



DOI: 10.22363/2312-797X-2017-12-4-323-331

КОРОТКИЕ ПЕПТИДЫ РЕГУЛИРУЮТ РОСТ КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ ТАБАКА *NICOTIANA TABACUM L.*

Т.А. Диловарова, С.В. Смесова,
Е.Н. Баранова, Л.И. Федорева

Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной биотехнологии РАН
ул. Тимирязевская, 42, Москва, Россия, 127550

Фитогормоны, представляющие собой секретлируемые пептиды, играют важную роль в межклеточных взаимодействиях, участвуя в регуляции развития и в многочисленных физиологических процессах и в ответах на воздействие окружающих факторов. Короткие пептиды в концентрации 10^{-7} — 10^{-8} М регулируют рост и развитие каллусной культуры табака (*Nicotiana tabacum L.*) в культуре *in vitro*. AlaGluAspGly, AlaAspGluLeu, GlyGly и GlyAsp на 28 день культивирования показали увеличение биомассы табака в 1,5—2,5 раза, увеличение числа регенерантов на эксплант на 10—30%, а также площади листовой пластинки регенерантов в 2—2,5 раза. Экзогенные пептиды влияют на экспрессию генов, кодирующих белки регуляторов факторов роста. Установлено, что величины экспрессии, рассчитанные методом ПЦР-РВ, зависят от природы пептида. Кроме того, разные по структуре пептиды дифференцированно влияют на разные гены (growth regulating factor) GRF. Наибольшее увеличение уровня экспрессии генов семейства *GRF* наблюдается: в присутствии AlaAspGluLeu — *GRF1*, *GRF3*, *GRF4* в 3,5—4 раза, в присутствии AlaGluAspGly — *GRF2* более чем 4,5 раз, GlyGly — *GRF4* более чем 3 раза, GlyAsp — *GRF3*, *GRF4* в 3—4 раза. Предполагается, что в клеточной культуре короткие пептиды могут действовать как регуляторы роста растений нового поколения, которые могут найти применение в биотехнологии и практическом растениеводстве.

Ключевые слова: короткие пептиды, регуляторы роста растений, каллусная культура, табак *Nicotiana tabacum L.*, гены *GRF*

Важнейшей задачей агробиотехнологии является увеличение продуктивности сельскохозяйственных культур. Наиболее эффективным способом решения этой задачи является создание высокопродуктивных сортов растений, что является весьма трудоемким и дорогостоящим процессом. Альтернативным подходом могли бы стать трансгенные высокоэффективные сорта, которые в настоящее время не получили достойного применения в сельском хозяйстве. Таким образом, для агробиотехнологии наиболее приемлемым подходом остается создание технологии использования разнообразных биологически активных веществ, гормонов с целью увеличения продуктивности и повышения урожайности сельскохозяйственных культур [1].

Пептиды образуют обширную и многообразную сигнальную регуляторную систему, контролирующую физиологию, рост и развитие животных и растений [2, 3]. Большинство известных эндогенных пептидов — это гормоны (нейропептиды, гормоны роста). Фитогормоны, представляющие собой секретлируемые пеп-

тиды, играют важную роль в межклеточных взаимодействиях, участвуя в регуляции развития и в многочисленных физиологических процессах и в ответах на воздействие окружающих факторов. Наиболее изученным семейством секретируемых пептидов в растениях является семейство CLE-CLAVATA3/endosperm surrounding region related [4, 5]. Эти пептиды взаимодействуют с сигнальными фитогормонами и могут участвовать в регуляции, модулируя широкий круг биологических процессов. Установлено, что CLE пептиды направленно влияют на процессы развития семени, закладку и образование сосудистых тканей, инициации закладки придаточных корней, а также в регуляции гомеостаза стволовых клеток в апикальной меристеме проростков и корней. О действии экзогенных коротких пептидах на растительные клетки данные практически отсутствуют [6].

Целью данной работы явилось изучение действия коротких пептидов — AlaGluAspGly, AlaAspGluLeu, GlyGly и GlyAsp на каллусную культуру табака (*Nicotiana tabacum* L.).

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Тетрапептиды AlaGluAspGly и AlaAspGluLeu были синтезированы в Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии. Дипептиды GlyGly и GlyAsp — фирмы «Serva», США.

