

**О.А. КУДРЯШОВА**, канд. биолог. наук,  
ведущий научный сотрудник<sup>1</sup>

**А.В. ЧАЛЕЙ**  
младший научный сотрудник<sup>1</sup>

**А.В. БУЙ**  
младший научный сотрудник<sup>1</sup>

**Ю.Д. ЛУКОНИНА**  
стажер младшего научного сотрудника<sup>1</sup>

**Н.В. ВОДЧИЦ**  
заведующий научно–исследовательской лабораторией клеточных технологий в растениеводстве<sup>2</sup>

<sup>2</sup>Полесский государственный университет,  
г. Пинск, Республика Беларусь

**Т.А. БОРИСЕВИЧ**  
лаборант<sup>1</sup>

**А.А. ВОЛОТОВИЧ**, канд. биолог. наук, доцент  
начальник научно–исследовательского отдела<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Республиканский лесной селекционно–семеноводческий центр,  
г. Минск, Республика Беларусь

Поступила в редакцию 29 сентября 2017г.

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АСЕПТИЧЕСКОГО ВВЕДЕНИЯ И СТАБИЛИЗАЦИИ *IN VITRO* РАЗНЫХ ТИПОВ ЭКСПЛАНТОВ ЯСЕНЯ ОБЫКНОВЕННОГО

**Аннотация.** В настоящей статье впервые приведены результаты применения 24–эпибрассинолида на этапе стабилизации *in vitro* регенерантов ясеня обыкновенного *Fraxinus excelsior* L., семенного происхождения. В работе использовали семена, собранные в 2016 году в Гомельской и Гродненской областях Республики Беларусь. Показано, что наиболее подходящим типом первичного экспланта ясеня обыкновенного для асептического введения в культуру *in vitro* являются изолированные зародыши. Для успешного асептического введения *in vitro* от 57–100% изолированных зародышей ясеня обыкновенного рекомендуется питательная, агаризованная среда Мурасиге и Скуга половинного состава без фитогормонов, с добавлением 20 г/л сахарозы, 9 г/л агар–агара, при pH=5,6. Для успешной стабилизации *in vitro* регенерантов ясеня обыкновенного можно рекомендовать питательную, агаризованную среду Андерсона, дополненную 1 мг/л зеатина и 0,75 мг/л 24–эпибрассинолида, при этом у всех регенерантов ясеня обыкновенного формируются корни в количестве от 1–3 и длиной от 0,6–6,0 см, в зависимости от генотипа.

**Введение.** Ясень обыкновенный (*Fraxinus excelsior* L.) – широколиственная лесная порода умеренного климата, распространенная на большей части Европы, отличающаяся быстрым ростом, достигающая до 40 м и более в высоту. Древесина ясеня твердая, с красивой текстурой и окраской, по свойствам не уступает древесине дуба, и даже превосходит ее по стойкости к деформациям и ударной вязкости. Древесина ясеня используется для изготовления паркета, спортивного инвентаря, мебели, лестниц, рукояток инструментов [1].

Семена ясеня, находящиеся в состоянии покоя, могут сохранять способность к прорастанию после 6–7 месяцев стратификации. Для массового размножения важно найти методику с использованием нестратифицированных семян. Для этого подходит культура зрелых зародышей [2, 3].

Микроклональным размножением ясеня обыкновенного начали заниматься около 30 лет назад. Тем не менее, в настоящее время известно немного опубликованных работ по данной теме [4–11].

В качестве эксплантов использовали почки молодых и взрослых деревьев, семена и зрелые зародыши.

Латвийские исследователи изучали органогенез у ясеня обыкновенного *in vitro*, с использованием зрелых зиготических зародышей [4]. Другие исследователи добились микроразмножения ясеня обыкновенного из ювенильных [5, 6] и зрелых растений [7].

Болгарские и греческие исследователи изучали влияние питательной среды на прорастание зародышей ясеня обыкновенного, используя полный и половинный составы питательных сред с  $pH=5,6$  на микро-, макро-солевой основе MS, DKW, WPM и среды Кнопа, для культивирования трех типов эксплантов: семена с удаленным перикарпием, семена со срезанной  $1/4$  частью противоположного зародышу конца и зародыши [8]. В результате исследований установлено, что для формирования 65% развитых проростков лучше остальных подходит половинная питательная среда ( $1/2$ ) MS, которую и рекомендуют как наиболее благоприятную для прорастания зародышей ясеня [8].

