

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

Кафедра клеточной биологии и биоинженерии растений

КАЛЛАУР

Елена Александровна

ВОЗДЕЙСТВИЕ АБИОТИЧЕСКИХ СТРЕССОРОВ НА РОСТ КОРНЕЙ
***ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH. С ГЕНЕТИЧЕСКИ-**
МОДИФИЦИРОВАННЫМ K⁺-КАНАЛОМ GORK

Аннотация

к дипломная работа

Научный руководитель:
декан биологического факультета,
член-корр. НАН Беларуси, д.б.н.,
Демидчик В.В.

Допущена к защите

«__» _____ 2022 г.

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

Минск, 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	4
РЕФЕРАТ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	8
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1.1 Общее определение стресса у растений. Особенности воздействия засоления и окислительного стресса на растительный организм	10
1.1.1 Влияние солевого стресса на организм растений	11
1.1.2 Эффекты, вызываемые окислительным стрессом, у высших растений.....	13
1.2 Нуклеиновые кислоты и методы работы с ними.....	15
1.2.1 Общие принципы и техника ПЦР-анализа.....	19
1.2.2 Использование электрофореза в анализе биологических структур	22
1.3 Физиологические функции калия и его роль в жизни растений.....	24
1.3.1 Принципы функционирования ионных каналов растений.....	25
1.3.2 Калиевые каналы высших растений.....	27
1.3.3 Калиевые каналы шейкерного типа.....	29
1.3.4 Тканевая локализация и физиологическая роль K ⁺ -каналов шейкерного типа у растений.....	32
1.3.5 K ⁺ -каналы в качестве мишеней для клеточных сигналов.....	34
1.3.6 TRK-каналы.....	34
1.4 Использование методики водных культур (гидропоники) в экспериментальной биологии растений.....	35
1.4.1 Преимущества гидропоники.....	37
1.4.2 Основные гидропонные системы.....	37
1.4.2.1 Системы твёрдого субстрата.....	38
1.4.2.2 Субстраты для систем на основе среды.....	39
1.4.3 Типы субстратов.....	40
1.4.3.1 Органические субстраты.....	40
1.4.3.2 Неорганические субстраты.....	41
1.4.4 Типы гидропонных систем в зависимости от распределения воды или питательных веществ.....	42
1.4.4.1 Метод глубокого потока.....	42
1.4.4.2 Метод питательной плёнки.....	43
1.4.4.3 Аэропонные системы.....	44
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	46
2.1 Объект исследования.....	46
2.2 Техника посева растительного материала.....	46
2.3 Техника переноса на среды со стрессорами	47
2.4 Сбор растительного материала (заморозка).....	47
2.5 Выделение ДНК.....	48
2.6 ПЦР-анализ.....	49
2.7 Электрофорез.....	49

2.8 Гидропонная система для выращивания растений <i>Arabidopsis thaliana</i>	50
2.9 Техника замены среды на гидропонных системах.....	50
2.10 Статистическая обработка данных.....	51
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ.....	52
3.1 Анализ выделенной ДНК.....	52
3.2 Генотипирование трансформированных линий.....	52
3.3 Изменение ростовых показателей корней арабидопсиса при воздействии окислительного и солевого стресса.....	54
3.4 Изменение показателей биомассы растений арабидопсиса при воздействии окислительного и солевого стресса.....	60
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	62
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	63

РЕФЕРАТ

Дипломная работа 69 с., 15 рис., 7 табл., 97 источников.

ВОЗДЕЙСТВИЕ АБИОТИЧЕСКИХ СТРЕССОРОВ НА РОСТ КОРНЕЙ *ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH. С ГЕНЕТИЧЕСКИ-МОДИФИЦИРОВАННЫМ K⁺-КАНАЛОМ GORK.

Объект исследования: корни и листья проростков *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. четырех линий: дикого типа экотипа Wassilevskija (WS-0, «Wild Type»), линии *gork1-1* (отсутствует ген, кодирующий наружу-выпрямляющий K⁺-канал), *gork1-1*, содержащие GORK с заменой Цис.-151 на Сер-151 (GORK-C151S), а также *gork1-1* с возмещённым нативным GORK (Compl. *gork1-1*).

Цель данной работы – верификация линий *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. с нокаутированным или модифицированным по Цис.-151 калиевым каналом GORK и тестирование ростовых ответов данных линий.

Основные методы исследования: культивирование проростков арабидопсиса в стерильных условиях на гелевой среде, а также в гидропонных условиях, тесты на прорастание, техника замены среды, техника переноса на среды со стрессорами, постановка ПЦР-анализа, проведение электрофореза.

Верификация линий *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. с нокаутированным или модифицированным по Цис.-151 калиевым каналом GORK, проведенная с использованием техники ПЦР, показала наличие мутантных вставок, подтвердив что данные линии действительно являлись нокаутными и модифицированными по Цис.-151.