В качестве объекта исследования использовали табак *Nicotiana tabacum* L. сорт Samsun Sn-1. В качестве эксплантов использовали семядольные листья проростков. Растения культивировали на агаризованной среде Мурасиге-Скуга (МС) [7] с добавлением к ней следующих биологически активных веществ: 6-бензиламинопурин 2 мг/л и индолилуксусная кислота 0,2 мг/л. Семена стерилизовали в растворе гипохлорита натрия в течение 15 мин с последующей 3-кратной промывкой стерильной водой. Затем семена помещали на безгормональную агаризованную питательную среду в чашки Петри и проращивали в течение 10 дней при температуре 24 °С. После прорастания семядоли помещали на питательную среду, содержащую гормоны с добавлением пептидов в концентрации 10^{-7} М, после стерилизации фильтрованием. Данная концентрация, как оптимальная для применения в культуре *in vitro*, была выбрана по результатам предыдущих экспериментов [6]. Условия культивирования: в световой комнате при температуре 26 °С, освещение люминесцентными лампами (5000 Люкс, фотопериод 16 часов). Изменения в развитии фиксировались еженедельно. Опыты проводились в течение 4 недель в 4-х повторностях.

РНК выделяли по стандартному методу с использованием наборов реагентов для выделения РНК «РНК-Экстран» ООО Синтол (Россия). Концентрацию выделенных препаратов определяли спектрофотометрически.

кДНК получали по стандартной методике, используя набор реагентов для проведения обратной транскрипции ООО Синтол (Россия).

Гены семейства *GRF*(growth regulating factor) из *N. tabacum* L. были найдены в базе данных NCBI. Праймеры к генам были оптимизированы по базе данных NCBI. Подобранные праймеры были синтезированы в ООО Синтол. Все праймеры представлены в табл. 1.

Праймеры к GRF генам *Nicotiana tabacum L.*

Наименование	3'-5'-последовательность	Кодируемый белок
GRF-1	ccc gga ttc cca act aca ca agc gcg tgt act tca cta ctt	DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase 2-like
GRF-2	cat cca gca gtg cac aga ga ctt cct gag acc gag cag tg	DNA topoisomerase 3-alpha-like
GRF-3	tac gaa ctg tga ggc atc cg ttc acc act caa tgt gcc gt	3'-5' exoribonuclease 1-like
GRF-4	gac gaa gag gaa ggc ttg ga gcc gta ctc cca tca gct tt	endonuclease 8-like 3

Реакцию ПЦР в реальном времени проводили в термоциклере CFX 96 Real-Time System (BIORAD). Подготовку образцов проводили по стандартному методу с помощью набора реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии Sybr GreenI ООО Синтол. Реакция ПЦР-РВ проводилась в одинаковых условиях для всех образцов: 95 °С — 5 мин — активация Taq полимеразы, далее 45 циклов — 94 °С — 30 сек, 58 °С — 30 сек, 72 °С — 30 сек. После последнего цикла 72 °С — 2 мин. Реакцию ставили в 3-х параллелях и 3-х повторностях. Относительный уровень экспрессии рассчитывали по калибровочной кривой относительно гена *Gapdh*, сделанной в пяти повторах.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программы Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Растения обладают способностью постоянно продуцировать новые ткани и органы на протяжении всей их жизни. Жизнеспособность растений так сильна, что они могут существовать несколько столетий и даже больше. И этот удивительный факт обусловлен растительными стволовыми клетками. Стволовые клетки растений обеспечивают их обновление и образование из них листьев, стеблей, стволов и цветов. Стволовые клетки репарируют ткани и регенерируют органы. Соотношение между сохранением стволовых клеток и их дифференциацией является основным аспектом для нормального роста и развития растения. Такие элементы — молекулярные регуляторы, как фитогормоны, факторы транскрипции и некоторые другие известные и неизвестные гены кооперируются для реализации этих процессов [8].

