

ОБЪЕДИНЕННЫЙ
ИНСТИТУТ
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ

Дубна

98-87

P19-98-87

Е.Глинкова

РОСТОВЫЕ ВЕЩЕСТВА,
ИХ ВЛИЯНИЕ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ
И СОДЕРЖАНИЕ ЗАПАСНЫХ БЕЛКОВ
В СЕМЯДОЛЯХ СОИ
В ПРОЦЕССЕ ДЕДИФФЕРЕНЦИАЦИИ

Направлено в журнал «Soybean Genetics Newsletter»

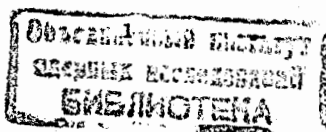
1998

ВВЕДЕНИЕ

Структура и концентрация ростовых веществ (РВ) играет большую роль в культурах растительных клеток. Скорость их усвоения в метаболических путях в растительных клетках тем лучше, чем их структура ближе к естественной форме. Синтетическая форма РВ сложна и влияет на их проникновение во внутриклеточное пространство.

Содержание естественных ростовых веществ типа ауксина (IAA) в клетках растений зависит от уровня *L-триптофана*, который в индолилпируватном пути превращается в IAA [24]. Его естественная концентрация в клетках тканей меняется в зависимости от стадии онтогенеза.

Свободные цитокинины и их предшественники, идентифицированные в ткани растений, находятся в форме *изопентениладенина*, *дигидрозеатина*, *зеатинрибозид* и разных изоформ *тополинов* [23]. Их концентрация в клетках тканей растений варьирует также в зависимости от стадии онтогенеза. Белковый и морфологический анализ у трансгенных растений табака и сои показал, что уровень продуктов морфорегуляторных генов *ipt*, *iaaM*, *iaaH*, которые отвечают за суперпродукцию цитокинина и ауксина, регулируется классом генов [1, 5, 6, 16]. Переход дифференцированных клеток из разных тканей растений в дедифференцированное состояние зависит от градиента концентраций эндогенных и экзогенных ростовых веществ, которые влияют на экспрессию генов, и таким образом меняют качественное и количественное содержание белков. Было показано, что синтетические ростовые вещества бензотиазолинонового типа (соли 3-субституед-2-бензотиазолинона), имеют биологическую активность [4, 18, 19]. Одним из представителей этой группы является 3-бензилоксикарбонилметил-2-бензотиазолинон (ББ). По своему биологическому действию ББ был классифицирован как ауксиноид. Экспериментальные результаты, полученные с ББ, показали [7, 8, 14, 18, 20],



что этот дериват бензотиазолинона действует на митотическую активность клеток и процессы роста растений как в условиях *in vivo*, так и *in vitro* в зависимости от использованной концентрации и фактора времени. ББ (Мв=299,35) как активно действующий органический компонент входит в состав коммерческого препарата Растим-30ДКВ в концентрации 30 %. На практике используется для индукции ризогенеза растений. Использованный в культурах *in vitro* ББ в определённых концентрациях вызывает индукцию каллуса как у одно-, так и у двухдольных растений, включая бобовые. Количественные и качественные особенности в экспрессии генов вызваны действием ростовых веществ во время дедифференциации, изучены очень слабо.

Целью нашей работы являлось исследование различий в экспрессии генов и в содержании запасных белков семян разных генотипов сои во время дедифференциации, вызванной влиянием ауксиноидов с различной химической структурой.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Из молодых (возраст 6 недель) асептически культивированных растений сои сортов Aida и Maple arrow H-12 были сделаны поперечные 3-4 мм срезы и помещены на экспериментальную культивационную среду mER, содержащую 50 нМ кинетина и ББ в концентрации 1 мМ, 1 мкМ и 1 нМ [8]. Контрольная культивационная среда содержала 5 мкМ 2,4-Д и 50 нМ кинетина. Экспрессия генов была исследована в первичном каллусе, образованном на срезах из средней части семян у обоих сортов сои после 28 дней культивирования.

