

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS
CENTRAL BOTANICAL GARDENS
Laboratory of Plant Biochemistry and Biotechnology

CELL NUCLEI OF PLANTS — EXPRESSION AND RECONSTRUCTION

After Materials of I Regional Conference,
Minsk, 28th-29th of July, 2001)

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
ЦЕНТРАЛЬНЫЙ БОТАНИЧЕСКИЙ САД
Лаборатория биохимии и биотехнологии растений

Клеточные ядра растений — Экспрессия и реконструкция

Материалы I Региональной научной конференции
г. Минск, 28–29 мая 2001 г.

Минск
2001

УДК 582.31/9:581.17

Научные рецензенты:

В.М.Юрин, доктор биологических наук, профессор (БГУ)
З.Я.Серова, доктор биологических наук (ИЭБ им. В.Ф.Купревича)

Изложены результаты исследований по составу, свойствам, организации интерфазных клеточных ядер высших растений, путей регуляторного воздействия на ядерный аппарат, включая реконструкцию генома с помощью трансгеноза. Представлены отдельные проблемы взаимодействия генома и пластома, чужеродных геномов, а также вопросы регуляторного воздействия на органеллы и клетки фитогормонов.

Редакционная коллегия:

В.Н.Решетников, Н.В.Гетко, О.П.Булко,
Т.И.Фоменко, Е.В.Спиридович

Материалы конференции изданы благодаря финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований

ЭКСПРЕССИЯ ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОГО И РАНЕВОГО ОТВЕТОВ В ТРАНСГЕННЫХ НАНС РАСТЕНИЯХ *NICOTIANA TABACUM*

Ленец А.А.

Центральный ботанический сад НАН Беларуси, г. Минск
220012, ул. Сурганова, 2В, e-mail: biolog@it.org.by

Исследовались трансгенные *NahC* растения табака с бактериальным геном *nahC*. Данные растения характеризуются спонтанным некрозом листьев (признак гиперчувствительного ответа), сопряженным с увеличением активностей ферментов раневого ответа - фенилаланинаммиаклиазы и полифенолоксидазы. Электрофоретическое разделение щелоче- и кислоторастворимых белков показало присутствие полипептидов, совпадающих по молекулярным массам с белками семейств PR-1,-3,-4,-5, липоксигеназами и ингибиторами протеаз. PR-3,-4,-5 белки индуцируются как инокуляцией с вирусом табачной мозаики, приводящей к гиперчувствительному ответу и системной приобретенной резистентности, так и поранением. PR-1 белки выявляются только при гиперчувствительном ответе и системной приобретенной резистентности. Раневым шоком стимулируется экспрессия липоксигеназ и низкомолекулярных ингибиторов протеиназ. Эти факты позволили предположить существование сорегуляции гиперчувствительного ответа и раневого шока в исследуемых растениях.

Введение. В последние годы огромный интерес у ученых вызывают ответные реакции растений на действие неблагоприятных стрессовых факторов окружающей среды. Особенно пристально исследуются такие индуцированные защитные ответы как гиперчувствительный ответ (hypersensitive response - HR), системная приобретенная резистентность (systemic acquired resistance - SAR) и раневой шок.

HR - это локальный защитный ответ, выражающийся в быстром локализованном некрозе клеток в местах инфицирования патогеном [1,2]. Полагают, что эти HR-повреждения блокируют дальнейшее распространение патогена и индуцируют в растении SAR - повышенную устойчивость неинфицированных растительных тканей к вторичным инфекциям. Главными отличительными чертами SAR в двудольных растениях являются ее долговременность и широкий спектр действия. SAR обеспечивает устойчивость растений ко многим грибным, бактериальным и вирусным инфекциям [3]. Триггерами раневого ответа растений выступают повреж-

дения растений вследствие абиотических стрессов и атаки насекомых-вредителей. Главным образом, раневой ответ изучается в контексте с индуцированной устойчивостью растений к насекомым [4].

HR, SAR и раневой шок характеризуются быстрым изменением экспрессии ряда генов, что приводит к индуцированию и/или репрессированию синтеза специфических мРНК или их трансляции и, в конечном итоге, к синтезу ряда так называемых стрессовых белков. Показано, что данные защитные механизмы, по-видимому, имеют общие точки в путях передачи сигнала. Наилучшим доказательством пересечения различных индуцированных защитных ответов является взаимодействие SAR и раневого ответа [5]. Однако до сих пор однозначно не показан тип взаимодействий – антагонистический или синергический – между этими защитными ответами.