В качестве объекта для исследования была выбрана модель регенерации и образования каллусной ткани *Nicotiana tabacum L.* сорт Samsun Sn-1. В качестве эксплантов использовали семядоли табака. Изучались следующие показатели: скорость образования каллусной массы, количество регенерантов, скорость роста регенерантов, образование листовой системы у регенерантов. Для того чтобы охарактеризовать каллусы, использовали такие показатели, как: плотность, окраску, обводненность и весу сырой каллусной массы. Через 3 недели после помещения экспланта на среду с добавлением пептидов регистрировали частоту каллусогенеза

и морфологию образовавшихся каллусов: цвет, текстуру, величину, количество образовавшихся регенерантов и листьев. В конце эксперимента (через 4 недели) отмечали нормально сформировавшиеся растения (регенеранты), имеющие побеги и корневую систему, и отклоняющиеся формы (ризогенез, геммагенез). Эффективность регенерации рассчитывали как процент каллусов, давших нормальные растения-регенеранты от общего количества каллусных линий.

Известно, что использование цитокининов вызывает интенсивный каллусогенез. В серии проведенных экспериментов установлено, что пептиды не препятствовали формированию каллуса. Во всех вариантах каллус и регенеранты образовывались у всех эксплантов. Гибели эксплантов нами отмечено не было. Наблюдения, проводившиеся на 7-е сутки, показали более высокую индукцию каллусогенеза с добавлением пептидов в питательную среду во всех вариантах. Наиболее интенсивное каллусообразование наблюдалось на 6—8 сутки под воздействием гормонов в присутствии AlaAspGluLeu в концентрации 10^{-7} М.

На рисунке 1 представлены характерные фотографии, демонстрирующие процесс каллусообразования и регенерации после 28 суток культивирования на агаризованной среде МС без и в присутствии пептидов. Контрольный каллус имеет более рыхлую структуру, светло-зеленую окраску. Большая часть регенерантов находится в зачаточном состоянии (рис. 1 а—в). Формирующиеся листовые пластинки имели небольшой размер (рис. 1б, табл. 2). В вариантах с применением AlaAspGluLeu были получены наилучшие результаты: каллус имел яркую зеленую окраску, плотную структуру, образовывался равномерно по всему экспланту, а регенеранты выглядели более мощными, их было больше (рис. 1 г—е, табл. 2) и они имели более сформированную структуру. Листовые пластинки в присутствии пептидов были более крупными (рис. 1, табл. 2). Наибольшим количеством регенерантов было выявлено при культивировании каллусов в присутствии AlaAspGluLeu. Площадь листовых пластинок увеличивалась при воздействии всех изученных пептидов, особенно при добавлении в среду AlaAspGluLeu. Как видно из табл. 2, пептиды влияли на увеличение биомассы в 1,5—2,5 раза. Регенерационный потенциал также был выше в опытных вариантах (табл. 2).

Таким образом, присутствие в питательной среде пептидов оказало положительный эффект как на накопление биомассы, так и на регенерационный потенциал — количество и размер регенерантов. Выявлена высокая эффективность AlaAspGluLeu на каллусной культуре табака.

Полученные результаты убедительно свидетельствуют о перспективности использования коротких пептидов для улучшения процессов регенерации у растений.

Факторы регуляторов роста (*GRF*) в растениях являются специфическими факторами транскрипции. Их роль была определена в развитии стебля, листьев, цветов и формировании семян, развитии корней и в координации процессов роста во враждебной окружающей среде [9].