Растворимые белки были изолированы в нативной форме с помощью 0,1 М Na-фосфатного буфера (pH 7) при температуре 4°C по методу Глинковой [9]. Количественное содержание растворимых белков в пробах определялось спектроколориметрическим методом Бадфорда [2] на спектроколориметре "Спекол-11" (Karl Zeiss, Jena). Анодические неденатурированные белки были сепарированы в 12,5 % дисконтинуальной полиакриламидной системе Смита [22]. Катодические белки были сепарированы в 15% дисконтинуальном полиакриламидном геле, приготовленном по методу Райсфельда [17]. Денатурированные белки для SDS-PAGE были приготовлены по методу

Лемли [13] и анализированы в 13% дисконтинуальном геле. Кислые и щелочные ферменты из группы пероксидаз (E.C.1.11.1.7) были визуализированы методом Вaleyоса [26]. Гели с белками были окрашены AgNO₃-модифицированным методом Нестеренко [15]. Молекулярная масса денатурированных протеинов была определена с помощью молекулярного стандарта фирмы «Bio-Labs» (New England, U.S.A.). Гемоглобин (Serva, Heidelberg), альбумин (Imuna, Šarišské-Michaľany) и лизоцим (Sigma, St. Luis) были использованы в качестве молекулярных маркеров для A-PAGE. Целлюлаза Онозука R-10 (Serva, Heidelberg) и нативный ингибитор трипсина сои были использованы как молекулярные стандарты для определения молекулярной массы белков у C-PAGE. Электрофорез проводился в аппаратуре фирмы «LKB Pharmacia» (Uppsala). Эксперименты повторялись 3 раза.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Соя как модельный объект используется в культурах *in vitro* уже с восьмидесятых годов [3, 8]. В культурах *in vitro* изучались цитогенетическая стабильность, физиологические и морфологические изменения, вызванные мутагенными факторами, а также возможности эмбрио- и органогенеза. Разница в экспрессии генов, вызванная влиянием разных ростовых веществ (РВ) во время каллогенеза, не изучалась. Наше внимание сосредоточилось на морфологических и молекулярных различиях, вызванных РВ, использованными в культивационной среде в разных концентрациях, во время дедифференциации разных сегментов растений сои двух генотипов, отобранных в ранних фазах онтогенеза.

Использованные в работе сорта сои тетраплоиды в делящихся соматических клетках содержат 40 хромосом. Основной набор $x=10$ хромосом. Содержание ДНК в расчёте на соматическую клетку составляет 2,35 нг (Hlinková, Doležal, не опубликовано). Модельные сорта сои отличались: по массе семян, по содержанию количества растворимых белков, фертильности, по высоте растений, по площади поверхности листьев в расчёте на растение и количественному содержанию хлорофилла *ab*. Культивирование поперечных сегментов, сделанных из всего растения (апекс, стебель, листья, корневая шейка, корни) сои, на среде с 5 мкМ 2,4-Д

приводило к появлению клеток с повышенной пролиферативной активностью у большинства эксплантантов. Соотношение экзогенных ростовых веществ при такой концентрации 2,4-Д было равно 100.