Французские исследователи проводили три различных типа диссекции зрелых семян двух европейских видов ясеня (обыкновенного и узколистного), чтобы сравнить их эффективность для прорастания и дальнейшего развития [9]. В ходе работы была установлена эффективность способа подготовки семян, при котором после стерилизации края семян срезали полностью и семена размещали на питательную агаризованную среду без сахарозы на 24 часа, чтобы зародыши освободились от эндосперма. Затем зародыши культивировали лежа на среде с 5 г/л сахарозы и 5 г/л мальтозы в чашках Петри в течение 2–3 дней, после чего их переносили в пробирки с питательной средой для культивирования [9]. Данный способ диссекции и проращивания семян (в виде культуры зародышей *in vitro*) позволяет легче и быстрее, чем при стратификации, получить до 90% жизнеспособных стерильных проростков ясеня [9].

Российские и белорусские исследователи занимались изучением микроразмножения и регенерации адвентивных побегов ясеня обыкновенного в культуре *in vitro* [2]. В качестве эксплантов использовали верхушечные и пазушные почки двух форм ясеня обыкновенного (зеленолистной и пестролистной), собранные со взрослых деревьев в апреле – мае. Наилучшие результаты были отмечены на модифицированной среде WPM (коэффициенты размножения  $KP_{II}$  составили 4,3 и 2,9 у зеленолистной и пестролистной форм, соответственно). Для регенерации побегов из листовых эксплантов наиболее эффективным оказался цитокинин тидиазурон в концентрации 0,5 мг/л. При этом, частота регенерации составила 22% и 34% для сред MS и WPM, соответственно [2].

Сотрудниками Филиала Института биоорганической химии им. Академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук в г.Пушино Московской области проводились исследования по размножению, укоренению *in vitro* и акклиматизации в теплице растений ясеня обыкновенного [10].

В нашей работе отрабатывались этапы асептического введения и стабилизации в культуре *in vitro* зрелых зародышей, извлеченных из семян ясеня обыкновенного. Впервые на этапе стабилизации ясеня обыкновенного *in vitro* применен 24-эпибрассинолид (24-ЭБ) в составе агаризованной, питательной среды.

**Материалы и методы исследования.** Для эксперимента использовали семена ясеня, собранные в различных местах обитания:

партия № 1584 – ГЛХУ “Рогачевский лесхоз”, Гомельская область (сбор 2016 года, I класс качества);

партия № 1609 – ГЛХУ “Октябрьский лесхоз”, Гомельская область (сбор 2016 года, I класс качества);

партия № 1852 – ГЛХУ “Новогрудский лесхоз”, Гродненская область (сбор 2016 года, I класс качества).

Семена ясеня обыкновенного в феврале 2017 года асептически вводили в культуру *in vitro* на базе биотехнологической лаборатории научно-исследовательского отдела учреждения “Республиканский лесной селекционно-семеноводческий центр” следующим образом:

1. Семена замачивали в дистиллированной воде в течение 48 часов.
2. Удаляли перикарпий.
3. Семена отмывали 72% хозяйственным мылом под проточной водой.
4. Выдерживали в растворе фунгицидов в течение 18 минут (Ридомил Голд и Байтан – по 200 мг на 100 мл раствора с добавлением 2 мг аскорбиновой кислоты и 300 мкл Tween 20 из расчета на 100 мл раствора).

5. Отмывали по 15 минут в 3-х, 4-х емкостях (объемом не меньше 1 л каждая) со стерильной дистиллированной водой, с добавлением 2 мг аскорбиновой кислоты из расчета на 100 мл стерильной дистиллированной воды.

6. Семена стерилизовали в течение 30 минут в 7,5% растворе гипохлорита Na с добавлением 2 мг аскорбиновой кислоты и 300 мкл Tween 20 из расчета на 100 мл стерилизующего раствора.

