

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ  
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ**

**Кафедра клеточной биологии и биоинженерии растений**

**РОЗНИЧЕНКО**  
Елена Викторовна

**ЭФФЕКТ ИМПУЛЬСНЫХ ОБРАБОТОК АНТИОКСИДАНТАМИ  
НА УКОРЕНЕНИЕ МИКРОКЛОНОВ ДРЕВЕСНЫХ РАСТЕНИЙ ПРИ ИХ  
ПЕРЕВОДЕ В УСЛОВИЯ *EX VITRO***

Аннотация дипломной работы

Научный руководитель:  
ассистент кафедры клеточной  
биологии и биоинженерии  
растений С.Л. Уснич

Допущен к защите  
«\_\_»\_\_\_\_\_2020 г.

Зав. кафедрой клеточной биологии и биоинженерии растений  
кандидат биологических наук, доцент, И.И. Смолич

Минск, 2020

# ОГЛАВЛЕНИЕ

|                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....                                                                                          | 4  |
| РЕФЕРАТ .....                                                                                                               | 5  |
| ВВЕДЕНИЕ .....                                                                                                              | 8  |
| ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....                                                                                              | 10 |
| 1.1 Размножение древесных растений .....                                                                                    | 10 |
| 1.1.1 Вегетативный способ размножение древесных пород.....                                                                  | 10 |
| 1.1.2 Методики и особенности вегетативного размножения древесных <i>in vitro</i> .....                                      | 10 |
| 1.2 Этапы микроклонального размножения .....                                                                                | 11 |
| 1.2.1 Питательные среды для микроклонального размножения древесных растений <i>in vitro</i> .....                           | 12 |
| 1.3. Воздействие стрессовых условий на рост и развитие растений в условиях <i>in vitro</i> .....                            | 12 |
| 1.3.1 Водный дефицит.....                                                                                                   | 13 |
| 1.3.2 Нарушение газообмена.....                                                                                             | 13 |
| 1.3.3 Высокое содержания углеводов в субстрате.....                                                                         | 14 |
| 1.3.4 Механический стресс и повреждение .....                                                                               | 15 |
| 1.3.5 Окислительный стресс.....                                                                                             | 16 |
| 1.3.6 Влияние стрессоров на адаптацию в условиях <i>ex vitro</i> .....                                                      | 17 |
| 1.3.7 Генерация АФК, как ранний механизм стресс-защиты .....                                                                | 18 |
| ГЛАВА 2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....                                                                                  | 20 |
| 2.1 Объект исследования .....                                                                                               | 20 |
| 2.2 Культивирование карельской берёзы.....                                                                                  | 21 |
| 2.3 Анализ развития стресса в корнях карельской берёзы на этапе изменения условий роста.....                                | 21 |
| 2.3.1 Изучения этапов течения механического стресса в корне карельской берёзы .....                                         | 22 |
| 2.3.2 Определение кинетики развития окислительного стресса у карельской берёзы в результате обработки антиоксидантами ..... | 22 |
| 2.3.3 Интенсивность выработки АФК в условиях солевого и осмотического стресса .....                                         | 23 |
| 2.3.4 Статистическая обработка данных.....                                                                                  | 23 |
| 2.4. Обработка, подготовка и высадка в условия <i>ex vitro</i> .....                                                        | 24 |
| 2.4.1 Анализ укоренения микроклонов берёзы карельской.....                                                                  | 27 |
| 2.5 Повторная обработки микроклонов карельской берёзы прайминг-агентами .....                                               |    |

|                                                                                                                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| .....                                                                                                                                                                                | 27 |
| ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ .....                                                                                                                                            | 29 |
| 3.1. Генерация АФК под действием механического стресса.....                                                                                                                          | 29 |
| 3.2 Влияние антиоксидантов и блокаторов катионных каналов на продукцию АФК, индуцируемую механическим повреждением .....                                                             | 31 |
| 3.3. Воздействие осмотического стресса и высоких концентраций NaCl на продукцию АФК в клетках корня берёзы карельской .....                                                          | 33 |
| 3.4. Анализ жизнеспособности микроклонов берёзы карельской при их переводе в условия <i>ex vitro</i> .....                                                                           | 36 |
| 3.5. Анализ укореняемости микроклонов карельской берёзы при переводе их в условия <i>ex vitro</i> на фоне импульсной обработки стресс-протекторными агентами и антиоксидантами ..... | 40 |
| 3.6 Адаптация к условиям <i>ex vitro</i> берёзы карельской при повторной обработке прайминг-агентами .....                                                                           | 42 |
| 3.7 Результат укореняемости берёзы карельской при повторной обработке прайминг-агентами .....                                                                                        | 44 |
| 3.8 Результаты сравнения двух проведённых тестов .....                                                                                                                               | 47 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....                                                                                                                                                                     | 48 |
| СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....                                                                                                                                               | 49 |

