

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра клеточной биологии и биоинженерии растений

КУЛИНКОВИЧА
Александра Витальевича

**ВЛИЯНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ И ИХ
КОМПЛЕКСОВ С ПЕРЕХОДНЫМИ МЕТАЛЛАМИ
НА УРОВЕНЬ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ
АКТИВНОСТИ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ И РОСТ КЛЕТОК
КОРНЯ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ**

Аннотация дипломной работы

Научный руководитель:
старший преподаватель
М.А. Войтехович

Допущен к защите

«___» _____ 2021 г.

Зав. кафедрой клеточной биологии и биоинженерии растений
доцент, к.б.н., И.И. Смолич

Минск, 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	3
РЕФЕРАТ	4
ВВЕДЕНИЕ.....	7
ГЛАВА 1 ЛИТЕРАТУРЫЙ ОБЗОР	9
1.1 Общая характеристика важнейших низкомолекулярных органических кислот растений.....	9
1.1.1 Аскорбиновая кислота	9
1.1.2 Яблочная кислота	13
1.1.3 Фумаровая кислота	15
1.1.4 Лимонная кислота	18
1.2 Кальциевая сигнализация в жизни растений	19
1.2.1 Формирование и распространение кальциевого сигнала	21
1.2.3 Ca^{2+} -проницаемые катионные каналы растений.....	22
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	24
2.1 Объект исследования	24
2.2 Культивирование растений арабидопсиса в стерильных условиях	25
2.3 Ca^{2+} -эквориновая хемилюминиметрия	25
2.4 Ростовый тест с заменой среды.....	27
2.5 Статистическая обработка данных.....	28
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	30
3.1. Влияние органических кислот на повышение уровня $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ в клетках корней <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.	30
3.2. Влияние органических кислот и их комплексов с переходными металлами на изменение уровня $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ в клетках корней <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.	32
3.3 Изменение длины основного корня <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh. при выращивании на среде с органическими кислотами.....	38
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	44
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	45

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

$[Ca^{2+}]_{цит.}$ – временное повышение уровня Ca^{2+} в цитоплазме;
АК – аскорбиновая кислота;
Аск⁻ – аскорбильный радикал;
АТФ – аденозинтрифосфат;
АФК – активные формы кислорода;
ГАМК – гамма - аминomásляная кислота;
ГДФ – гуанозиндифосфат;
ДАК – дегидроаскорбат;
ДАКР – дегидроаскорбатредуктазы;
ЗКУ – замыкающие клетки устьиц;
ЛК – лимонная кислота;
НАД⁺ – окисленная форма никотинамидадениндинуклеотида;
НАДФ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат;
САМ – кислотный цикл толстянковых;
УДФ – уридин-5-дифосфат;
ФК – фумаровая кислота;
цАМФ – циклический аденозинмонофосфат;
цГМФ – циклический гуанозинмонофосфат;
ЩУК – щавелевоуксусная кислота; ЭПР –
эндоплазматический ретикулум; ЯК –
яблочная кислота.

РЕФЕРАТ

Дипломная работа: 48 страниц, 18 рисунков, 47 источников.

ОРГАНИЧЕСКИЕ КИСЛОТЫ, ПЕРЕХОДНЫЕ МЕТАЛЛЫ, КАЛЬЦИЕВАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ, *ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH., ЭКВОРИНОВАЯ ХЕМИЛЮМИНОМЕТРИЯ, РОСТОВЫЕ ТЕСТЫ

Цель работы: установить закономерности воздействия органических кислот и их комплексов с переходными металлами на уровень цитоплазматической активности ионов кальция и рост клеток корня *Arabidopsis thaliana* (L.).

Исследования проводились с использованием методики Ca^{2+} -эквориновой хемилюминесценции на интактных корнях 7-12-дневных проростков арабидопсиса, конститутивно экспрессирующих фотобелок экворин в цитоплазме. С использованием техники замены среды были охарактеризованы изменения роста корней арабидопсиса в ответ на введение в среду культивирования органических кислот.