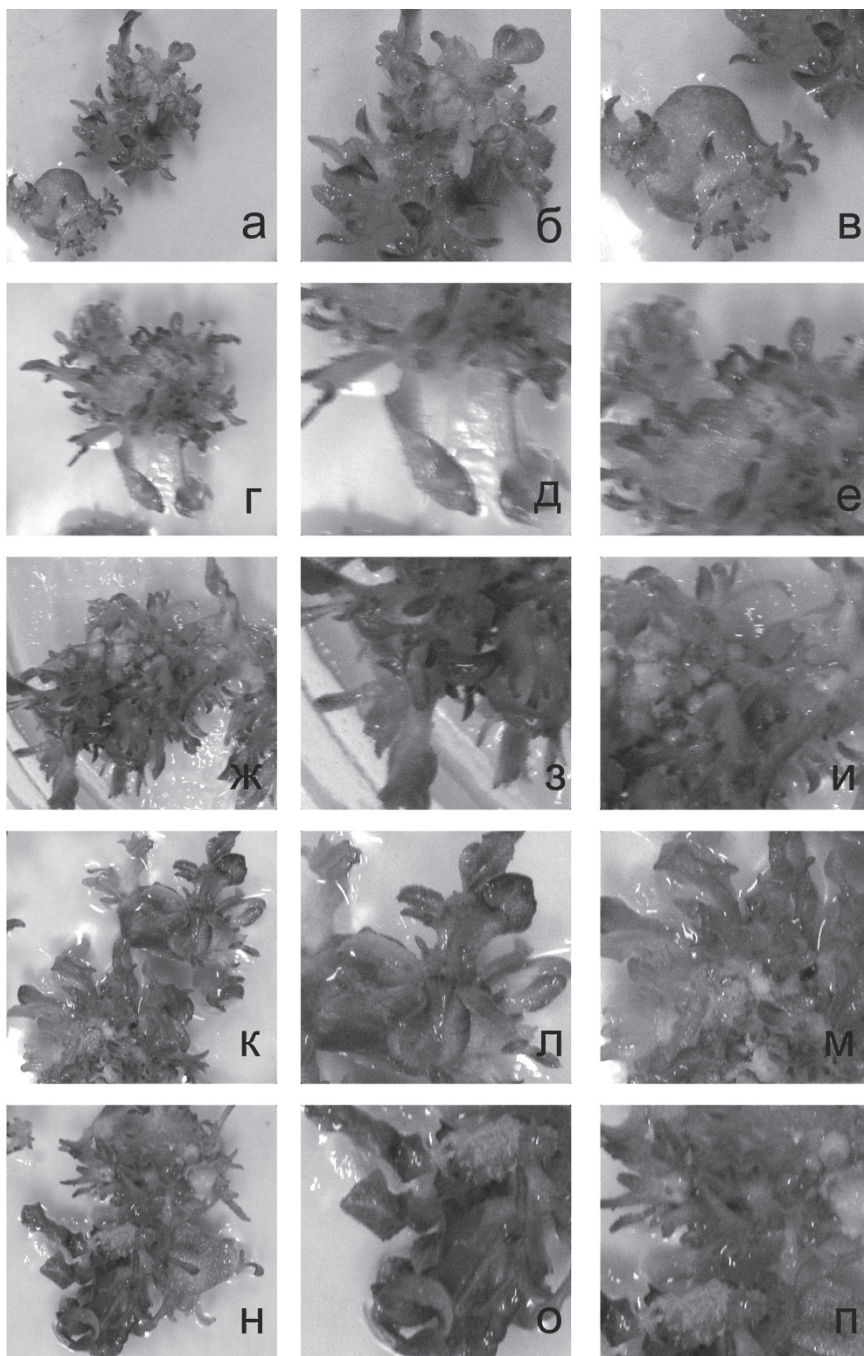


Рис. 1. Эффект коротких пептидов на каллусогенез табака *Nicotiana tabacum* L. после культивирования в течение 28 дней на агаризованной среде МС. Регенерация на среде МС с добавлением 2 мг/л 6 БАП и 0,2 мг/л ИУК без — а—в; с добавлением AlaGluAspGly — г—е; AlaAspGluLeu — ж—и; GlyGly — к—м и GlyAsp — н—п. Первый ряд — общий вид экспланта; второй ряд — регенеранты с крупными листьями; третий ряд — морфогенный каллус

Таблица 2

Влияние коротких пептидов на развитие каллусной массы и регенерационный потенциал табака

Вариант	Вес каллусной массы, мг	Число регенерантов на эксплант, шт	Площадь листа крупных регенерантов, мм ²	Площадь листа мелких регенерантов, мм ²
Контроль	297 ± 14	7,8 ± 0,7	6,2 ± 2,0	2,5 ± 1,1
AlaAspGluLeu	698 ± 16	11,2 ± 0,5	15,8 ± 2,2	5,0 ± 1,0
AlaGluAspGly	581 ± 16	9,8 ± 0,6	12,9 ± 1,8	3,8 ± 0,8
GlyGly	462 ± 12	9,0 ± 0,5	12,1 ± 1,4	4,1 ± 0,8
GlyAsp	374 ± 12	9,5 ± 0,5	12,7 ± 2,1	4,0 ± 0,9

Для табака только у четырех генов регуляторов фактора роста (GRF) были определены кодируемые белки. Этот факт явился основным при выборе объектов исследования для изучения их экспрессии под воздействием коротких пептидов. Все кодируемые белки используемых нами генов специфически связываются с ДНК по определенным сайтам. Это ДНК-апуриновая/апириமிдиновая лигаза, ДНК-топоизомераза 3α,3',5'-экзонуклеаза и эндонуклеаза 8 (см. табл. 1).