7. После стерилизации семена отмывали по 15 минут в 3-х, 4-х емкостях (объемом 1 л каждая) со стерильной дистиллированной водой, с добавлением 2 мг аскорбиновой кислоты из расчета на 100 мл стерильной дистиллированной воды.

После стерилизации отработывались три способа введения первичных эксплантов в культуру *in vitro*:

1. Семена помещали в стерильные стеклянные банки объемом 300 мл на фильтровальную бумагу, пропитанную стерильной дистиллированной водой.

2. Семена помещали в банки на поверхность стерильной питательной агаризованной среды ½ Мурасиге и Скуга (МС) [12] без фитогормонов, с добавлением 20 г/л сахарозы, 9 г/л агар-агара; при pH=5,6.

3. Извлеченные из семян зародыши высаживали по одному в пробирки с питательной агаризованной средой ½ МС без фитогормонов, с добавлением 20 г/л сахарозы, 9 г/л агар-агара; при pH=5,6.

После мероприятий по асептическому введению *in vitro* первичные экспланты ясеня обыкновенного культивировали на стеллажах световой установки в условиях освещенности 4000 лк (2 люминесцентных лампы OSRAM L36W/76 Natura), либо 900 лк, при использовании светодиодных светильников серии ДПО01-2х5-001 с цветопередачей “синий” (420÷480 нм), “зеленый” (505÷515 нм), “красный” (660÷690 нм) в соотношении 2:1:6, разработанных в 2010 году на базе филиала “Камертон” ОАО “Интеграл” (г. Пинск) при научно-техническом сопровождении сотрудников научно-исследовательской лаборатории клеточных технологий в растениеводстве учреждения образования “Полесский государственный университет” (г. Пинск); а также при температуре +25±1°C, и фотопериоде день/ночь – 16ч/8ч. Ежедневно проводился учет количества инфицированных, окисленных, стерильных и проросших семян (растущих зародышей). Отработка этапа стабилизации регенерантов ясеня обыкновенного *in vitro* осуществлялась в июне–июле 2017 года, при этом сформированные из первичных эксплантов регенеранты черенковали, и высаживали микрочеренки на питательную, агаризованную среду с микро-, макросолями и органическими соединениями по Андерсона [11], дополненную 1 мг/л зеатина и 0,75 мг/л 24-эпибрассинолида.

Оценка успешной стабилизации регенерантов ясеня обыкновенного *in vitro* осуществлялась в августе–сентябре 2017 года по факту формирования полноценных регенерантов, которые черенковали и (микрочеренки) высаживали на питательную, агаризованную среду с микро-, макросолями и органическими соединениями по Андерсона, дополненную 0,5 мг/л зеатина и 0,01 мг/л 24-эпибрассинолида для размножения *in vitro*.

Фитогормональный стероид 24-эпибрассинолид (24-ЭБ) произведен на базе лаборатории химии стероидов государственного научного учреждения “Институт биоорганической химии НАН Беларуси” (г. Минск) и в составах питательных, агаризованных сред для стабилизации и размножения регенерантов ясеня обыкновенного *in vitro* применялся нами впервые.

Общий математический анализ данных проводили по стандартным методам вариационной статистики [12] с использованием программы статистического анализа данных STATISTICA 6.0 [13].

**Результаты и их обсуждение.** Данные по асептическому введению первичных эксплантов ясеня обыкновенного *in vitro* представлены в таблице 1.

В результате проведенных исследований можно отметить, что самым подходящим типом первичных эксплантов ясеня обыкновенного для асептического введения в культуру *in vitro* являются изолированные зародыши, культивируемые следующим образом:

1. на питательной, агаризованной среде ½ МС с добавлением 20 г/л сахарозы, 9 г/л агар-агара, при pH=5,6;

2. в условиях освещенности 4000 лк (2 люминесцентных лампы OSRAM L36W/76 Natura), при температуре +25±1°C, и фотопериоде день/ночь – 16ч/8ч.

