

АННОТИРОВАННЫЙ ОТЧЕТ

о результатах НИР по гранту за 2021-2022 год

Конкурс 2021 года на соискание грантов

для поддержки научно-исследовательской работы аспирантов и молодых сотрудников ИГУ.

Направление: Биология, почвоведение и биотехнологии Шифр гранта 091-21-315

1. Наименование НИР по гранту: «Роль биодоступного азота в развитии индуцированного старения листьев *Arabidopsis thaliana* L.».

2. Структурное подразделение (кафедра, лаборатория) Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Иркутский государственный университет», Биолого-почвенный факультет, кафедра биохимии, молекулярной биологии и генетики

3. Исполнитель НИР Власова Анфиса Александровна
(Ф.И.О)

4. Координаты исполнителя НИР тел: +79500566683, anfi98@bk.ru
(телефон, факс, E-mail)

5. Ожидаемые результаты в соответствии с заявленным планом работы

- Будет проведена оценка экспрессии генов-маркеров старения и сделаны выводы о скорости развития старения в зависимости от содержания солей азота в питательных средах в листьях растений арабидосписа дикого типа *Col-0* и мутанта *gdh1gdh2*.

- Будут получены данные о скорости деградации хлорофиллов и снижения жизнеспособности в листьях растений арабидосписа дикого типа *Col-0* и мутанта *gdh1gdh2* в зависимости от содержания солей азота в питательных средах.

6. Основные полученные научные результаты

Для экспериментов использовали трехнедельные растения двух линий арабидопсиса *Col-0* (дикий тип) и *gdh1gdh2* (двойной нокаут-мутант по генам глутаматдегидрогеназы), выращенные *in vitro* на средах с пониженным и контрольным содержанием NH_4NO_3 . Контрольным считали содержание нитрата аммония, соответствующее его содержанию в половинном составе стандартной среды Мурасиге-Скуга. Среда с пониженным содержанием азота не содержала нитрата аммония, в результате концентрация $[\text{NO}_3^-]$ в этой среде составляла 9,8 мМ/л (против 21,6 мМ/л в контрольной среде), $[\text{NH}_4^+]$ – исключен (против 10,8 мМ/л в контрольной среде). Растения на стадии вегетации помещали в темноту и оценивали экспрессию генов-маркеров старения, содержание хлорофиллов либо ионную проницаемость мембран в начале эксперимента (0 суток в темноте), после 4 и после 7 суток в темноте.

На первых этапах проекта была проведена визуальная оценка чувствительности двух линий растений арабидопсиса *Col-0* и *gdh1gdh2* к изменению содержания аммонийного азота в средах (рисунок 1).

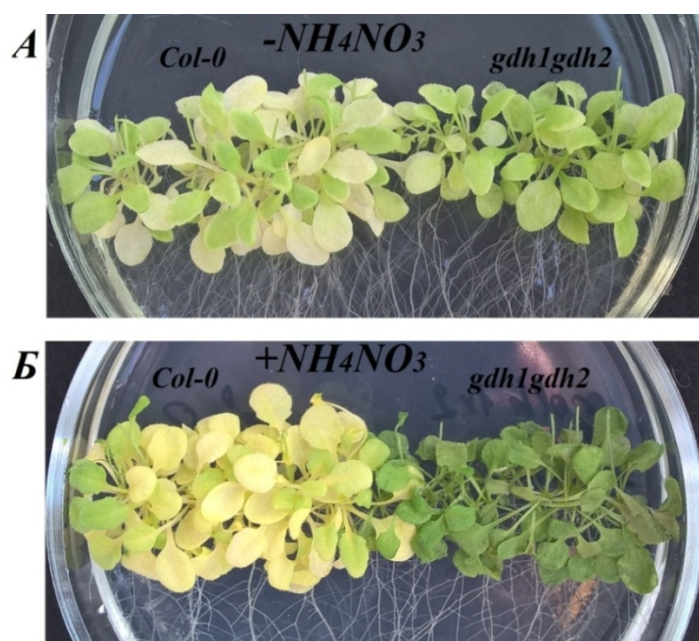
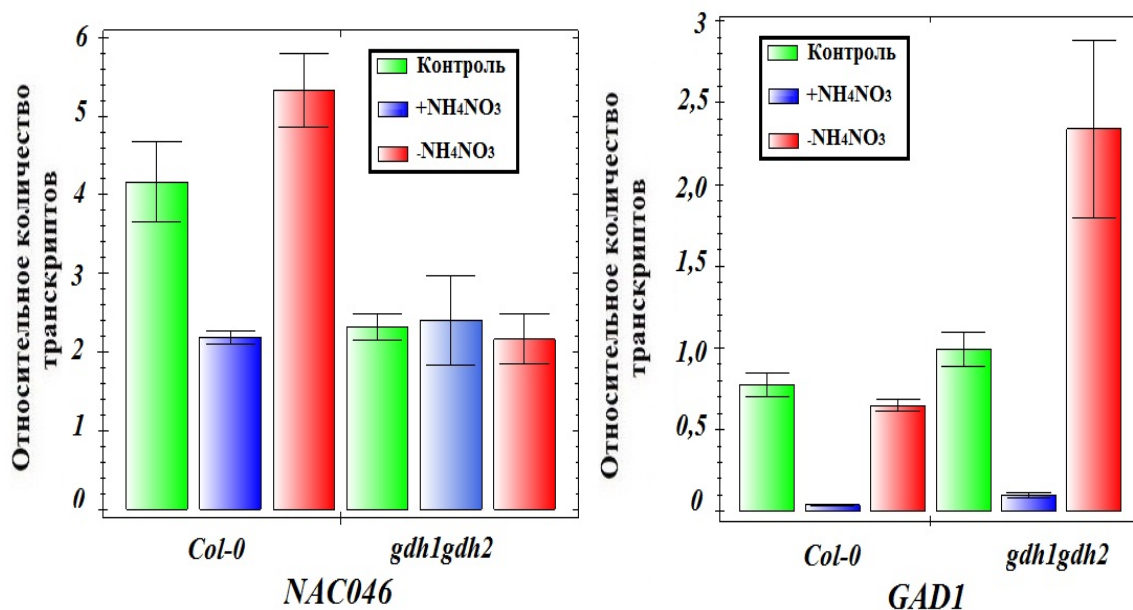