Данные по экспрессии генов *GRF* в каллусной культуре табака, выращенного как в отсутствии, так и в присутствии коротких пептидов, представлены на рис. 2.

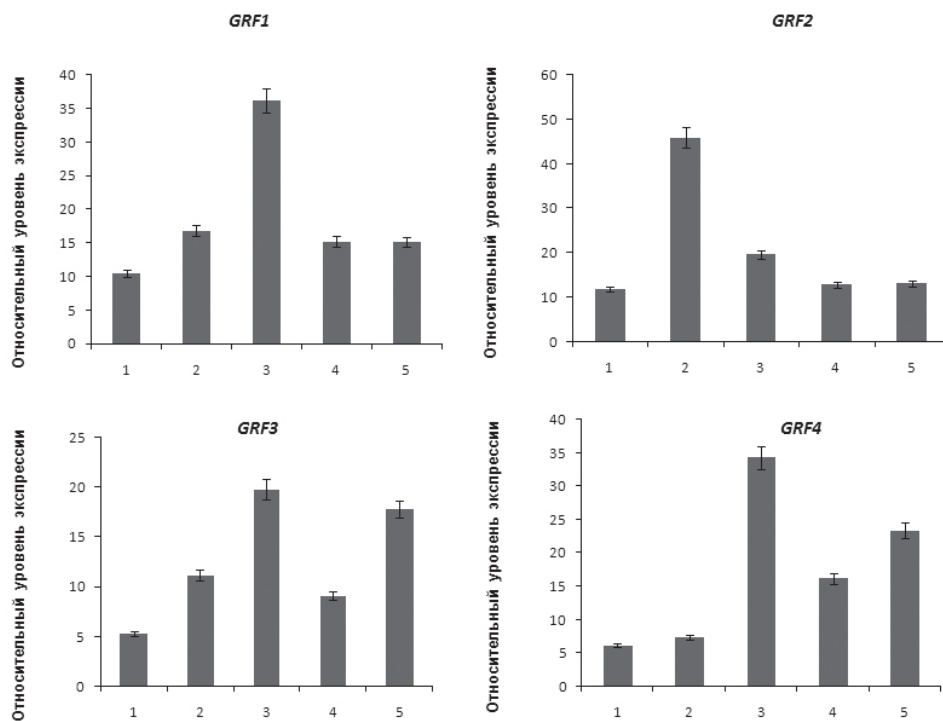


Рис. 2. Относительный уровень экспрессии генов семейства *GRF* в каллусах *Nicotiana tabacum* L., выращенных на питательной среде MC без и в присутствии коротких пептидов:

1 — контроль, 2 — AlaGluAspGly, 3 — AlaAspGluLeu, 4 — GlyGly, 5 — GlyAsp

Как следует из этого рисунка, тетрапептид Ala-Asp-Glu-Leu увеличивает экспрессию гена *GRF1* практически в 4 раза, а три других пептида только незначительно активировали этот ген (~1,5раз). Хотя Ala-Asp-Glu-Leu и увеличивают экспрессию гена *GRF2*, но только в 2 раза, в отличие от тетрапептида AlaGluAspGly, который экспрессирует *GRF2* практически в 5 раз. Дипептиды GlyGly и GlyAsp практически не влияли на экспрессию гена *GRF2*. Все используемые пептиды незначительно влияют на экспрессию гена фактора роста *GRF3* и увеличивают уровень экспрессии в 1,5—3 раза. Тетрапептид Ala-Asp-Glu-Leu увеличивает экспрессию гена *GRF4* почти в 4 раза, дипептид GlyGly — в 3 раза, а дипептид GlyAsp — почти в 5 раз по сравнению с контролем. Нужно отметить, что присутствие тетрапептида AlaGluAspGly в питательной среде практически не изменило уровень экспрессии гена *GRF4*. Таким образом, короткие пептиды влияют на экспрессию генов, кодирующих белки регуляторов факторов роста. Величина экспрессии зависит от природы пептида. Кроме того, разные по структуре пептиды по-разному влияют на разные гены *GRF*. Эти данные могут указывать на то, что короткие пептиды, связываясь с определенными промоторными участками ДНК, могут регулировать экспрессию генов, подобно действию растительных гормонов [10].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, короткие экзогенные пептиды могут являться регуляторами роста, развития и клеточной дифференцировки, целенаправленно влияя на экспрессию определенных генов. Мы предполагаем, что короткие пептиды могут действовать в клеточной культуре как регуляторы роста растений нового поколения, которые могут найти применение в биотехнологии и практическом растениеводстве.