Материал и методы исследований. Объектом исследований были трансгенные *NahC* и контрольные нетрансформированные растения *Nicotiana tabacum* sv. Samsun. Данные трансгенные растения экспрессируют бактериальный ген *nahC* из плазмиды биодеградации нафталина *Pseudomonas putida*. Ген *nahC* кодирует фермент 1,2-дигидрокси-нафталиндиоксигеназу. Данный фермент обладает низкой субстратной специфичностью и способен окислять не только нафталин, но и ряд других ароматических соединений. После трансформации листовых дисков табака вектором с геном *nahC* под контролем 35S CaMV – промотора и проведения молекулярно-генетических анализов, подтверждающих встраивание гена *nahC* в геном растения, были отобраны три растения, которые и дали начало трем линиям *NahC2*, *NahC9* и *NahC13* трансгенных растений табака. Данные растения были любезно предоставлены лабораторией генетической инженерии растений ИОГен РАН (г. Москва) под руководством профессора Э.С. Пирузян [6].

Исследуемые трансгенные растения табака выращивали в колбах в стерильных условиях на половинной среде Мурасиге - Скуга [7] при температуре 22 – 25°C, освещенности 5-6 тыс.лк. Световой день составлял 16 часов. Для исследований брали листья 40-дневных растений.

Выделение общих фракций легкорастворимых белков из листьев табака осуществляли методом Сафоновых [8] с использованием 0,0375 М трис- HCl буфера (pH 8.8), содержащим 0,001 М ас-

корбиновую кислоту, и ацетатного буфера (рН 5.2). Содержание белка в образцах определяли методом Бредфорда [9]. Фракции белков анализировали методом электрофореза в полиакриламидном геле (6-24% разделяющий, 4% концентрирующий) в щелочной системе с додецилсульфатом Na и в нативных условиях по методу Laemmli [10] с некоторыми модификациями.

Результаты и их обсуждение. Ценная информация по вопросу регуляции SAR и раневого ответа была получена на примере растений-мутантов *Arabidopsis acd2* и *cpr5*, спонтанно образующих некротические пятна в листьях и характеризующихся повышенными уровнями мРНК PR-белков (маркеров SAR) и PDF1.2 белка (маркера поранения) в этих органах [11,12]. Это указывает на общую индукцию разных защитных путей при инокуляции с бактериями. Данный эффект может быть результатом индукции SAR вследствие патогенной инфекции или запуска раневого ответа при повреждении тканей, вызванном этой инфекцией. К тому же были получены несколько мутантов, которые конститутивно экспрессировали оба пути в отсутствие какой-либо клеточной смерти (*cims*, *cpr*), предполагая регуляцию, независимую от клеточной смерти [13].

Исследуемые нами трансгенные *NahC* растения табака также совмещают в себе характерные черты двух защитных механизмов – HR и раневого ответа. Как и растения-мутанты *acd2* и *cpr5*, трансгенные *NahC* растения демонстрируют спонтанное образование на листьях некротических пятен (один из главных признаков HR), сопряженное с многократным увеличением активностей двух ферментов, вовлекаемых в раневой ответ, - фенилаланинаммиаклиазы и полифенолоксидазы. Проведенные нами исследования полипептидного состава *NahC* растений показали присутствие в спектре этих растений белков, не характерных для контроля. По молекулярным массам (М.м.) (5; 16,5; 21; 32; 34 кД) эти белки совпадают с PR-белками семейств PR-1,-3,-4,-5. Интересно, что данные PR-белки (за исключением PR-1) индуцируются как инокуляцией с вирусом табачной мозаики, приводящей к HR и SAR, так и поранением. PR-1 белки, к которым по М.м. близок показанный нами 16,5 кД белок, выявляются только при HR и SAR. Раневым шоком стимулируется также экспрессия липоксигеназ с М.м. \approx 99 кД и низкомолекулярных ингибиторов протеиназ. Белки с такими М.м. были зарегистрированы нами в спектрах *NahC* растений.

Все эти факты позволяют нам предположить существование со-регуляции HR и раневого шока в трансгенных *NahC* растениях табака, что хорошо укладывается в схему Maleck и Dietrich [5], обобщающую сигнальные пути 2-х защитных ответов растений, и является еще одним доказательством теории этих авторов об универсальном сигнальном SOS-пути, который запускает индукцию всех имеющихся защитных систем, активирующихся при патогенной атаке.