## **ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

АФК – активные формы кислорода

КАТ – каталаза

СОД – супероксиддисмутаза

ЗКГ – запрограммированная клеточная гибель

ДГЭ – дигидроэтидиум

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИМК – индолил-3-масляная кислота

ЭБ – эпибрасинолид

ЭК – эпикастастерон

ИУК – индолилуксусная кислота

ДМСО – диметилсульфоксид

ДТМ – диатомит

ПЭГ – полиэтиленгликоль

WPM – Woody Plant Medium

## РЕФЕРАТ

Дипломная работа 53 с., 11 рис., 58 источников.

*ФИТОГОРМОНЫ, АНТИОКСИДАНТЫ, ПРАЙМИНГ, ЭКСПЛАНТЫ, КУЛЬТУРА IN VITRO, МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ, БЕРЁЗА КАРЕЛЬСКАЯ, ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ МИКРОСКОПИЯ.*

Целью работы было освоение методов поддержания культуры *in vitro*, техники флуоресцентной микроскопии на базе АФК-зонда дигидроэтидиум и характеристика генерации АФК у микроклонов под действием механического, осмотического и ионного стресса.

Объектом исследования в данной работе выступали 3 месячные микроклоны берёзы карельской (*Betula pendula* var. *Carelica*) изъятые из стерильных условий культивирования *in vitro*.

Методы исследования: техника *in vitro* культуры, флуоресцентная микроскопия с использованием флуоресцентного зонда дигидроэтидиум с фильтром FITC, светлопольная микроскопия, анализ ростовых параметров.

Установлено, что использование флуоресцентного зонда дигидроэтидиум в совокупности с фильтром FITC даёт возможность получить детектируемый сигнал в корнях микроклонов берёзы карельской, что говорит об идеи исследования окислительного стресса с помощью данной системы. Наивысший уровень супероксид-зависимой флуоресценции ДГЭ наблюдается через 60 мин после переноса клонированных растений в условия *ex vitro*, максимальное уменьшение интенсивности флуоресценции ДГЭ дала обработка раствором тиомочевины, которая не чувствительна к  $O_2\bullet^-$ , но быстро устраняет гидроксильные радикалы ( $HO\bullet$ ) и некоторые другие наиболее реакционно способные АФК. Обработка раствором тиомочевины увеличивает количество жизнеспособных клеток корней микроклонов берёзы карельской перенесенной в условия *ex vitro*, но самым лучшим адаптогеном для микроклонов берёзы карельской является эпибрассинолид. В условиях акклиматизации клонированные растения сталкиваются с рядом стрессоров и испытывают недостаток питательных веществ, недоразвитие растительных органов и систем. Многообразие действия эпибрассинолида позволило укрепить иммунную систему растения, нарастить клеточную массу и активировать процессы корнеобразования. Полученные результаты показали перспективность и актуальность обработки микроклонов берёзы карельской с целью повышения выживаемости и жизнеспособности растений, при переводе их в условия *ex vitro*.

## РЭФЕРАТ

Дыпломная работа 53 с., 11 мал., 58 крыніц.

*ФІТОГОРМОНЫ, АНТИАКСИДАНТЫ, ПРАЙМІНГ, ЭКСПЛАНТЫ, КУЛЬТУРА IN VITRO, МІКРАКЛАНАЛЬНАЕ РАЗМНАЖЭННЕ, БЯРОЗА КАРЕЛЬСКАЯ, ФЛЮАРЭСЦЕНТНАЯ МІКРАСКАПІЯ.*

Мэтай работы было засваенне метадаў падтрымання культуры *in vitro*, тэхнікі флюарэсцэнтнай мікраскапіі на базе АФК-зонда дыгідраэтыдыум і характарыстыка генерацыі АФК у мікраклонаў пад дзеяннем механічнага, асматычнага і іённага стрэсу.

