

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

**ГУБАРЕВИЧ
Кирилл Игоревич**

**АНАЛИЗ ВОЗДЕЙСТВИЯ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА
РОСТОВЫЕ ПРОЦЕССЫ У МОДЕЛЬНЫХ РАСТЕНИЙ
*ARABIDOPSIS THALIANA***

Аннотация
к дипломной работе

Научный руководитель:
старший преподаватель
Мацкевич В.С.

Допущен к защите

«___» _____ 2024 г.

Зав. кафедрой клеточной биологии и биоинженерии растений
кандидат биологических наук, доцент О.Г. Яковец

Минск, 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
РЕФЕРАТ	4
ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	7
ВВЕДЕНИЕ	8
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
1.1 Тяжелые металлы в жизни растений	9
1.1.1 Общая характеристика тяжелых металлов	9
1.1.2 Роль ТМ в жизни высших растений	9
1.1.2.1 Физиологическая роль железа	10
1.1.2.2 Физиологическая роль кобальта	11
1.1.2.3 Физиологическая роль марганца	11
1.1.2.4 Физиологическая роль меди	12
1.1.2.5 Физиологическая роль молибдена	12
1.1.2.6 Физиологическая роль цинка	13
1.1.2.7 Физиологическая роль никеля	13
1.1.3 Токсические эффекты тяжелых металлов	14
1.1.3.1 Влияние ТМ на рост	14
1.1.3.2 Влияние ТМ на фотосинтез	17
1.1.3.3 Воздействие тяжелых металлов на дыхание	19
1.1.3.4 Влияние ТМ на минеральное питание	20
1.1.3.5 Изменение водного обмена у растений при действии ТМ	21
1.2 Индукция окислительного стресса в ответ на повышенные уровни тяжелых металлов	22
1.2.1 Влияние ТМ на накопление АФК	22
1.2.2. Антиоксидантная система растений	24
1.2.2.1 Супероксиддисмутаза	24
1.2.2.2 Аскорбиновая кислота и аскорбатпероксидаза	24
1.2.2.3 Глутатион и глутатион редуктаза	25
1.2.2.4 Альфа-токоферол и каротиноиды	25

1.2.3 НАДФН-оксидазы растений и их роль в тяжелометаллическом стрессе ..	26
1.3 Модификация экспрессии генов у растений при выращивании на среде, содержащей тяжелые металлы.....	27
1.3.1 Рецепторные и сигнальные реакции в клетках растениях, индуцированные повышенными уровнями ТМ	27
1.3.2 Экспрессия генов транскрипционных факторов при действии тяжелых металлов на растения	28
1.3.3 Влияние тяжелых металлов на экспрессию генов белков транспортеров у растений	30
1.3.3.1 NRAMP семейство белков-транспортеров	30
1.3.3.2 ABC семейство белков-транспортеров	31
1.3.3.3 ZIP семейство белков-транспортеров	31
1.3.4 Влияние тяжелых металлов на экспрессию генов металлотIONEИНОВ у растений	32
1.3.5. Влияние тяжелых металлов на экспрессию генов, участвующих в неспецифических защитных реакциях растений	33
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	34
2.1 Объект исследования	34
2.2 Культивирование арабидопсиса в стерильных условиях	34
2.3 Ростовые тесты	35
2.4 Анализ генерации АФК в корнях арабидопсиса при помощи флуоресцентной микроскопии	35
2.5 Количественный ПЦР-анализ	36
2.6 Статистический анализ.....	37
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	38
3.1 Влияние тяжелых металлов на рост корней арабидопсиса	38
3.2 Изменение уровня АФК в корнях арабидопсиса при обработке тяжелыми металлами (Co, Ni, Cu).....	43
3.3 Изменение уровня экспрессии генов в ответ на CuCl ₂	49
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	51
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	53

РЕФЕРАТ

Дипломная работа: 58 стр., 2 табл., 17 рис., 75 источников.

Ключевые слова: ТЯЖЕЛЫЕ МЕТАЛЛЫ, АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА, РОСТ, ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ, НАДФ-ОКСИДАЗЫ

Актуальность: В настоящее время актуальной проблемой индустриально развитых регионов стало загрязнение тяжелыми металлами. Повышенные уровни металла в окружающей среде наносят ущерб естественной флоре, а также вредят сельскому хозяйству. У растений в основе механизмов устойчивости к металлам во многих случаях лежит индуцированный синтез белков, связанный с экспрессией определенных генов (или групп генов) и синтезом *de novo* стрессовых ферментов, принимающие непосредственное участие в механизмах адаптации растений к тяжелым металлам и их обезвреживанию в организме. Поэтому важное фундаментальное и прикладное значение имеет изучение роли различных белков в ответных реакциях растений на повышенные уровни конкретных тяжелых металлов.