Работа была выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования ФГБНУ ВНИИСБ по государственному заданию № 0574-2014-0003.

Благодарим Хавинсона В.Х. за предоставленные AlaGluAspGly, AlaAspGluLeu и ООО Синтол за синтез праймеров к генам *GRF*.

© Т.А. Диловарова, С.В. Смесова, Е.Н. Баранова, Л.И. Федорева, 2017.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- [1] Харченко П.Н. Проблемы агробиотехнологии. ФГБНУ «Росинформагротех», 2012. С. 1—260.
- [2] Czyzewicz N., Yue K., Beeckman T., De Smet I. Message in bottle: small signalling peptides outputs during growth and development // *J. Exp. Biol.* 2013. № 66. P. 5229—5243.
- [3] Murphy E., Smith S., De Smet I. Small signalling peptides in Arabidopsis development: how cells communicate over a short distance // *Plant Cell.* 2012. № 24. P. 3198—3217.
- [4] Wang G., Zhang G., Wu M. CLE peptide signaling and crosstalk with phytohormones and environmental stimuli // *Frontiers in Plant science* 2016. № 6. P. 1211—1217.
- [5] Betsuyaku S., Sawa S., Yamada M. The function of the CLE peptides in plant development plant microbe interactions // *Arabidopsis book.* 2011. № 9. P. 149.
- [6] Федорева Л.И., Диловарова Т.А., Ашапкин В.В., Мартиросян Ю.Ц., Хавинсон В.Х., Харченко П.Н., Ванюшин Б.Ф. Короткие экзогенные пептиды регулируют экспрессию генов CLE, KNOX1 и GRF у *Nicotiana tabacum* // *Биохимия.* 2017. № 82. P. 700—709.

- [7] *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // *Physiologia plantarum*. 1962. Т. 15. №. 3. С. 473—497.
- [8] *Zhang W., Yu R.* Molecular mechanism of stem cells in *Arabidopsis thaliana* // *Pharmacogn. Rev.* 2014. № 8 (16). P. 105—112.
- [9] *Omidbakhshfar M.A., Proost S., Fujikura U., Mueller-Roeber B.* Growth-Regulating Factors (GRFs): A Small Transcription Factor Family with Important Functions in Plant Biology // *Mol. Plant*. 2015. № 8. P. 998—1010.
- [10] *Jiménez V.M.* Involvement of plant hormones and plant growth regulators on in vitro somatic embryogenesis // *Plant Growth Regulation*. 2005. Т. 47. № 2—3. С. 91—110.

Сведения об авторах:

Диловарова Татьяна Анатольевна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник группы геномной модификации ФГБНУ Всероссийского НИИ сельскохозяйственной биотехнологии; e-mail: dilovarova@yandex.ru

Смесова Светлана Викторовна — студент РГАУ Московской сельскохозяйственной академии им. К.А. Тимирязева; младший научный сотрудник группы геномной модификации ФГБНУ Всероссийского НИИ сельскохозяйственной биотехнологии; e-mail: smesova.svetlana@mail.ru

Баранова Екатерина Николаевна — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной биологии ФГБНУ Всероссийского НИИ сельскохозяйственной биотехнологии; e-mail: greenpro2007@rambler.ru

Федорева Лариса Ивановна — доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник группы геномной модификации ФГБНУ Всероссийского НИИ сельскохозяйственной биотехнологии; e-mail: fedlara@inbox.ru

Для цитирования:

Диловарова Т.А., Смесова С.В., Баранова Е.Н., Федорева Л.И. Короткие пептиды регулируют рост каллусной культуры табака *Nicotiana tabacum L.* // *Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Агротомия и животноводство*. 2017. Т. 12. № 4. С. 323—331. DOI: 10.22363/2312-797X-2017-12-4-323-331.