Было показано, что экзогенный аскорбат в концентрациях 1, 10 и 30 мМ вызывал увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит.}}$ в клетках корня арабидопсиса. Аскорбат-индуцируемые Ca^{2+} -сигналы имели волнообразную форму с одним пиком, достигая максимума в течение 3-5 мин в зависимости от тестируемой концентрации. Малат, цитрат и фумарат в концентрации 1 мМ не вызывали подобной реакции. Ионы металлов, такие как медь, железо и марганец в концентрации 1 мМ приводили к увеличению $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит.}}$. Введение в среду совместно с аскорбатом ионов меди и железа в концентрации 1 мМ стимулировало аскорбат-индуцируемое повышение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит.}}$. Наибольшей активностью в этом отношении обладали ионы меди. Комплекс 1 мМ марганец-аскорбат уменьшал $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит.}}$ почти в 3 раза по сравнению с чистым аскорбатом. Комплекс 1 мМ марганец-малат вызывал увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит.}}$ более чем в 3 раза по сравнению с чистым малатом. Комплексы 1 мМ цитрат-медь и малат-медь снижали $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит.}}$ чистой меди в 1,7 и 2,8 раза, соответственно. Фумарат не вступал в редокс-реакцию ни с одним из протестированных металлов.

Были охарактеризованы изменения роста корней арабидопсиса в ответ на введение в среду культивирования органических кислот. Аскорбат в концентрации 0,3 мМ стимулировал рост корней арабидопсиса на 25%, тогда как 1 мМ аскорбат угнетал рост корней на 20%. Добавление малата, цитрата и фумарата не приводило к увеличению роста корней. Содержание в среде выращивания малата (во всех протестированных концентрациях) угнетало рост корней. Фумарат начинал снижать рост корней с 0,3 мМ, а цитрат с 1 мМ.

РЭФЕРАТ

Дыпломная работа: 48 старонак, 18 малюнкаў, 47 крыніц.

АРГАНІЧНЫЯ КІСЛОТЫ, ПЕРАХОДНЫЯ МЕТАЛЫ, КАЛЫЦЫЕВАЯ СІГНАЛІЗАЦЫЯ, *ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) НЕУНН., ЭКВАРЫНАВАЯ ХЕМІЛЮМІНОМЕТРЫЯ, РОСТАВЫЯ ТЭСТЫ

Мэта работы: усталяванне заканамернасці ўздзеяння арганічных кіслат і іх комплексаў з пераходнымі металамі на ўзровень цытаплазматычнай актыўнасці іёнаў кальцыя і росту клетак корні *Arabidopsis thaliana* (L.).

У даследаванні выкарыстоўвалася методыка Ca^{2+} -экварынавай хемілюмінаметрыі на інтактных каранях 7-12-дзённых праросткаў арабідопсіса, канстытуцыяна экспрэсуючых фотабялок экварын у цытаплазме. З выкарыстаннем тэхнікі замены субстрату былі ахарактарызаваныя змены роставых працэсаў каранёў арабідопсіса ў адказ на ўвядзенне ў асяродак культывавання арганічных кіслот.