Таблица 1 – Асептическое введение ясеня обыкновенного в культуру *in vitro*

Вариант опыта, № партии семян	Количество инфицированных семян (зародышей), %	Количество окисленных / не растущих семян (или зародышей), %	Количество проросших семян (растущих зародышей), % (примечание)
Дневной свет, 2 люминесцентных лампы OSRAM L36W/76 Natura			
Семена на среде ½ МС			
№ 1584	67	33	25 с зародышевым корешком без дальнейшего роста
№ 1609	67	33	33 с зародышевым корешком без дальнейшего роста
№ 1852	100	0	8 с зародышевым корешком без дальнейшего роста
Семена на увлажненной фильтровальной бумаге			
№ 1584	22	100	0
№ 1609	17	100	0
№ 1852	0	100	0
Зародыши на среде ½ МС			
№ 1609	0	0	<b>100</b>
№ 1852	29	14	<b>57</b>
Светодиодное освещение, светодиодные светильники серии ДПО01–2х5–001			
Зародыши на среде ½ МС			
№ 1584	29	43	29 остановка роста на стадии семядольных листьев
№ 1609	33	67	0

Эти данные согласуются с результатами работы латвийских ученых, которые асептически извлекали зрелые зиготические зародыши из семян после стерилизации и добивались индукции побего- и корнеобразования *in vitro* [4]. Зрелые семена трех генотипов (материнских деревьев) были собраны из разных популяций Латвии. У нестратифицированных семян удаляли перикарпий, дезинфицировали их 70% серной кислотой в течение 1 минуты и 80% этиловым спиртом в течение трех минут с последующим 4-кратным отмыванием в стерильной дистиллированной воде. Зрелые зиготические зародыши асептически извлекали из эндосперма и помещали на агаризованную среду Мурасиге–Скуга, содержащую 1 мг/л 6–бензиламинопурина (БАП), 1 мг/л пантотената кальция и 30 г/л сахарозы. Культивировались изолированные зародыши при температуре +23±2°C (в наших исследованиях температура культивирования составляла +25±1°C), фотопериоде день/ночь – 16ч/8ч, освещении флуоресцентными лампами 80W «холодным белым» либо в термостате в условиях темноты (в наших исследованиях использовали люминесцентные лампы дневного света, либо LED–освещение). Было отмечено сильное влияние генотипа на органогенез для индукции которого использовали гипокотили, зародышевые листья и стебли. Обычно семена прорастают в темноте. В работе латвийских исследователей наблюдалось прорастание (развитие *in vitro* зародыша, изолированного из зрелого семени) как в условиях темноты, так и на свету. При этом листья и каллус формировались чаще всего на свету, а условия темноты активировали образование корней и семядолей у всех генотипов. Второй эксперимент латвийских исследователей показал морфогенез у изолированных трех типов эксплантов: инициальных листьев, гипокотилей и зародышевых стеблей. При этом гипокотили с большей частотой формировали корни, а в остальных случаях – каллус; инициальные листья регенерировали побеги, каллус и корни; зародышевые стебли чаще всего формировали побеги [4].

Морфометрические показатели регенерантов ясеня обыкновенного на этапе стабилизации после асептического введения в культуру *in vitro* представлены в таблице 2, а внешний вид приведен на рисунке.

В присутствии 0,75 мг/л 24-ЭБ и 1 мг/л зеатина в составе питательной, агаризованной среды Андерсона количество побегов у регенерантов не менялось, высота регенерантов несущественно возрастала, а корни формировались у всех регенерантов в количестве от 1–3 шт./регенерант (таблица 2). При этом длина корней варьировала в пределах от 0,6–6,0 см, в зависимости от происхождения семян.