Практически все клетки эксплантантов преобразовывались в первичный каллус, объем которого был в 3-5 раз больше, чем объем взятого сегмента. Эксплантанты, изъятые из растения сои сорта Aida, дали инициацию каллогенеза в основном на поверхности срезов. Генетическая разница использованных сортов сои наблюдалась в скорости конверсии клеток, происходящих из специализированных тканей. Объем первичного каллуса на соответствующих сегментах из семядолей у сорта Aida был на 50 % ниже по сравнению с сортом Maple агтов линия Н-12. ББ в концентрации 1 мМ в среде при соотношении экзогенных ростовых веществ $2 \cdot 10^4$ влияет на клеточный цикл в интерфазе именно в точках, контролируемых ауксином, то есть G1/S и G2/M [7]. Клетки в первичном каллусе, образованном на этой среде, были мельче по сравнению с клетками каллуса, который образовался на среде, содержащей 2,4-Д. Кроме того, окраска каллуса менялась с бледно-желтой на оранжевую, вероятно, из-за изменившегося состава вторичных веществ, содержащихся в вакуолях, и также из-за изменений в составе синтезирующихся белков. Срезы, прежде всего из средней части семядолей, содержат большой пул клеток, находящихся в фазе покоя, поэтому существующий градиент экзогенных и эндогенных ростовых веществ значительно поменял скорость и направление их пролиферации. Концентрации 1 мкМ и 1 нМ ББ в среде (соотношение между экзогенным РВ было 20 и $2 \cdot 10^{-2}$) не вызывали каллогенез. При этом содержание хлорофилла *a/b* в срезах из семядолей у обоих генотипов повышалось по сравнению со срезами, растущими на среде с 5 мкМ 2,4-Д. В свою очередь, содержание хлорофилла *a* в срезах, культивируемых на средах с РВ, было заметно выше, чем в семядолях растений, растущих в асептических условиях без ростовых веществ. Строгую зависимость в содержании хлорофилла *a* и *b* в листьях от ростовых веществ показали и трансгенные растения, экспрессирующие гены *ipt*, *iaaM* и *iaaH* [5, 6, 10]. Полученные результаты показали, что содержание хлорофиллов *a/b* зависит как от уровня экзогенных и эндогенных РВ, так и от их градиентов. Зарегистрированные зависимости показывают связь РВ с

фотосинтезом и реакциями фосфорилирования и дефосфорилирования. Концентрации 1 мкМ и 1 нМ ББ вызывали на сегментах из области корневой шейки у обоих генотипов сои ризогенез. Органогенез и адвентивные побеги были индуцированы на срезах, содержащих клетки из основы "спящих" почек. Сегменты ростового апекса были характерны отсутствием каллогенеза, и наличием нормального роста. Как показали молекулярные анализы Лернера с соавторами [12], процессы дифференциации регулируются и белками, связанными с экспрессией *Ras*-генов, и циклом фосфорилирования ГДП в активную форму ГТП.

Ростовые вещества в среде в зависимости от концентрации и своей структуры при дедифференциации клеток меняли как качественный, так и количественный уровень растворимых белков (РБ) в средних сегментах семядолей. Концентрация РБ в этих сегментах менялась в зависимости от скорости вступления клеток в дедифференциацию и утилизации запасных белков по сравнению с идентичными сегментами из растений, культивируемых на среде MS без ростовых веществ. Самый высокий уровень растворимых белков был измерен в средних сегментах обоих сортов, культивируемых на среде mER с 1 нМ ББ (табл.1).

Табл.1. СОДЕРЖАНИЕ РАСТВОРИМЫХ БЕЛКОВ В ЭКСТРАКТАХ РАЗНЫХ ТКАНЕЙ СОИ

Сорт	Се	0		5 мкМ 2,4-Д		1 мМ ББ		1 мкМ ББ		1 нМ ББ	
		C _n	C _w	C _p	п.к.	C _p	п.к.	C	п.к.	C	п.к.
МА	66	0.7	1.62	0.94	1.6	-	1.8	1.94	-	3	-
[мг/г]	±1.5	±0.05	±0.24	±0.07	±0.08		±0.05	±0.09		±0.7	
А	48	0.6	0.87	0.74	0.61	0.7	1.6	1.53	-	1.9	-
[мг/г]	±0.9	±0.07	±0.05	±0.03	±0.05	±0.02	±0.01	±0.03		±0.5	

Се- семя; C_n- сегмент семядоли из растений, культивированных *in vivo*; C_w- сегмент семядоли из растений, культивированных *in vitro*; C- семядоля; п.к.- первичный каллус; C_p- остаточная часть семядоли; концентрация белков (мг) была вычислена на единицу массы свежей ткани (г)

Концентрация растворимых белков в первичном каллусе сои, индуцированном 2,4-Д, статистически достоверно различалась у использованных сортов. В первичном каллусе, индуцированном 1 мМ ББ, разницы не наблюдалась. Генетическая разница проявилась и у остаточной части сегментов из семядолей. Таким образом, количественные и