Было паказана, што экзагенны аскарбат ў канцэнтрацыях 1, 10 і 30 мМ выклікаў павелічэнне $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цыт.}}$ у клетках караня арабідопсіса. Аскарбат-індуцыруемыя Ca^{2+} -сігналы мелі хвалепадобную форму з адным пікам, дасягаючы максімуму на працягу 3-5 мін у залежнасці ад тэставанай канцэнтрацыі. Малат, цытрат і фумарат у канцэнтрацыі 1 мМ не выклікалі падобнай рэакцыі. Іёны металаў, такія як медзь, жалеза і марганец у канцэнтрацыі 1 мМ прыводзіць да павелічэння $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цыт.}}$. Увядзенне ў асяродак сумесна з аскарбам іёнаў медзі і жалеза ў канцэнтрацыі 1 мМ стымулявала аскарбат-індуцыраванае павышэнне $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цыт.}}$. Найбольшай актыўнасцю ў гэтых адносінах валодалі іёны медзі. Комплекс 1 мМ марганец-аскарбат памяншаў $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цыт.}}$ амаль у 3 разы ў параўнанні з чыстым аскарбам. Комплекс 1 мМ марганец-малат выклікаў павелічэнне $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цыт.}}$ больш чым у 3 разы ў параўнанні з чыстым малатам. Комплексы 1 мМ цытрат-медзь і малат-медзь зніжалі $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цыт.}}$ чыстай медзі ў 1,7 і 2,8 разы, адпаведна. Фумарат не ўступаў у редокс-рэакцыю ні з адным з пратэставаных металаў.

Былі ахарактарызаваныя змены росту каранёў арабідопсіса ў адказ на ўвядзенне ў асяродак культывавання арганічных кіслот. Аскарбат у канцэнтрацыі 0,3 мМ стымуляваў рост каранёў арабідопсіса на 25%, тады як 1 мМ аскарбат прыгнятаў рост каранёў на 20%. Даданне малата, цытрата і фумарат не прыводзіць да павелічэння росту каранёў. Утрыманне ў асяроддзі вырошчвання малата (ва ўсіх пратэставаных канцэнтрацыях) прыгнятала рост каранёў. Фумарат пачынаў зніжаць рост каранёў з 0,3 мМ, а цытрат з 1 мМ.

ABSTRACT

Thesis contents: 48 pages, 18 figures, 47 sources.

ORGANIC ACIDS, TRANSITION METALS, CALCIUM SIGNALING,
ARABIDOPSIS THALIANA (L.) HEYNH., EQUORIC CHEMILUMINOMETRY,
GROWTH TESTS

The aim of the project was to determine the effect of acids and their complexes with transition metals on the level of cytoplasmic activity of calcium and the growth of *Arabidopsis thaliana* (L.) root cells.

The study was conducted using Ca^{2+} -aequorin chemiluminometry on the intact roots of 7-12-days old *Arabidopsis* seedlings, modified to constitutively express a cytoplasm-localized luminescent protein aequorin. Using gel medium exchange technique, changes in the growth processes of *Arabidopsis* roots in response to the introduction of acids into the culture medium were characterized.

It was shown that exogenous ascorbate at concentrations of 1, 10, and 30 mM caused an increase in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt.}}$ in the cells of the *Arabidopsis* root. Ascorbate-induced Ca^{2+} signals had a wave-like shape with one peak, reaching a maximum within 3-5 min, depending on the tested concentration. Malate, citrate and fumarate at a concentration of 1 mM did not induce such a reaction. Metal ions such as copper, iron and manganese at a concentration of 1 mM led to an increase in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt.}}$. The introduction of copper and iron ions in a concentration of 1 mM into the medium together with ascorbate stimulated the ascorbate-induced increase in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt.}}$. The greatest activity was observed with copper ions. The 1 mM manganese-ascorbate complex reduced $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt.}}$ almost 3 times compared to pure ascorbate. The 1 mM manganese-malate complex caused an increase in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt.}}$ more than 3 times compared to pure malate. Complexes of 1 mM citrate-copper and malate-copper decreased $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt.}}$ pure copper by 1.7 and 2.8 times, respectively. Fumarate did not participate in redox reaction with any of the metals tested.

Changes in the growth of *Arabidopsis* roots in response to the introduction of organic acids into the culture medium were characterized. Ascorbate at a concentration of 0.3 mM stimulated the growth of *Arabidopsis* roots by 25%, while 1 mM ascorbate inhibited root growth by 20%. The addition of malate, citrate and fumarate did not increase root growth. Malate content in the growing medium (in all tested concentrations) inhibited root growth. Fumarate began to reduce root growth at 0.3 mM, and citrate at 1 mM.