Объект исследования: *Arabidopsis thaliana* L. Heynh.

Цель работы: проанализировать воздействия тяжелых металлов на ростовые процессы у модельных растений *Arabidopsis thaliana*.

Методы исследования: ростовые тесты, флуоресцентная микроскопия, ПЦР-анализ.

В результате работы было показано, что введение в среду выращивания тяжелых металлов в концентрации 0,1-1 ммоль/л оказывало ингибирующий эффект на рост корней арабидопсиса. При обработке 0,1 ммоль/л CuCl_2 прирост длины основного корня снижался на 61%, 0,3 ммоль/л CuCl_2 – на 68%, 1 ммоль/л CuCl_2 – на 85%. При действии 0,1 ммоль/л NiCl_2 прирост корня ингибировался на 39%, 0,3 ммоль/л NiCl_2 – на 44%, 1 ммоль/л NiCl_2 – на 72%. При обработке 0,1 ммоль/л CoCl_2 отмечалось снижение роста на 8%, 0,3 ммоль/л CoCl_2 – на 32%, 1 ммоль/л CoCl_2 – на 49%. Добавление 10 мкмоль/л DPI (ингибитора НАДФН-оксидаз) оказывало протекторное действие на рост корней арабидопсиса в условиях тяжелометаллического стресса, что особенно было заметно в случае меди. Обработка тяжелыми металлами (1 ммоль/л CoCl_2 , NiCl_2 , CuCl_2) вызывала накопление АФК в корнях арабидопсиса, в первую очередь чувствительность к данному стрессу проявлялась в зоне деления. При этом прооксидантный эффект увеличивался в ряду $\text{Co}^{2+} < \text{Ni}^{2+} < \text{Cu}^{2+}$. Добавление DPI совместно с Cu^{2+} снижало уровень АФК. При выращивании *Arabidopsis thaliana* на среде с CuCl_2 в концентрации 1 ммоль/л усиливалась экспрессия генов НАДФ-оксидаз в 2.4, 2.6 и 6.2 раз для *RBOHC*, *RBOHD* и *RBOHF* соответственно, что свидетельствует о вовлечении данных ферментов в ответ растений на тяжелометаллический стресс.

РЭФЕРАТ

Дыпломная работа: 58 стар., 2 табл., 17 мал., 75 крын.

Ключавыя словы: ЦЯЖКІЯ МЕТАЛЫ, АКТЫЎНЫЯ ФОРМЫ КІСЛАРОДУ, РОСТ, ЭКСПРЭСІЯ ГЕНАЎ, НАДФ-АКСІДАЗЫ

Актуальнасць: У цяперашні час актуальнай праблемай індустрыяльна развітых рэгіёнаў стала забруджванне цяжкімі металамі. Павышаныя ўзроўні металу ў навакольным асяроддзі наносяць шкоду натуральнай флоры, а таксама шкодзяць сельскай гаспадарцы. У раслін у аснове механізмаў устойлівасці да металаў у многіх выпадках ляжыць індукаваны сінтэз бялкоў, звязаны з экспрэсіяй пэўных генаў (або груп генаў) і сінтэзам *de novo* стрэсавых ферментаў, якія прымаюць непасрэдны ўдзел у механізмах адаптацыі раслін да цяжкіх металаў і іх абясшкодзванню ў арганізме. Таму важнае фундаментальнае і прыкладное значэнне мае вывучэнне ролі розных бялкоў у зваротных рэакцыях раслін на павышаныя ўзроўні канкрэтных цяжкіх металаў.

Аб'ект даследавання: *Arabidopsis thaliana* L. Heynh.

Мэта работы: прааналізаваць ўздзеянне цяжкіх металаў на роставыя працэсы ў мадэльных раслін *Arabidopsis thaliana*.

Метады даследавання: роставыя тэсты, флуарэсцэнтная мікраскапія, ПЦР-аналіз.

