

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

КУЧИНСКАЯ Виктория Александровна

**АНАЛИЗ ВОЗДЕЙСТВИЯ ВЫСОКИХ УРОВНЕЙ NaCl НА
АКТИВНОСТЬ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО КАЛЬЦИЯ В
КЛЕТКАХ КОРНЯ *ARABIDOPSIS THALIANA***

Аннотация к магистерской диссертации

специальность 1-31 80 11 «Биохимия»

Научный руководитель
Демидчик Вадим Викторович
доктор биологических наук,
декан биологического
факультета БГУ

Допущена к защите

« ___ » _____ 2021 г.

Зав. кафедрой клеточной биологии и биоинженерии растений

_____ И.И. Смолич

доцент, кандидат биологических наук

Минск, 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

Реферат	4
Введение.....	7
Глава 1 Литературный обзор.....	10
1.1 Общее влияние избытка NaCl на растительный организм	10
1.2 Механизмы адаптации растений к засолению, связанные с кальциевой сигнализацией.....	12
1.2.1 Сигнальный путь SOS (salt-overly-sensitive).....	13
1.3 НАДФН-оксидазы	14
1.4 Механочувствительные кальций-проницаемые каналы	17
Глава 2 Материалы и методы исследования	19
2.1 Объект исследования	19
2.2 Методы исследования.....	20
2.2.1 Культивирование <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh. в условиях <i>in vitro</i> для хемилюминометрических методов исследования	20
2.2.2 Ростовый тест с заменой среды.....	21
2.2.3 Ca ²⁺ -эквириновая хемилюметрия	22
2.3 Статистическая обработка данных.....	24
Глава 3 Результаты и их обсуждение	26
3.1 Изменение длины основного корня при выращивании растений <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh. на среде с высокими уровнями NaCl	26
3.2 Влияние NaCl на [Ca ²⁺] _{цит.} в клетках корня <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh. 28	
3.3 Воздействие блокатора катионных каналов Gd ³⁺ на NaCl-индуцируемые Ca ²⁺ -сигналы	31
3.4 Эффект агентов, устраняющих АФК на NaCl-индуцируемые Ca ²⁺ -сигналы 33	
3.5 Влияние дифенилениодония на NaCl-индуцируемые Ca ²⁺ -сигналы в клетках корня <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.	37
3.6 Воздействие NaCl на [Ca ²⁺] _{цит.} в клетках корня нокаутного мутанта <i>oscal</i> .. 39	
Заключение	42
Список использованных источников	43

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ABA – абсцизовая кислота;
CaM – кальмодулин;
CBL – кальциневрин B-подобные белки;
CDPK – кальций-зависимые протеинкиназы;
CIPK – взаимодействующие с CBL протеинкиназы;
GSH – восстановленный глутатион;
GSSG – дисульфид глутатиона;
H₂O₂ – перекись водорода;
HO[•] – гидроксильный радикал;
MAPK – митоген-активируемые протеинкиназы;
NSCC – неселективные катионные каналы;
O₂^{•-} – супероксидный радикал или супероксид;
¹O₂ – синглетный кислород;
WT – дикий тип;
АФК – активные формы кислорода;
ДМСО – диметилсульфоксид;
ДФИ – дифенилениодоний;
НАД – никотинамидадениндинуклеотид;
НАДФ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат;
ПМ – плазматическая мембрана

РЕФЕРАТ

Магистерская работа: 35 страниц, 14 рисунков, 61 источник.

ХЛОРИД НАТРИЯ, КАЛЬЦИЕВАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ, *ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH., ЭКВОРИНОВАЯ ХЕМИЛЮМИНОМЕТРИЯ, РОСТОВЫЕ ТЕСТЫ

Цель работы: проанализировать влияние повышенных уровней NaCl на кальциевую сигнализацию и ростовые процессы в корневых клетках *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. дикого типа и нокаутных растений по гену механочувствительного канала OSCA1.

Исследования проводились с использованием эквориновой хемилюминометрии на интактных корнях 7-12-дневных проростков. С использованием техники замены среды были охарактеризованы изменения ростовых процессов в ответ на введение в среду NaCl.

Результаты проведенных исследований показали, что замена среды на среду, содержащую 2 mM NaCl приводит к увеличению скорости роста корней на 20,6%. Статистически-достоверное замедление скорости роста корней по сравнению с контрольной группой было обнаружено только при добавлении 75 mM NaCl (угнетение роста на 10-15%). Значительное ингибирование суточного прироста основного корня (30% и выше) отмечалось при добавлении в среду выращивания NaCl в концентрации свыше 100 mM. В опытах с использованием Ca²⁺-эквориновой хемилюминометрии продемонстрировано, что добавление NaCl в концентрации выше 100 mM вызывало статистически достоверное повышение [Ca²⁺]_{цит.} в клетках корня. Присутствие в тестовом растворе 0,1 mM Gd³⁺ ингибировало развитие Ca²⁺-сигналов в ответ на NaCl (на 60-70% в случае 100 mM NaCl). Схожее воздействие на NaCl-индуцируемые Ca²⁺-сигналы оказывал восстановленный глутатион (0,1 mM GSH снижал пиковое значение [Ca²⁺]_{цит.} приблизительно на 60%). Добавление к солевому раствору диметилсульфоксида в концентрации 0,01% также снижало NaCl-индуцируемый пик [Ca²⁺]_{цит.} на 50-55%, смеси 100 mM NaCl и 10 мкМ дифенилениодония на 34,6%, а 100 mM NaCl и 3 mM тиомочевины на 11,9%. Эксперименты на нокаутных мутантах *osca1* показали, что в корнях этих растений индуцируемый 100 mM NaCl пик Ca²⁺-сигнала был на 45,4% ниже по сравнению с таковым в растениях дикого типа, что указывает на вовлечение OSCA в NaCl-индуцируемый Ca²⁺-сигналинг.