качественные различия в спектрах белков при дедифференциации определяются как использованными генотипами сои, так и разной концентрацией РВ и их структурой. Качественный анализ белковых спектров из срезов средней части семядолей показал, что самое большое количество РВ из запасных белков принадлежит классу лектинов и глицинов. Сорт Maple arrow линия Н-12 отличался от сорта Aida еще и по содержанию ингибитора трипсина. Отличия в спектрах кислых и денатурированных белков, изолированных из сегментов растущих на среде с РВ, по сравнению с идентичными сегментами из семядолей растений, растущих *in vitro* условиях на среде MS без РВ, показаны в таблицах 2 и 3.

Табл.2. НОВЫЕ АНОДИЧЕСКИЕ БЕЛКИ, СИНТЕЗИРОВАННЫЕ В СРЕДНЕЙ ЧАСТИ СЕМЯДОЛЕЙ СОИ ПРИ ДЕДИФФЕРЕНЦИАЦИИ

	Aida	Maple arrow H-12
Ср (2,4-Д)	220;120;100;69;45;34;30;28;24;14;	41.5;36;34;32;30;27;26;21;15.5;12.5;
п.к. (2,4- Д)	120;110;69;28;27;17;15;12;	110;67;36;34;32;21;18;17;
Ср (1 мМ ББ)	120;110;90;31.5;25;23;17;14;	-----
п.к. (1 мМ ББ)	120;110;90;43-41;35;25-24;17;15;	110;90;72;43-42;36-34;32;30;17;
С (1 мкМ ББ)	120;110;69;43.5;25;23.5;21;17;15-14;	77;73;60;45;28;25;24;17;15.5
С (1 нМ ББ)	120;100;69;53;43.5;25;23.5;17;14.5-14;	88;78;75;68;60;55;53;47;40-41;34;28-24;

С- сегмент из семядоли; п.к.- первичный каллус; Ср.- остаточная часть семядоли

Табл.3. НОВЫЕ ПОЛИПЕПТИДЫ, ИДЕНТИФИЦИРОВАННЫЕ В ЭЛЕКТРОФОРЕЗОГРАММАХ ДЕНАТУРИРОВАННЫХ БЕЛКОВ

	Aida	Maple arrow H-12
Ср (2,4-Д)	43;41;38;20.2;15.5	37;31;30;28;26.5;25.5;24-23;20.2;15.5
п.к. (2,4-Д)	50;41;26-25;17;	126;77;60;50;35.5;30;28;23;20.2
Ср (1 мМ ББ)	69;67;60;43-42;37;28;24;20.2;16;	-----
п.к. (1 мМ ББ)	69;60;50;43;42;34;17;	77;60;50;41;36-35;28;17;
С (1 мкМ ББ)	43-42;38-37;20.2;15;	93;39-36;28;17-16;
С (1 нМ ББ)	66-65;60;53;50;37;27;19;17;16;	86;80;53;50;45;38;36;20.2;17;

С- сегмент из семядоли; п.к.- первичный каллус; Ср.- остаточная часть семядоли

Разница в генотипах первичных каллусов была зарегистрирована для α, β, γ -субъединиц конглицина (Мв \approx 67-90 кДа). Строгие количественные различия