Аб'ектам даследавання ў дадзенай работе выступалі 3 месячныя мікраклоны бярозы карэльскай (*Betula pendula* var. *Carelica*) канфіскаваныя з стэрыльных умоў культывавання *in vitro*.

Метады даследавання: тэхніка *in vitro* культуры, флюарэсцэнтная мікраскапія з выкарыстаннем флюарэсцэнтнага зонда дыгідраэтыдыум з фільтрам FITC, светлапольная мікраскапія, аналіз роставых параметраў.

Устаноўлена, што выкарыстанне флюарэсцэнтнага зонда дыгідраэтыдыум ў сукупнасці з фільтрам FITC дае магчымасць атрымаць дэтэктывумый сігнал у каранях мікраклонаў бярозы карэльскай, што кажа аб ідэі даследавання акісляльнага стрэсу з дапамогай дадзенай сістэмы. Найвышэйшы ўзровень супераксід-залежнай флюарэсцэнцыі ДГЭ назіраецца праз 60 хвілін пасля пераносу кланаваных раслін ва ўмовы *ex vitro*, максімальнае памяншэнне інтэнсіўнасці флуарэсцэнцыі ДГЕ дала апрацоўка растворам тыямачавіны, якая не адчувальная да  $O_2\bullet^-$ , але хутка ліквідуе гідраксільная радыкалы ( $HO\bullet$ ) і некаторыя іншыя найбольш рэакцыйна здольныя АФК. Апрацоўка растворам тыямачавіны павялічвае колькасць жыццяздольных клетак каранёў мікраклонаў бярозы карэльскай перанесенай ва ўмовы *ex vitro*, але самым лепшым адаптагенам для мікраклонаў бярозы карэльскай з'яўляецца эпібрасінолід. Ва ўмовах акліматызацыі кланаваныя расліны сутыкаюцца з шэрагам стрэсараў і адчуваюць недахоп пажыўных рэчываў, недаразвіццё раслінных органаў і сістэм. Разнастайнасць дзеяння эпібрасіноліда дазволіла ўмацаваць імунную сістэму расліны, нарасціць клеткавую масу і актывізаваць працэсы утварэння каранёў. Атрыманыя вынікі паказалі перспектывнасць і актуальнасць апрацоўкі мікраклонаў бярозы карэльскай з мэтай павышэння выжывальнасці і жыццяздольнасці раслін, пры перакладзе іх ва ўмовы *ex vitro*.

## ABSTRACT

Graduate work 53 p., 11 pict., 58 citations.

*PHYTOHORMONES, ANTIOXIDANTS, PRIMING, EXPLANTS, CULTURE IN VITRO, MICROCLONAL PROPAGATION, BIRCH KARELIAN, FLUORESCENT MICROSCOPY.*

The aim of the work was to master the methods of maintaining culture *in vitro*, the technique of fluorescence microscopy based on the ROS probe dihydroetidium and to characterize the generation of ROS in microclones under the influence of mechanical, osmotic and ion stress.

The object of research in this work was 3-month microclones of Karelian birch (*Betula pendula* var. *Carelica*) removed from sterile conditions of *in vitro* cultivation.

Research methods: *in vitro* culture technique, fluorescent microscopy using a fluorescent probe dihydroetidium with a FITC filter, light-field microscopy, growth parameters analysis.

It was found that the use of a fluorescent probe dihydroetidium in combination with a FITC filter makes it possible to obtain a detectable signal in the roots of microclones of Karelian birch, which indicates the idea of studying oxidative stress using this system. The highest level of superoxide-dependent DGE fluorescence is observed only 60 minutes after the transfer of cloned plants to *ex vitro* conditions, the maximum reduction in the intensity of DGE fluorescence was given by treatment with a solution of thiourea, which is not sensitive to  $O_2^{\bullet-}$ , but quickly eliminates hydroxyl radicals ( $NO^{\bullet}$ ) and some other most reactive ROS. Treatment with a thiourea solution increases the number of viable root cells of Karelian birch microclones transferred to *ex vitro* conditions, but the best adaptogen for Karelian birch microclones is epibrassinolide. In the conditions of acclimatization, cloned plants face a number of stressors and experience a lack of nutrients, underdevelopment of plant organs and systems. The variety of actions of epibrassinolide allowed to strengthen the plant's immune system, increase cell mass and activate root formation processes. The results obtained showed the prospects and relevance of processing microclones of Karelian birch in order to increase the survival and viability of plants, when transferring them to *ex vitro* conditions.