Рисунок 1. Старение растений *Col-0* и *gdh1gdh2* на средах с различным содержанием аммонийного азота. А – $[\text{NH}_4^+]$ – исключен, $[\text{NO}_3^-]$ – 9,8 мМ/л; Б – $[\text{NH}_4^+]$ – 21,6 мМ/л, $[\text{NO}_3^-]$ – 31,4 мМ/л. Возраст растений 31 сутки, выдерживание в темноте 10 суток.

После 10 суток в темноте на среде с повышенным содержанием NH_4NO_3 (рисунок 1Б) наблюдали пожелтение листьев растений дикого типа. Листья мутантных растений не желтели, но растения погибали. На среде с пониженным содержанием NH_4NO_3 все растения были живы, цвет листьев мутантных растений был бледнее, чем на среде с повышенным содержанием NH_4NO_3 . Таким образом, визуальная оценка показывает, что снижение содержания нитрата аммония приводило к замедлению пожелтения листьев у растений дикого типа, но к его ускорению у мутантных растений.

После визуальной оценки старения растений была проведена оценка экспрессии генов-маркеров старения в таких же условиях.

Всего была исследована экспрессия 9 генов-маркеров старения в листьях двух линий *Col-0* и *gdh1gdh2*, выращенных на трех типах сред, после 4 суток выдерживания в темноте. На рисунке 2 представлены результаты по трем генам-маркерам старения.



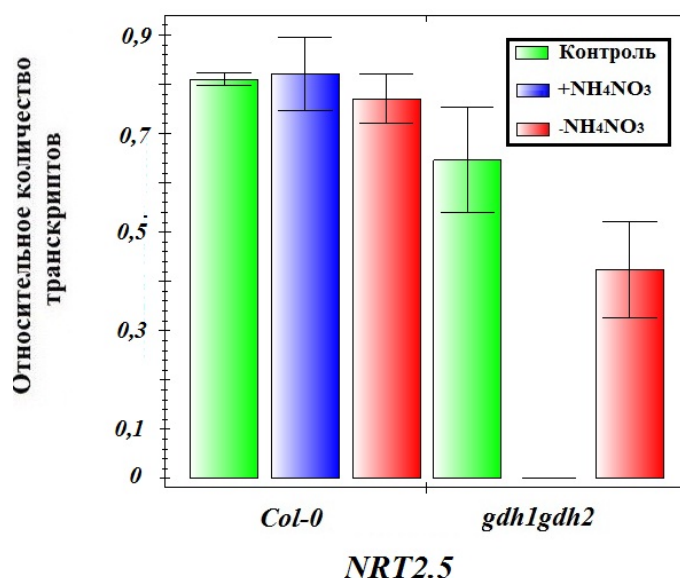


Рисунок 2. Экспрессия генов-маркеров старения растений *Col-0* и *gdh1gdh2* при индуцированном старении на средах с разным содержанием биодоступного азота. Контрольное содержание азота: [NH₄⁺]- 10,8 мМ/л, [NO₃⁻] – 21,6 мМ/л. Повышенное содержание азота: [NH₄⁺] – исключен, [NO₃⁻] – 9,8 мМ/л; Пониженное содержание азота: [NH₄⁺]- 21,6 мМ/л, [NO₃⁻] – 31,4 мМ/л.