Таблица 2 – Морфометрические показатели регенерантов ясеня обыкновенного на этапе стабилизации после асептического введения в культуру *in vitro*

№ партии семян / дата высаживания эксплантов / тип питательной среды	Количество побегов у проростка, шт.	Длина побега, см	Количество корней у проростка, шт.	Длина корня, см	Диаметр каллуса у эксплантов, см	Примечание
1609 / 22.02.2017 / ½ МС	1	2	1	5,0±0,0	–	Опадают листья у регенерантов
1609 / 22.02.2017 / ½ МС	1	1	–	–	0,6	Буреют и опадают листья у регенерантов
1852 / 22.02.2017 / ½ МС	1	2	5	1,5±0,4	–	Зеленые листья
1852 / 22.02.2017 / ½ МС	1	2	–	–	0,3	Зеленые листья
1584 / 22.02.2017 / ½ МС	1	0,5	–	–	–	Стадия семядольных листьев
1609 / 07.06.2017 / пересажены с ½ МС на АН с Z <sub>1,00</sub> и 24-ЭБ <sub>0,75</sub>	1	2,5	1	4,5±0,5	–	Зеленые листья
1852 / 07.06.2017 / пересажены с ½ МС на АН с Z <sub>1,00</sub> и 24-ЭБ <sub>0,75</sub>	1	2	3	2,0±0,6	–	Зеленые листья
1609 / 19.07.2017 / пересажены с ½ МС на АН с Z <sub>1,00</sub> и 24-ЭБ <sub>0,75</sub>	1	1	1	0,6±0,1	0,8	Буреют и опадают листья у регенерантов
1852 / 19.07.2017 / пересажены с ½ МС на АН с Z <sub>1,00</sub> и 24-ЭБ <sub>0,75</sub>	1	2,5	3	0,8±0,2	0,7	Розово-зеленые листья, с удлиненными изогнутыми черешками
1584 / 19.07.2017 / пересажены с ½ МС на АН с Z <sub>1,00</sub> и 24-ЭБ <sub>0,75</sub>	1	1	1	6,0±0,1	–	Погибли после пересадки на среду АН с Z <sub>0,50</sub> и 24-ЭБ <sub>0,01</sub>

Примечание. Длина корня приведена как среднее арифметическое ± стандартная ошибка среднего арифметического. АН – среда Андерсона [12], МС – среда Мурасиге и Скуга [12]. Z<sub>0,50</sub>, Z<sub>1,00</sub> – 0,5 мг/л или 1 мг/л зеатина; 24-ЭБ<sub>0,01</sub>, 24-ЭБ<sub>0,75</sub> – 0,01 мг/л или 0,75 мг/л 24-эпибрассинолида.

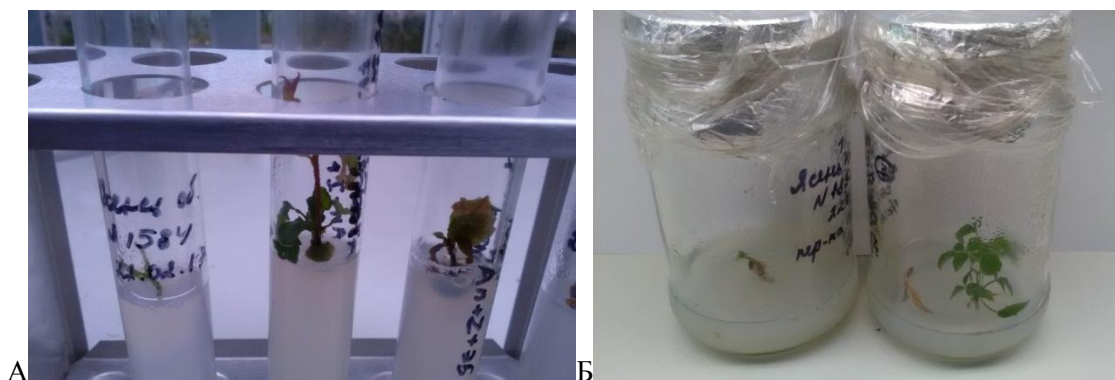


Рисунок – Стабилизация (А) и размножение (Б) регенерантов ясеня обыкновенного *in vitro*