наблюдались в содержании α - и β - субъединиц ингибитора трипсина сои (Мв \approx 20,2 и 20,04 кДа), кислой фосфатазы (Мв \approx 53 кДа), β -амилазы (Мв \approx 57 кДа), лектина (Мв \approx 110 кДа, полипептиды с Мв \approx 54 кДа) и протеинов, связанных с реакциями фосфорилирования и дефосфорилирования, а также в белковом cdc - комплексе (p34 и p36). Различия были также зарегистрированы у белков, участвующих в образовании хлорофилл - *alb* - связывающего комплекса (p52, p44, p30, p26, p17). Влияние разных концентраций ББ наблюдалось у белка p50, в котором с большой вероятностью присутствует и мембранный протеин - кальмодулин. Во время дедифференциации специфический протеин p24 был зарегистрирован в остаточной части семядолей при культивировании на среде с 2,4- Д. Этот белок, вероятнее всего, принадлежит к группе ауксин-связывающих белков. Белок с идентичной молекулярной массой и ауксин-связывающей функцией был определен Тианом с соавторами [25] во внутриклеточных протеинах первичного листа кукурузы. Jones и Nerman [11] показали тесную связь этого белка с цитоплазматической мембраной. Для белка p93 была сделана функциональная классификация, как белка, соединенного с цитокинином [24]. Этот протеин был обнаружен в спектре белков, извлеченных из сегментов сои сорта МА линия Н-12, растущих на среде с 1 мкМ ББ. Различия в содержании α - субъединиц растворимого растительного белка p25 мы наблюдали у обоих сортов сои только при индукции каллуса на среде с 2,4-Д.

Разная химическая структура экзогенных ауксинов повлияла на изоимы пероксидаз как в щелочной, так и кислой областях спектра. Количественный набор изоимов пероксидаз показан в таблице 4.

Табл.4. СОДЕРЖАНИЕ ПЕРОКСИДАЗ В ТКАНЕВОЙ КУЛЬТУРЕ, НАХОДЯЩЕЙСЯ В РАЗНЫХ ФАЗАХ ДЕДИФФЕРЕНЦИАЦИИ

сорт	PRX	0		5 мкМ 2,4-Д		1 мМ ББ		1 мкМ ББ		1 нМ ББ	
		C _n	C _v	Ср	п.к.	Ср	п.к.	С	п.к.	С	п.к.
МА	A	-	4	4	10	-	12	8	-	5	-
	B	-	2	3	4	-	4	5	-	5	-
А	A	-	4	4	6	4	6	5	-	3	-
	B	-	8	8	3	8	5	6	-	2	-

PRX- пероксидазы (Е.С.1.11.1.7); С-семядоля; п.к.-первичный каллус; А- анодические; В- катодические изоимы пероксидаз; Сн.- сегменты семядолей, культивированные в

условиях *in vivo*; Civ- сегменты семядолей, культивированные в *in vitro* условиях;
Ср.- остаточная часть сегмента семядоли

Спектр изозимов пероксидаз показал, что ауксиноиды влияют на содержание ферментов с пероксидазной активностью главным образом в первичном каллусе, что связано с экспрессией генов во время дедифференциации клеток. Белки в семядолях растений сои, культивируемых в условиях *in vivo* в то же самое время онтогенеза, уже не содержали ферменты с пероксидазной активностью. Количественные различия были зарегистрированы в содержании белков с молекулярным весом 60, 90 и 160 кДа, являющимися пероксидазами. Спектр изозимов пероксидаз показал, что катаболические реакции использованных ауксиноидов идут в метаболизме сои разными путями, хотя рецепторный канал во внешней мембране клеток с большой вероятностью один и тот же. При проникновении ростовых веществ во внутриклеточное пространство клеток могут играть большую роль П-белки (Мв \approx 100 кДа), находящиеся на внешней стороне цитоплазматической мембраны, АТФ и ГТП- азы, пероксидазы и супероксиддисмутазы. Эти ферменты, вероятнее всего, первыми деградируют большие макромолекулы синтетических РВ. Радикалы РВ после их проникновения через цитоплазматическую мембрану при помощи МАП- киназных каскадов и РАС-белкового цикла транспортируются как к клеточному ядру, так и к внутриклеточным структурам, активизируя или ингибируя (в зависимости от химической структуры, времени действия и концентрации) их метаболические функции.

На основе полученных данных можно сделать следующие выводы:

1. Экспрессия генов в семядолях сои зависит от скорости утилизации запасных белков, которая является функцией как генетических, так и эпигенетических факторов.
2. Экспрессия генов в сегментах семядолей сои при дедифференциации клеток зависит от химической структуры экзогенных ростовых веществ в среде, и в исследованном интервале концентраций имеет линейную зависимость.
3. Экспрессия генов в первичном каллусе отражает разницу в генотипах, химический характер использованных ауксиноидов, и также разницу

градиентов между концентрациями экстра- и внутриклеточных ростовых веществ.