На рисунке 2 представлены всего 3 гена-маркера старения, поскольку из-за плохого физиологического состояния растений результаты по ОТ-ПЦР-РВ не воспроизводились. Можно предположить, что подобранная концентрация аммонийного азота не подходит для данного метода. Ранее на рисунке 1 мы видели, что мутантные растения погибают при повышенном содержании аммонийного азота в среде, это может влиять на воспроизведение результатов. В дальнейшем для ОТ-ПЦР-РВ будут подбираться другие концентрации аммонийного азота.

На третьем этапе проводилась оценка динамики хлорофиллов и оценка изменения жизнеспособности растений в листьях растений арабидопсиса.

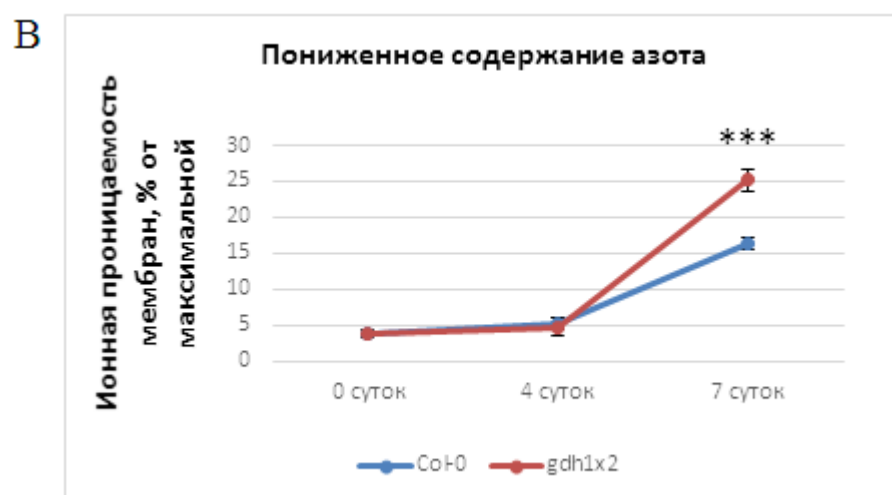
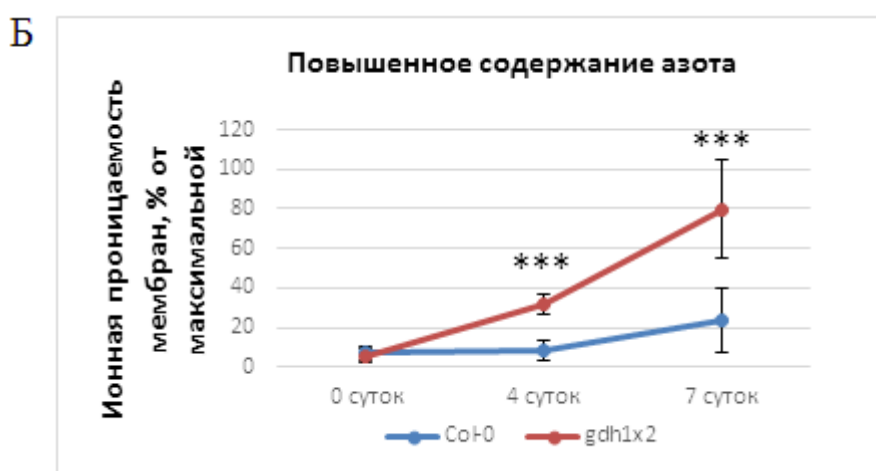
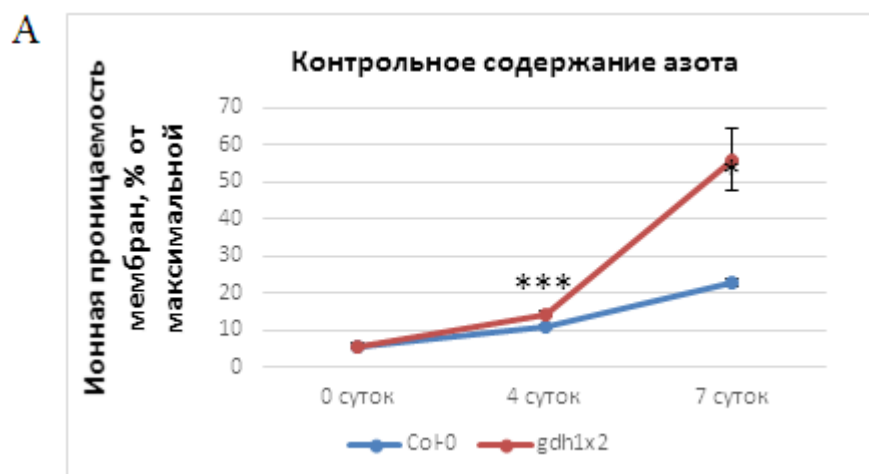
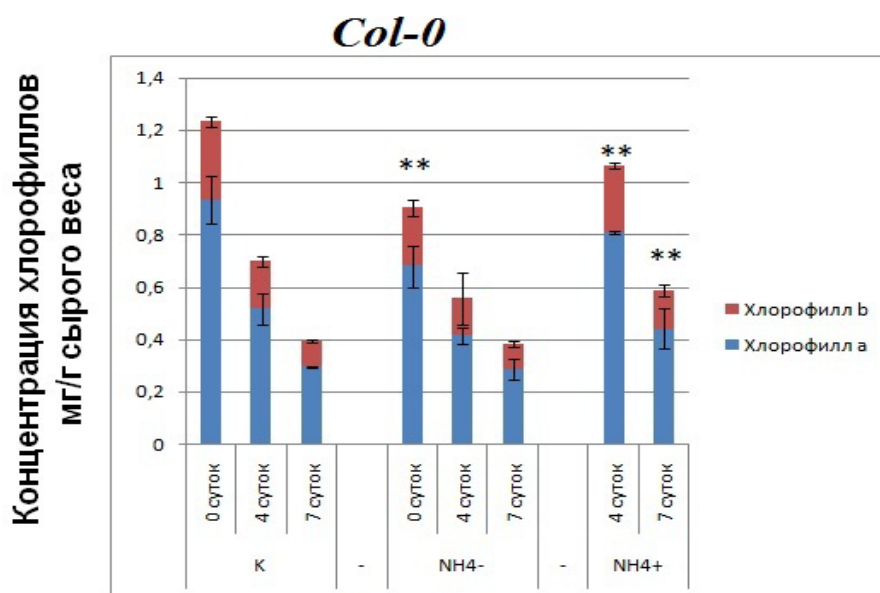