DOI: 10.22363/2312-797X-2017-12-4-323-331

SHORT PEPTIDES REGULATE THE GROW OF CALLUS CULTURE TOBACCO *NICOTIANA TABACUM L.*

**T.A. Dilovarova, S.V. Smesova,
E.N. Baranova, L.I. Fedoreyeva**

All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology,
Russian Academy of Sciences
Timiryazevskaya st., 42, Moscow, Russia, 127550

Abstract. Phytohormones, which are secreted peptides, play an important role in intercellular interactions, participating in the regulation of development and in numerous physiological processes and in responses to the influence of environmental factors. Short peptides in a concentration of 10^{-7} — 10^{-8} M regulate the growth and development of the callus culture of tobacco (*Nicotiana tabacum L.*) in culture in vitro. AlaGluAspGly, AlaAspGluLeu, GlyGly and GlyAsp on the 28th day of cultivation showed an increase in the biomass of tobacco by a factor of 1.5 to 2.5, an increase in the number of regenerants per explant by 10—30%, and also the area of the leaf plate of regenerants by 2—2.5 times. Exogenous peptides

influence the expression of genes encoding the proteins of growth factor regulators. It was found that the expression values calculated by the PCR-PB method depend on the nature of the peptide. In addition, structurally different peptides differentially affect the different genes (growth regulating factor) of GRF. The greatest increase in the expression level of GRF family genes is observed in the presence of AlaAspGluLeu — GRF1, GRF3, GRF4 3.5—4 times, in the presence of AlaGluAspGly — GRF2 more than 4.5 times, GlyGly — GRF4 more than 3 times, GlyAsp — GRF3, GRF4 in 3—4 times. It is assumed that in the cell culture, short peptides can act as a regulator of the growth of new generation plants that can find application in biotechnology and practical plant growing.

Key words: short peptides, plant growth regulators, callus culture, *Nicotiana tabacum* L. tobacco, GRF genes

REFERENCES

- [1] Kharchenko P.N. *Problems of agro-biotechnology*. FEDERAL state budgetary scientific institution “Rosinformagrotekh”, 2012. C. 1—260.
- [2] Czyzewicz N., Yue K, Beeckman T. Communications I. estimates in a bottle: small signalling peptide outputs during growth and development. *J. exp. Biol.* 2013. No. 66. P. 5229—5243.
- [3] Murphy E., Smith S., De Smet I. Signalling Small peptides in Arabidopsis development: how cells communicate at a distance shot. *Plant cell*. 2012. No. 24. P. 3198—3217.
- [4] Wang G., Zhang G., Wu M. CLE Signaling peptides and cross stem with phytohormones and environmental stimuli. *Science about plants* by 2016. No. 6. P. 1211—1217.
- [5] Betsuyaku S., Sawa S.M. Yamada functions of CLE peptides in plants plant development microbe interactions. *The Arabidopsis book*. 2011. No. 9. P. 149.
- [6] Fedoreeva L.I., Dilovarov T.A., Agapkin V., Martirosyan Yu.C., Khavinson X., Kharchenko P.N., Vanyushin B.F. Short peptides regulate gene expression of exogenous CLE, KNOX1 and GRF from *Nicotiana tabacum*. *Biochemistry*. 2017. No. 82. P. 700—709.
- [7] Murashige T., Skoog F. Revised medium for rapid growth and bioanalysis with tobacco tissue cultures. *Physiology of plantar*. 1962. T. 15. No. 3. S. 473—497.
- [8] Zhang V., Ju. R. Molecular mechanism of stem cells in the Arabidopsis talian. *Pharmakogn. Rev.* 2014. No. 8(16). P. 105—112.
- [9] Omidbakhshfar A.M., Proust C., Fujikura U., Mueller-Roeber B. Growth-regulatory factors (CSF): a small Transcription factor family with essential functions in plant biology. *Biochemistry Plant*. 2015. No. 8. P. 998—1010.
- [10] Jimenez V.M. Participation of plant hormones and plant growth regulators under laboratory conditions somatic embryogenesis. *Regulation of plant growth*. 2005. T. 47. No. 2—3. P. 91—110.

For citation:

Dilovarova T.A., Smesova S.V., Baranova E.N., Fedoreyeva L.I. Short peptides regulate the grow of callus culture tobacco *Nicotiana tabacum* L. *RUDN Journal of Agronomy and Animal Industries*, 2017, 12 (4), 323—331. DOI: 10.22363/2312-797X-2017-12-4-323-331.