4. Экспрессия генов отражает плеiotропный эффект РВ.
5. Количество запасных белков меняется в зависимости от уровня дедифференциации.
6. 3-бензилоксикарбонилметил-2-бензотиазолинон по сравнению с 2,4-Д в первичном каллусе значительно сильнее влияет на количество белка р50 (Мв \approx 50 кДа) и ингибитора трипсина как активного зрелого белка, так и его полипептидов с Мв \approx 20,2 и 20,04 кДа.
7. Количественные различия в содержании белков с Мг \approx 44, 34, 39, 25, 22, 21 и 16 кДа показывают, что ростовые вещества соединены с реакциями фосфорилирования и дефосфорилирования и также контролируют узловые точки G1/S и G2/M клеточного цикла.

ЛИТЕРАТУРА

- 1) Beinsberger, E.S. et al., 1991: Plant Cell Physiol. 32: 489-496.
- 2) Bradford, M.R. 1976: Anal. Biochem. 72: 248-254.
- 3) Gamborg, O. L. et al. 1981: Plant tissue culture. Methods and Application in Agriculture (ed. Thorpe, T.A.) Accad. Press, N.Y.: 115-153.
- 4) Gianella, M. et al., 1971: Phytochem. 3: 539-541.
- 5) Hlinková, E., Ondřej, M. 1994: Biol. Plant. 36: 29-36.
- 6) Hlinková, E., Ondřej, M. 1996: Biologia 51: 43-48.
- 7) Hlinková, E., Belková, A. 1991: Biologia 46: 647-665, (in Slovak).
- 8) Hlinková, E. 1993: Acta F.R.N. Univ. Com. Gen. Biol. Mol. 24-25: 41-52.
- 9) Hlinková, E. et al., 1995: Agriculture (Poľnohospodárstvo) 41: 597-614, (in Slovak).
- 10) Hlinková, E. et al., 1998: Biol. Plant. 40: in press
- 11) Jones, A.M. Herman, E. 1993: Plant Physiol. 101: 595-606.
- 12) Lerner, E. C. et al., 1995: J. Biol. Chem. 270: 45: 26802-26806.
- 13) Laemmli, U. K. 1970: Nature 227: 680-685.
- 14) Miadoková, E. et al., 1995: I. J. Tox. Ecol. 15: 234.
- 15) Nesterenko, M. V. et al., 1994: J. Bioch. Biophys. Methods. 28: 239-242.
- 16) Romano, C. P. et al., 1993: Plant Cell 5: 181-189.
- 17) Reisfeld, R. A. et al., 1962: Nature 195: 281.
- 18) Sekerka, V. et al., 1984: Patent PV 1984 1726-84: pp50 (in Slovak).
- 19) Sekerka, V., Sutoris, V. 1985: Agriculture (Poľnohospodárstvo), 31: 872-882.

- 20) Sekerka, V. 1988: Dedifferentiation of plant cell. Com. University Bratislava, pp.249 (in Slovak).
- 21) Sekerka, V. et al., 1989: Agriculture (Poľnohospodárstvo) ,35:593-603. (in Slovak).
- 22) Smith, J.A. 1988: In: Current Protocols in Mol. Biology (eds. Ausubel, F.M. et. al.), Willey & Sons, N.Y., Toronto, Chichester, London, 10.0.1-10.3.11.
- 23) Strnad, M. et al., 1994 ; Phytochemistry 37: 1059-1062.
- 24) Šebánek, J. et al., 1991: In: Experimental morphogenesis and integrations of plants, Academia Praha, 13-48.
- 25) Tian, H., et al. ,1995: J. Biol. Chem. 270,26962-26969.
- 26) Vallejos, C. E. 1983; In: Isozymes in Plant Genetics & Breeding, Part A, (eds. Tanksley and Orton), Elsevier, 469-516

Рукопись поступила в издательский отдел
9 апреля 1998 года.