Рисунок 3. Изменение ионной проницаемости мембран растений *Col-0* и *gdh1gdh2* при индуцированном старении на средах с разным содержанием биодоступного азота. А, контрольное содержание азота: $[\text{NH}_4^+]$ – 10,8 мМ/л, $[\text{NO}_3^-]$ – 21,6 мМ/л. Б, повышенное содержание азота: $[\text{NH}_4^+]$ – исключен, $[\text{NO}_3^-]$ – 9,8 мМ/л; В, пониженное содержание азота: $[\text{NH}_4^+]$ – 21,6 мМ/л, $[\text{NO}_3^-]$ – 31,4 мМ/л. Знаком *** обозначены отличия для линии *gdh1gdh2* от *Col-0* при одинаковом составе, $p < 0,001$.

Мы оценили жизнеспособность растений в описанных условиях по изменению ионной проницаемости мембран растений. Чем выше ионная проницаемость, тем ниже жизнеспособность. 100% проницаемость соответствует мертвым растениям.

Во всех трех вариантах питательных сред повышение проницаемости мембран происходило значительно быстрее у мутантных растений, что коррелирует с более ранним появлением визуальных признаков увядания и гибели у них же. Содержание азота имело большее значение для мутантных растений: его снижение существенно снижало, а повышение – повышало значение ионной проницаемости к концу эксперимента. Для растений дикого типа эта закономерность была выражена слабее. Таким образом, динамика снижения жизнеспособности растения арабидопсиса при индуцированном темнотой старении зависит от содержания NH_4NO_3 в питательных средах. Чем выше содержание аммонийного азота, тем сильнее снижается жизнеспособность, причем для мутантных растений эта закономерность выражена сильнее

Далее мы оценили содержание хлорофиллов у растений *Col-0* и *gdh1gdh2* в описанных условиях.