У выніку работы было паказана, што ўвядзенне ў асяродак вырошчвання цяжкіх металаў у канцэнтрацыі 0,1-1 ммоль/л аказвала інгібіруючы эффект на рост каранёў арабідопсіса. Пры апрацоўцы 0,1 ммоль/л CuCl_2 прырост даўжыні асноўнага караня зніжаўся на 61%, 0,3 ммоль/л CuCl_2 – на 68%, 1 ммоль/л CuCl_2 – на 85%. Пры дзеянні 0,1 ммоль/л NiCl_2 прырост караня інгібіраваўся на 39%, 0,3 ммоль/л NiCl_2 – на 44%, 1 ммоль/л NiCl_2 – на 72%. Пры апрацоўцы 0,1 ммоль/л CoCl_2 адзначалася зніжэнне росту на 8%, 0,3 ммоль/л CoCl_2 – на 32%, 1 ммоль/л CoCl_2 – на 49%. Даданне 10 мкмоль/л DPI (інгібітару НАДФН-аксідаз) аказвала пратэктарнае дзеянне на рост каранёў арабідопсіса ва ўмовах цяжкаметалічнага стрэсу, што асабліва было прыкметна ў выпадку медзі. Апрацоўка цяжкімі металамі (1 ммоль/л CoCl_2 , NiCl_2 , CuCl_2) выклікала назапашванне АФК ў каранях арабідопсіса, у першую чаргу адчувальнасць да дадзенага стрэсу выяўлялася ў зоне дзялення. Пры гэтым прааксідатны эффект павялічваўся ў шэрагу $\text{Co}^{2+} < \text{Ni}^{2+} < \text{Cu}^{2+}$. Даданне DPI сумесна з Cu^{2+} зніжала ўзровень АФК. Пры вырошчванні *Arabidopsis thaliana* на асяроддзі з CuCl_2 ў канцэнтрацыі 1 ммоль/л узмацнялася экспрэсія генаў НАДФ-аксідаз ў 2.4, 2.6 і 6.2 раз для *RBOHC*, *RBOHD* і *RBOHF* адпаведна, што сведчыць аб уцягванні дадзеных ферментаў у адказ раслін на цяжкаметалічны стрэс.

ABSTRACT

Graduate work 58 p., 2 table, 17 fig., 75 sources.

Keywords: HEAVY METALS, REACTIVE OXYGEN SPECIES, GROWTH, GENE EXPRESSION, NADPH-OXIDASES

Relevance: Heavy metal pollution has become an urgent problem in industrialised regions. Elevated metal levels in the environment damage natural flora and also harm agriculture. In plants, the mechanisms of resistance to metals in many cases are based on induced protein synthesis associated with the expression of certain genes (or groups of genes) and *de novo* synthesis of stress enzymes, which are directly involved in the mechanisms of plant adaptation to heavy metals and their neutralisation in the organism. Therefore, the study of the role of various proteins in plant responses to elevated levels of specific heavy metals is of great fundamental and applied importance.

Object of research: *Arabidopsis thaliana* L. Heynh.

Purpose of work: to analyse the effects of heavy metals on growth processes in model plants *Arabidopsis thaliana*.

Research methods: Growth tests, fluorescence microscopy, PCR analysis.

As a result of the work, it was shown that the introduction of heavy metals into the growing medium at a concentration of 0.1-1 mmol/l had an inhibitory effect on the growth of *Arabidopsis* roots. When treated with 0.1 mmol/l CuCl_2 , the the length of the main root decreased by 61%, 0.3 mmol/l CuCl_2 – by 68%, 1 mmol/l CuCl_2 – by 85%. Under the action of 0.1 mmol/l NiCl_2 , root growth was inhibited by 39%, 0.3 mmol/l NiCl_2 – by 44%, and 1 mmol/l NiCl_2 – by 72%. When treated with 0.1 mmol/l CoCl_2 , growth decreased by 8%, 0.3 mmol/l CoCl_2 – by 32%, 1 mmol/l CoCl_2 – by 49%. The addition of 10 mmol/l DPI (NADPH oxidase inhibitor) had a protective effect on the growth of *Arabidopsis* roots under conditions of heavy metal stress, which was especially noticeable in the case of copper. Treatment with heavy metals (1 mmol/l of CoCl_2 , NiCl_2 , CuCl_2) caused the accumulation of ROS in the roots of *Arabidopsis*, primarily sensitivity to this stress was manifested in the fission zone. At the same time, the prooxidant effect increased in the range of $\text{Co}^{2+} < \text{Ni}^{2+} < \text{Cu}^{2+}$. The addition of DPI together with Cu^{2+} reduced the level of ROS. When *Arabidopsis thaliana* was grown on a medium with CuCl_2 at a concentration of 1 mmol/l, the expression of NADPH oxidase genes increased by 2.4, 2.6 and 6.2 times for *RBOHC*, *RBOHD* and *RBOHF*, respectively, which indicates the involvement of these enzymes in the plant response to heavy metal stress.