Таким образом, высокая концентрация 24-эпибрассинолида (0,75 мг/л 24-ЭБ) в составе питательной среды, эффективность которой была установлена нами ранее на этапах асептического введения и стабилизации *in vitro* сортовой голубики высокой [14], вполне применима при работе с ясенем обыкновенным на этапе стабилизации регенерантов *in vitro* (таблица 2). При этом в отличие от регенерантов сортовой голубики, в присутствии 0,75 мг/л 24-ЭБ и 1 мг/л зеатина в составе питательной, агаризованной среды Андерсона у всех регенерантов ясеня обыкновенного *in vitro* формировались корни. В данном случае требует отдельного изучения установившееся фитогормональное соотношение в регенерантах ясеня обыкновенного, поскольку можно предположить активацию биосинтеза ауксинов в живых тканях в ответ на достаточно высокую концентрацию экзогенного 24-ЭБ. С учетом присутствия и достаточно высокой концентрации экзогенного цитокинина (1 мг/л зеатина) в составе питательной среды, синтезироваться ауксины должны в значительных количествах для образования у регенеранта корней, поскольку условием для морфогенеза растений по пути корнеобразования является существенное преобладание концентраций ауксинов над таковыми цитокининов.

В дальнейшем также представляет интерес изучение особенностей действия 24-эпибрассинолида на величину коэффициентов размножения ( $KP_{II}$  и  $KP_{\Sigma}$ ) регенерантов ясеня обыкновенного на этапе микроразмножения *in vitro*. С учетом установленных и приведенных выше фактов успешного укоренения *in vitro* регенерантов ясеня обыкновенного в присутствии высоких концентраций 24-ЭБ и зеатина для микроразмножения *in vitro*, возможно, потребуется существенно уменьшить концентрации 24-ЭБ вплоть до полного отказа от его применения в составах питательных, агаризованных сред.

#### Заключение.

1. Наиболее подходящим типом первичного экспланта ясеня обыкновенного для асептического введения в культуру *in vitro* являются изолированные зародыши.

2. Для успешного асептического введения *in vitro* от 57–100% изолированных зародышей ясеня обыкновенного рекомендуется питательная, агаризованная среда Мурасиге и Скуга половинного состава ( $\frac{1}{2}$  МС) без фитогормонов, с добавлением 20 г/л сахарозы, 9 г/л агар-агара, при рН=5,6, а также следующие условия культивирования: освещенность 4000 лк (2 люминесцентных лампы OSRAM L36W/76 Natura), температура  $+25\pm 1^{\circ}\text{C}$ , и фотопериод 16 ч день / 8 ч ночь.

3. Для успешной стабилизации *in vitro* регенерантов ясеня обыкновенного рекомендуется питательная, агаризованная среда Андерсона, дополненная 1 мг/л зеатина и 0,75 мг/л 24-эпибрассинолида, а также следующие условия культивирования: освещенность 4000 лк (2 люминесцентных лампы OSRAM L36W/76 Natura), температура  $+25\pm 1^{\circ}\text{C}$ , и фотопериод 16 ч день / 8 ч ночь.

4. В присутствии, и несмотря на высокие концентрации экзогенного цитокинина (1 мг/л зеатина) и фитогормонального стероида (0,75 мг/л 24-эпибрассинолида) в составе питательной, агаризованной среды Андерсона, за 30–40 дней культивирования *in vitro* у всех регенерантов ясеня обыкновенного формируются корни в количестве от 1–3 длиной от 0,6–6,0 см, в зависимости от генотипа.

#### Список литературы

1. Штукин, С.С. Приоритетные типы лесных культур ясеня обыкновенного в условиях Беларуси / С.С. Штукин, С.Г. Шауро // Лесное и охотничье хозяйство. – 2009. – № 1. – с. 17–22.

2. Микроразмножение и регенерация адвентивных побегов ясеня обыкновенного (*Fraxinus excelsior* L.) в культуре *in vitro* / И.И. Концевая, В.Е. Падутов, К.А. Шестибратов, В.Г. Лебедев // Проблемы лесоведения и лесоводства: сборник научных трудов Института леса НАН Беларуси, Гомель. – 2008. – Вып. 68. – С. 239–244.

3. Лебедев, В.Г. Эффективный способ получения посадочного материала ясеня обыкновенного *in vitro* / В.Г. Лебедев, К.А. Шестибратов // Вестник Московского государственного университета леса. – Лесной вестник. – 2010. – № 3. – С. 112–118.