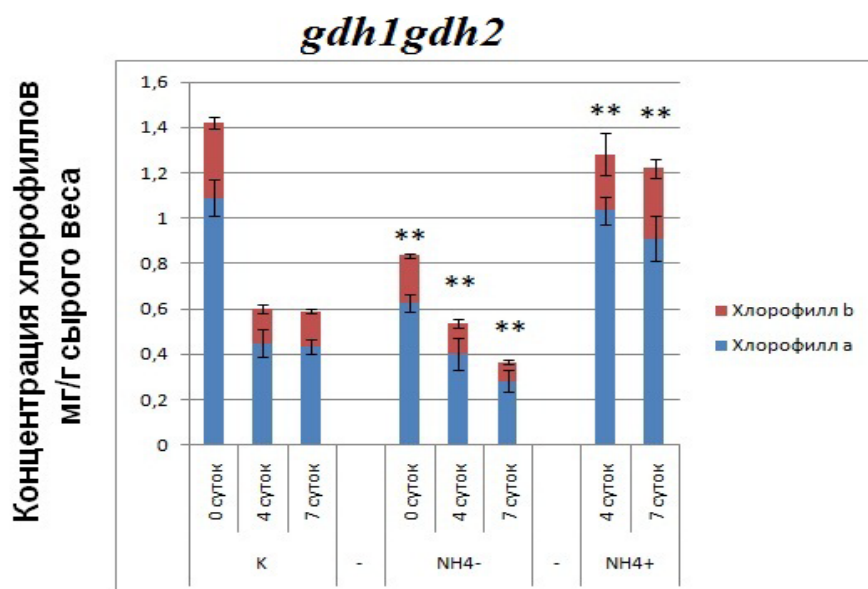


Рисунок 4. Содержание хлорофиллов у линии дикого типа *Col-0* и мутанта *gdh1gdh2* при длительном выдерживании в темноте в условиях контрольного и пониженного содержания биодоступного азота в питательной среде. Знаком ** обозначены отличия от растений, выращенных на контрольной среде, по сумме хлорофиллов (a+b), $p < 0,01$.

Мы видим, что деградация хлорофиллов в контрольных условиях у мутантных растений арабидопсиса линии *gdh1gdh2* при индуцированном темнотой старении нарушена, после 4 суток экспозиции содержание хлорофиллов не изменялось. При повышении содержания биодоступного азота мы так же наблюдаем, после 4 суток экспозиции содержание хлорофиллов не изменялось. При снижении содержания биодоступного азота мы наблюдаем, что динамика снижения содержания хлорофиллов у мутантных растений схожа с растениями дикого типа. Следовательно, распад хлорофиллов при индуцированном старении может зависеть от содержания биодоступного азота. Чем ниже содержание биодоступного азота в питательной среде, тем динамика снижения хлорофиллов у мутантных растений больше схожа с растениями дикого типа.

Вывод:

Динамика развития двух признаков старения – деградации хлорофиллов и снижения жизнеспособности растений арабидопсиса при индуцированном темнотой старении – зависит от содержания солей азота в

питательных средах. Деградация хлорофиллов у растений дикого типа протекает медленнее на среде с пониженным содержанием азота, тогда как у мутантных растений линии *gdh1gdh2* низкое содержание азота в среде нормализует процесс деградации хлорофиллов и приближает его к картине, типичной для растений дикого типа. На среде с повышенным содержанием азота деградацию хлорофиллов у мутантных растений мы не наблюдаем по сравнению с растением дикого типа. Жизнеспособность растений обеих линий при индуцированном темнотой старении снижается быстрее при более высоких уровнях содержания азота, для мутантных растений эта закономерность выражена сильнее.

7. Предполагаемое использование результатов, в том числе в учебном процессе В представленном исследовании было показано, что повышенное содержание аммонийного азота может провоцировать раннее старение растений и изменение их жизнеспособности. Полученные данные могут быть использованы при составлении рекомендации для выращивания культурных растений, также они могут использоваться в учебных курсах по физиологии растений.

8. Перечень публикаций(**) по результатам работы (статьи, доклады) с приложением оттисков или рукописей, направленных в печать

Власова А.А. Роль биодоступного азота в развитии индуцированного старения листьев *Arabidopsis thaliana* L. // Социально Экологические Проблемы Байкальского Региона И Сопредельных Территорий V Всероссийской Молодежной Научно-Практической Конференции С Международным Участием. 2022 (в печати, РИНЦ)

Власова А.А., Гарник Е.Ю. Влияние биодоступного азота на развитие индуцированного старения листьев *Arabidopsis thaliana* L. // Всероссийская научная конференция с международным участием "Физиология растений и феномика как основа современных фитобиотехнологий". 2022 (принята к рассмотрению, РИНЦ).