В результате проведенных исследований показано, что нокауты *gork1-1* и линии GORK-C151S имеют более высокую устойчивость к воздействиям солевого и окислительного стрессов по сравнению с растениями дикого типа. В то же время более высокие дозы вызывают статистически-достоверное снижение прироста биомассы и скорости роста корня *Arabidopsis thaliana* всех представленных линий. Линия *gork1-1*, лишённая гена, который кодирует наружу-выпрямляющий K⁺-канал GORK, а также линия GORK-C151S, у которой аминокислота цистеин заменена на серин по 151 положению в АФК-чувствительном сайте канала GORK, оказались наиболее устойчивыми к воздействию широкого диапазона концентраций стресс-факторов абиотической природы.

РЭФЕРАТ

Дыпломная работа 69 с., 15 мал., 7 табл., 97 крыніц.

ЎЗДЗЕЯННЕ АБІЯТЫЧНЫХ СТРЭСАРАЎ НА РОСТ КАРАНЁЎ *ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH. З ГЕНЕТЫЧНА-МАДЫФІКАВАНЫМ K^+ -КАНАЛАМ GORK.

Аб'ект даследавання: карані і лісце праросткаў *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. чатырох ліній: дзікага тыпу экатыпу Wassilevskija (WS-0, «Wild Type»), лініі *gork1-1* (адсутвае ген, кадавальны вонкі-выпроствальны K^+ -канал), *gork1-1*, якія змяшчаюць GORK з заменай Цыс.-151 на Сер- 151 (GORK-C151S), а таксама *gork1-1* з кампенсаваным натыўным GORK (Compl. *gork1-1*).

Мэта дадзенай працы – верыфікацыя ліній *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. з накаўтаваным або мадыфікаваным па Цыс.-151 каліевым каналам GORK і тэсціраванне роставых адказаў дадзеных ліній.

Асноўныя метады даследавання: культываванне праросткаў арабідопсісу ў стэрыльных умовах на гелевай асяроддзі, а таксама ў гідрапонных умовах, тэсты на прарастанне, тэхніка замены асяроддзя, тэхніка пераносу на асяроддзя са стрэсарамі, пастаноўка ПЦР-аналізу, правядзенне электрофарэзу.

Верыфікацыя ліній *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. з накаўтаваным або мадыфікаваным па Цыс.-151 каліевым каналам GORK, праведзеная з выкарыстаннем тэхнікі ПЦР, паказала наяўнасць мутантных уставак, пацвердзіўшы што дадзеныя лініі сапраўды з'яўляліся накаўтнымі і мадыфікаванымі па Цыс.-151.

У выніку праведзеных даследаванняў паказана, што накаўты *gork1-1* і лініі GORK-C151S маюць больш высокую ўстойлівасць да ўздзеянняў солевага і акісляльнага стрэсаў у параўнанні з раслінамі дзікага тыпу. У той жа час больш высокія дозы выклікаюць статыстычна-пэўнае зніжэнне прыросту біямасы і хуткасці росту караня *Arabidopsis thaliana* ўсіх прадстаўленых ліній. Лінія *gork1-1*, пазбаўленая гена, які кадуе вонкі-выпроствальны K^+ -канал GORK, а таксама лінія GORK-C151S, у якой амінакіслата цыстеін заменена на серін па 151 становішчу ў АФК-адчувальным сайце канала GORK, апынуліся найбольш устойлівымі да дыяпазону канцэнтрацый стрэс-фактараў абіятычнай прыроды.

ABSTRACT

Graduate work 69 p., 15 pict., 7 tabl., 97 references.

IMPACT OF ABIOTIC STRESSERS ON ROOT GROWTH OF *ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH. WITH GENETICALLY MODIFIED K⁺-CHANNEL GORK.

Object of study: roots and leaves of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. four lines: the wild type of the Wassilevskija ecotype (WS-0, "Wild Type"), the *gork1-1* line (the gene encoding the outward-rectifying K⁺ channel is missing), *gork1-1*, containing GORK with the replacement of Cys.-151 with Ser -151 (GORK-C151S), as well as *gork1-1* with native GORK refunded (Compl. *gork1-1*).

The purpose of this work is to verify the lines of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. with the GORK potassium channel knocked out or modified by Cys.-151 and testing the growth responses of these lines.

Main research methods: cultivation of *Arabidopsis* seedlings under sterile conditions on a gel medium, as well as in hydroponic conditions, germination tests, medium replacement technique, transfer technique to media with stressors, PCR analysis, electrophoresis.

Line verification of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. with a knockout or modified by Cys.-151 potassium channel GORK, carried out using the PCR technique, showed the presence of mutant inserts, confirming that these lines were indeed knockout and modified by Cys.-151.

As a result of the studies, it was shown that *gork1-1* knockouts and the GORK-C151S line have a higher resistance to concentrations of stressors compared to wild-type plants. At the same time, higher doses cause a statistically significant decrease in the biomass growth and root growth rate of *Arabidopsis thaliana* of all the presented lines. The *gork1-1* line lacking the gene encoding the outward-rectifying K⁺ channel GORK, as well as the GORK-C151S line, in which the amino acid cysteine was replaced by serine at position 151 in the ROS-sensitive site of the GORK channel, were found to be the most resistant to a wide range of range of concentrations of abiotic stress factors.