4. Kuusiene, S. Organogenesis of *Fraxinus excelsior* L. by isolated mature embryo culture / S. Kuusiene, R. Mockeliunaite // Acta Universitates Latviensis, Biology. – 2004. – Vol. 676. – p. 197–200

5. Chalupa, V. Micropropagation of hornbeam (*Carpinus betulus* L.) and ash (*Fraxinus excelsior* L.) / V. Chalupa // Biologia Plantarum. 1990. – Vol. 32. – p. 332–338.

6. Ridout M.S. Micropropagation of common ash (*Fraxinus excelsior* L.) / M.S. Ridout, N. Hammat // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 1992. – Vol. 31. – p. 67–74.

7. Hammat, N. Shoot initiation in the leaflet axils of compound leaves of micropropagated shoots of juvenile and mature common ash (*Fraxinus excelsior* L.). / N. Hammat // Journal of Experimental Botany. – 1994. – Vol. 45. – p. 173–193.

8. Effect of medium on *in vitro* germination of embryos of *Fraxinus excelsior* L. / I. Piiev, A. Scaltsoyannes, M. Tsaksira, P. Tsoulpha, D. Dancheva // Muzeul Olteniei Craiova. Oltenia. Studii și comunicări. Științele Naturii. – 2010. – Vol. 26. – №1. – p. 34–38.

9. Rapid seedling obtaining from European ash species *Fraxinus excelsior* L. and *Fraxinus angustifolia* Vahl. / C. Raquin, B. Jung–Muller, J. Dufour, N. Frascaria–Lacoste // Annals of Forest Science. – 2002. – Vol. 59. – p. 219–224.

10. Лебедев, В.Г. Эффективный способ получения посадочного материала ясеня обыкновенного *in vitro* / В.Г. Лебедев, К.А. Шестибратов // Вестник Московского государственного университета леса. – Лесной вестник. – 2010. – № 3. – С. 112–118.

11. Trigiano, R.N. Plant tissue culture concepts and laboratory exercises / R.N. Trigiano, D.J. Gray. – US/MA, CRC Press LLC., 1999–2000. – 454 p.

12. Доспехов, Б.А. Методика полевого опыта / Б.А. Доспехов. – М.: Агропромиздат, 1985. – 350 с.

13. Боровиков, В.П. STATISTICA: Искусство анализа данных на компьютере / В.П. Боровиков. – СПб: Питер, 2001. – 688 с.

14. Кудряшова, О.А. Физиолого–биохимические особенности действия brassinостероидов на процессы микрочлониального размножения голубики высокорослой *Vaccinium corymbosum* L.: диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05. – физиология и биохимия растений / О.А. Кудряшова. – Минск, 2015. – 175 с.

**KUDRYASHOVA O.A.**

**CHALEY A.V.**

**BUY A.V.**

**LUKONINA U.D.**

**VODCHIC N.V.**

**BORISEVICH T.A.**

**VOLOTOVICH A.A.**

## **COMPARATIVE ANALYSIS OF ASEPTIC INTRODUCTION AND STABILIZATION IN VITRO OF DIFFERENT EXPLANTS OF THE EUROPEAN ASH (*FRAXINUS EXCELSIOR* L.)**

**Summary.** For the first time in the world the results of application of 24–epibrassinolid in a stage of stabilization *in vitro* of european ash (*Fraxinus excelsior* L.) regenerants of seed origin are given in the present article. In work there are used the seeds collected in 2016 in the Gomel and Grodno regions of the Republic of Belarus. It is shown that the most suitable type of primary explants of european ash for aseptic introduction *in vitro* are the isolated germs. For successful aseptic *in vitro* introduction in amount of 57–100% of the european ash isolated germs is recommended the nutrient, agarized medium of half Murasige and Skoog's compound without phytohormones, with addition of 20 g per liter of sucrose, of 9 g per liter of agar–agar, and of pH=5,6. For successful *in vitro* stabilization of the european ash

regenerants is recommended the nutrient, agarized Anderson's medium added with 1 mg per liter of zeatin and of 0,75 mg per liter of 24-epibrassinolid. At the same time, all of the european ash regenerants depending on a genotype, are formed roots in quantity from 1–3 and from 0,6–6,0 cm long.