Установлено, что одним из первых этапов в этом сигнальном SOS-пути является накопление фенольных соединений. Анализируя собственные и литературные данные, мы пришли к заключению, что одна из ключевых ролей в метаболизме фенолов и, как следствие, в регуляции защитных систем принадлежит диоксигеназам. Созданы растения-мутанты кукурузы *lls*, демонстрирующие, как и исследуемые нами *NahC* табака, спонтанное появление на листьях некротических областей. Gray et al. [14], клонировав ген *LLS1*, и проведя его сиквенс-анализ, показали гомологию его белкового продукта с диоксигеназами, расщепляющими ароматическое кольцо и вовлекаемыми в катаболизм фенольных соединений. В данном случае продукт гена *LLS1* выступает в качестве супрессора клеточной смерти растений, в частности HR, поскольку мутация в гене *LLS1* привела к спонтанному локальному некрозу листьев [14].

Исследуемые нами трансгенные *NahC* растения табака экспрессируют ген 1,2-дигидроксинафталиндиоксигеназы, которая, как и продукт гена *LLS1*, расщепляет ароматическое кольцо фенолов. Однако в отличие от последнего, 1,2-дигидроксинафталиндиоксигеназа выступает не в качестве супрессора клеточной смерти растений, а в роли ее триггера, поскольку именно с введением в геном *nahC* гена растения табака стали демонстрировать локальные некротические пятна на листьях.

По-видимому, при расщеплении ароматического кольца фенолов с помощью диоксигеназ, кодируемых генами *LLS1* и *nahC*, образуются соединения, которые и обладают функциями супрессоров-триггеров клеточной смерти растений.

Литература

- 1 He S.Y., Gopalan S., Wei W., Yuan J. Molecular biology of plant- bacterial interactions: Thirtieth Annual Report / MSU-DOE Plant Research Laboratory, Michigan State University, USA.- Michigan, 1995. P. 29-34.
- 2 Maleck K., Lawton K. Plant strategies for resistance to pathogens // Current Opinion in Biotechnology. 1998. V.9. P.208-213.
- 3 Mittler R., Shulaev V., Lam E. Coordinated activation of programmed cell death and defense mechanisms in transgenic tobacco plants expressing a bacterial proton pump // Plant Cell. 1995. V.7. P.29-42.
- 4 Glazebrook J. Genes controlling expression of defense response in Arabidopsis // Current Opinion in Plant Biology. 1999. V.2. P.280-286.
- 5 Maleck K., Dietrich R.A. Defense on multiple fronts: how do plants cope with diverse enemies? // Trends in plant science. 1999. V.4, N6. P.215-219.
- 6 Piruzian E.S., Kobets N.S., Goldenkova I.V. Molecular Responses of Plants to Biotic and Abiotic Stresses: Thethis. Helsinki (Finland). 1996. P.29-34.
- 7 Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture.// Ibid. 1962. V.15. P.473-497.
- 8 Сафонов В.И., Сафонова М.П. Исследование белков и ферментов растений методом электрофореза в полиакриламидном геле/В кн.: Биохимические методы в физиологии растений М:Наука, 1971. С.113-119.
- 9 Bredford M.M. A rapid sensitive method for the action of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein –dye binding// Anal.Biochem. 1976. V.72. P.248-254.
- 10 Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4// Nature.-1970. V.227. P.680-685.
- 11 Penninckx I.A.M.A., Eggermont K., Terras F.R.G. et al. Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway // Plant Cell. 1996. V.8. P.2309-2323.
- 12 Bowling S.A. et al. The *cpr5* mutant of *Arabidopsis* expresses both NPR1-dependent and NPR1-independent resistance // Plant Cell. 1997. V.9. P.1573-1584.
- 13 Bowling S.A. et al. A mutation in *Arabidopsis* that leads to constitutive expression of systemic acquired resistance // Plant Cell. 1994. V.6. P.1845-1857.
- 14 Gray J., Close PS., Briggs SP. et al. A novel supressor of cell death in plants encoded by the *L1s1* gene of maize // Cell. 1997. V.89. P.25-31.

Summary

Polypeptide spectra of tobacco transgenic NahC plants were investigated by methods of electrophoresis under denatured and native conditions. The received results have allowed to assume an existence of co-regulation of hypersensitive response and wounding in researched plants.