. G., Dubrovna O. V., Kulesh S. S., Kiriziy D. A., Priadkina G. O., Stasik O. O.</i> Activity of antioxidant enzymes in chloroplasts and photosynthetic activity transgenic wheat plants with RNA-suppressor of the proline dehydrogenase gene under drought	300
<i>Yang L., Shen H. L., Zhang P.</i> Cell morphological structure and hydrogen peroxide metabolism in somatic embryogenesis of hardwood species: a case study in <i>Fraxinus mandshurica</i>	301
<i>Yaroshko O. M., Gajdosova A., Kuchuk M. V.</i> Microclonal multiplication and callus formation of <i>Amaranthus caudatus</i> L. cv. <i>Karmin</i>	302
Именной указатель	303
Index	308

Научное издание

**Биология клеток растений
in vitro и биотехнология**

Тезисы докладов XI Международной конференции,
которая знаменует полувековую историю по исследованию
культивируемых *in vitro* клеток высших растений
и 60-летие деятельности отдела биохимии и биотехнологии растений
государственного научного учреждения
«Центральный ботанический сад НАН Беларуси»
(г. Минск, 23–27 сентября 2018 г.)

XIth International conference
«**The biology of plant cells in vitro and biotechnology**»
(September 23–27, 2018, Minsk, Republic of Belarus)

Ответственный за выпуск *Андрей Зубарев*
Корректоры *Юлия Лукьянюк, Ольга Захаревич*
Компьютерный дизайн, верстка *Антонина Невинская*
Дизайн обложки *Элина Иодо*

Подписано в печать 16.09.2018. Формат 60×84¹/₈.
Бумага офсетная. Печать офсетная.
Усл. печ. л. 38,6. Уч.-изд. л. 26,2.
Тираж 200 экз. Заказ 7978.

Издатель и полиграфическое исполнение:
общество с ограниченной ответственностью «Медисонт».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий
№ 1/142 от 09.01.2014. № 2/34 от 23.12.2013. ЛП № 02330/20 от 18.12.2013.
Ул. Тимирязева, 9, 220004, Минск.
www.medisont.by