## References

1. Shtukin S.S., Shauro S.G. *Prioritetnye tipy lesnykh kul'tur iasenia obyknovennogo v usloviakh Belarusi* [Main types of forest cultures of European ash in Belarus]. *Lesnoe i okhotnich'e khoziaistvo*, 2009, iss. 1, pp. 17–22 (In Russian).
2. Kontsevaia I.I., Padutov V.E., Shestibratov K.A., Lebedev V.G. *Mikrorazmnozhenie i regeneratsiia adventivnykh pobegov iasenia obyknovennogo (Fraxinus excelsior L.) v kul'ture in vitro* [Micropropagation and regeneration of European ash adventitious shoots of (*Fraxinus excelsior* L.) in vitro]. *Problemy lesovedeniia i lesovodstva*. 2008, iss. 68, pp. 239–244 (In Russian).
3. Lebedev V.G., Shestibratov K.A. *Effektivnyi sposob polucheniia posadochnogo materiala iasenia obyknovennogo in vitro* [An effective way of obtaining European ash planting material in vitro]. *Vestnik Moskovskogo gosudarstvennogo universiteta lesa – Lesnoi vestnik*. 2010, no. 3, pp. 112–118 (In Russian).
4. Kuusiene S., Mockeliunaite R. Organogenesis of *Fraxinus excelsior* L. by isolated mature embryo culture. *Acta Universitates Latviensis, Biology*, 2004, Vol. 676, pp. 197–200
5. Chalupa V. Micropropagation of hornbeam (*Carpinus betulus* L.) and ash (*Fraxinus excelsior* L.). *Biologia Plantarum*, 1990, Vol. 32, pp. 332–338
6. Ridout M.S., Hammat N. Micropropagation of common ash (*Fraxinus excelsior* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1992, Vol. 31, pp. 67–74
7. Hammat N. Shoot initiation in the leaflet axils of compound leaves of micropropagated shoots of juvenile and mature common ash (*Fraxinus excelsior* L.). *Journal of Experimental Botany*, 1994, Vol. 45, pp. 173–193
8. Iliev I., Scaltsoyannes A., Tsaksira M., Tsoulpha P., Dancheva, D. Effect of medium on in vitro germination of embryos of *Fraxinus excelsior* L. *Muzeul Olteniei Craiova. Oltenia. Studii și comunicări. Științele Naturii*, 2010, Vol. 26, no. 1, pp. 34–38
9. Raquin C., Jung–Muller B., Dufour J., Frascaria–Lacoste N. Rapid seedling obtaining from European ash species *Fraxinus excelsior* L. and *Fraxinus angustifolia* Vahl. *Annals of Forest Science*, 2002, Vol. 59, pp. 219–224.
10. Lebedev V.G., Shestibratov K.A. *Effektivnyi sposob polucheniia posadochnogo materiala iasenia obyknovennogo in vitro.* [An effective way of obtaining European ash planting material in vitro] *Vestnik Moskovskogo gosudarstvennogo universiteta lesa – Lesnoi vestnik*, 2010, no. 3, pp. 112–118 (in Russian).
11. Trigiano R.N., Gray D.J. *Plant tissue culture concepts and laboratory exercises*. US/MA, CRC Press LLC., 1999–2000, 454 p.
12. Dospikhov B.A. *Metodika polevogo opyta* [Methodology of field experience]. Moscow, Agropromizdat Publ., 1985, 350 p. (In Russian)
13. Borovikov V.P. *STATISTICA: Iskusstvo analiza dannykh na komp'iutere* [STATISTICA. The art of analyzing data on a computer]. Saint Petersburg, 2001, 688 p. (In Russian)
14. Kudriashova O.A. *Fiziologo–biokhimicheskie osobennosti deistviia brassinosteroidov na protsessy mikroklonal'nogo razmnozheniia golubiki vysokorosloi Vaccinium corymbosum L.* [Physiological and biochemical features of brassinosteroids activity on the processes of microclonal reproduction of tall blueberry *Vaccinium corymbosum* L]. Ph. D. thesis. Minsk, 2015. 175 p. (In Russian)

Received 29 september 2017