РЭФЕРАТ

Магістэрская работа: 35 старонак, 14 малюнкаў, 61 крыніца.

ХЛАРЫД НАТРЫЮ, КАЛЬЦЫЕВАЯ СІГНАЛІЗАЦЫЯ, *ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) НЕУНН., ЭКВАРЫНАВАЯ ХЕМІЛЮМІНАМЕТРЫЯ, РОСТАВЫЯ ТЭСТЫ

Мэта работы: прааналізаваць уплыў высокіх канцэтрацый хларыду натрыю на кальцыевую сігналацыю і роставыя працэсы ў караневых клетках *Arabidopsis thaliana* (L.) Неунн. дзікага тыпу і накаўтных раслін па гену механаадчувальнага канала OSCA1.

Даследаванні праводзіліся з выкарыстаннем экварынавай хемілюмінаметрыі на інтактных каранях 7-12-дзенных праросткаў. З выкарыстаннем тэхнікі замены асяроддзя былі ахарактарызаваныя змены роставых працэсаў ў адказ на ўвядзенне ў асяроддзе NaCl.

Вынікі праведзеных даследаванняў паказалі, што замена субстрату на субстрат, які змяшчае 2 мМ NaCl, вядзе да павялічвання хуткасці росту каранёў на 20,6%. Статыстычна дакладнае запавольванне хуткасці росту каранёў у параўнанні з кантрольнай групай было выяўлена толькі пры дадаванні 75 мМ NaCl (прыгнятанне росту на 10-15%). Значнае інгібіраванне сутачнага прыросту асноўнага караня (30% і вышэй) адзначалася пры дадаванні ў асяроддзе вырошчвання NaCl у канцэтрацыі вышэй за 100 мМ. У вопытах з выкарыстаннем Ca²⁺-экварынавай хемілюмінаметрыі прадэманстравана, што дадаванне NaCl у канцэтрацыі вышэй за 100 мМ выклікала статыстычна значнае павялічванне [Ca²⁺]_{цыт.} у клетках караня. Прысутнасць у тэставым раствору 0,1 мМ Gd³⁺ інгібавала развіццё Ca²⁺-сігналаў у адказ на NaCl (на 60-70% у выпадку 100 мМ NaCl). Падобнае ўздзеянне на NaCl-індуцыруемыя Ca²⁺-сігналы рабіў адноўлены глутатыен (0,1 мМ GSH зніжаў пікавае значэнне [Ca²⁺]_{цыт.} прыблізна на 60%). Дадаванне да салевога раствору дыметылсульфаксиду ў канцэтрацыі 0,01% таксама зніжала NaCl-індуцыруемы пік [Ca²⁺]_{цыт.} на 50-55%, сумесі 100 мМ NaCl і 10 мкМ дыфеніленедонію на 34,6%, а 100 мМ NaCl і 3 мМ тыямачавіны на 11,9%. Эксперыменты на накаўтных мутантах *osca1* паказалі, што ў каранях гэтых раслін індукцыруемы 100 мМ NaCl пік Ca²⁺-сігналу быў на 45,4% ніжэй у параўнанні з ім жа ў раслінах дзікага тыпу, што паказвае на далучэнне OSCA у NaCl-індуцыруемы Ca²⁺-сігналінг.

ABSTRACT

Master's thesis contents: 35 pages, 14 figures, 61 sources.

SODIUM CHLORIDE, CALCIUM SIGNALLING, *ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH., AEQUORIN CHEMILUMINOMETRY, MEDIUM EXCHANGE TESTS

The aim of the project was to analyze the effect of elevated NaCl levels on calcium signaling and growth processes in root cells of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. wild-type and mechanosensitive channel OSCA1 knockout plants.

The study was conducted using Ca²⁺-aequorin chemiluminometry on the intact roots of 7-12-days old seedlings. A gel medium exchange technique was utilized for determining changes in root growth upon introduction of NaCl into the plant growth medium.

The results of the study showed that exchanging the growth medium for one containing 2 mM NaCl leads to a 20,6% increase in the root growth rate. A slowdown in the rate of root growth was observed after addition of 75 mM NaCl, which inhibited growth by 10-15% compared to the control group. Statistically significant inhibition of daily root growth (by 30% and higher) occurred upon introduction of NaCl to the substrate in concentrations over 100 mM. The Ca²⁺-aequorin chemiluminometry assays demonstrated that addition of NaCl in concentrations of up to and above 100 mM led to a statistically significant increase of [Ca²⁺]_i in root cells. For 100 mM NaCl, the presence of 0,1 mM Gd³⁺ in the test solution inhibited the development of Ca²⁺ signals by 60-70%. Reduced glutathione similarly affected NaCl-induced Ca²⁺ signals, with 0,1 mM GSH decreasing peak [Ca²⁺]_i levels by about 60%. Addition of 0,01% dimethyl sulfoxide to the 100 mM NaCl solution also served to reduce the NaCl-induced [Ca²⁺]_i peak by 50-55%, the mixture of 100 mM NaCl and 10 μM diphenyleneiodonium lowering it by 34,6%, and the mixture of 100 mM NaCl and 3 mM thiourea – by 11,9%. Experiments on the *osca1* knockout mutants produced a 100 mM NaCl-induced Ca²⁺ signaling peak 45,4% lower than that of WT plants, indicating the involvement of OSCA channels in NaCl-induced Ca²⁺-signaling.