УДК 661.162.63 : 577.112.6 : 577.171
DOI
Известия ТСХА, выпуск 4, 2018

ЗАЩИТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ПЕПТИДА ALAGLUASPLEU НА ПРОРОСТКИ И КАЛЛУСНУЮ КУЛЬТУРУ ТАБАКА (*NICOTIANA TABACUM* L.), ВЫРАЩЕННЫХ В УСЛОВИЯХ ЗАСОЛЕНИЯ

Н.В. КОНОНЕНКО[1], Е.Н. БАРАНОВА[1], Т.А. ДИЛОВАРОВА[1], С.В. СМЕСОВА[1,2], Р.В. КАНАВСКИЙ[2], Л.И. ФЕДОРЕЕВА[1]

([1] ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии РАН;
[2] РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева)

В настоящее время большое внимание в агробиотехнологии и сельском хозяйстве в целом, уделяется поиску новых, эффективных регуляторов роста, способных обеспечить стабильно устойчивые урожаи, в том числе и в условиях абиотического стресса. Короткие пептиды могут оказывать значительное влияние на процессы формирования растений при действии абиотических факторов, в частности засоления. Показано, что тетрапептид AlaAspGluLeu оказывал влияние на развитие проростков и каллусообразование растений табака при добавлении NaCl. Выявлены эффекты AlaAspGluLeu на морфологические характеристики: 1) проростков - на длину корня и гипокотеля, уровень и локализацию АФК; 2) каллусов - на эффективность регенерации, количество регенерантов на эксплант и размеры листовых пластинок регенерантов. AlaAspGluLeu способствует усилению роста растений в нормальных условиях и оказывает протекторное действие, снижая ингибирующие действие соли как на надземную часть растений, так и на корневую систему. Наблюдаемый эффект пептид оказывает в очень низкой концентрации (10^{-7}M), что позволяет предположить, что его действие сравнимо с регуляторным действием гормонов растений. Применение пептида AlaAspGluLeu при засолении повышает устойчивость клеток зоны деления (меристема) и зоны всасывания к стрессовым условиям. Действие тетрапептида при засолении на ткани корня табака показало, что наиболее защищенными являются клетки эпидермы, по сравнению с клетками коры. Вызываемое действием NaCl обводнение каллусной ткани и регенерантов в присутствие AlaAspGluLeu приводит к усиленному развитию регенерантов, увеличению листовой пластины и сохранению интенсивной зеленой окраски, свидетельствующей о протекторном действии на фотосинтетическую систему. Предполагается, что AlaAspGluLeu является эффективным регулятором роста растений, обладающим защитным действием при неблагоприятных абиотических воздействиях, в частности, воздействиях, вызванных хлоридным засолением.

Ключевые слова*: *регуляторы роста растений, каллус, табак Nicotiana tabacum L., засоление, короткие пептиды, активные формы кислорода.

Среди абиотических стрессов, высокая засоленность почв является наиболее жестким стрессом для растений, снижающим урожайность самых важных культур более, чем на 50%. По крайне мере, 20% всех плодородных почв в мире имеют высокое засоление. При этом по прогнозам климатические изменения могут привести к серьезным увеличениям площади засоленных плодородных почв [1,3,5].

Высокая засоленность почвы часто приводит к быстрому сокращению темпов роста и развития растений в ответ на действие стрессового фактора, вызванного либо воздействием токсичных ионов на метаболизм, либо неблагоприятными водными условиями [14].

Устойчивость к засолению почв обуславливает необходимость адаптации к нескольким стрессовым факторам, в том числе: к осмотическому стрессу, который приводит к нарушению гомеостаза и ионного транспорта в клетках; к токсическому действию активных ионов; к окислительному стрессу, который может приводить к денатурации структурных и ферментативных белков [1]. Одним из важных критериев оценки окислительного статуса клеток растений, является детекция АФК . Известно, что определенный уровень АФК необходим для лигнификации клеточных стенок, передачи стрессорного сигнала и формирования иммунного ответа, клеточного цикла, роста и развития растений, для процессов старения и программируемой гибели клеток [11,16,13,2]. Повышение содержания АФК в растениях в ответ на действие абиотических стрессоров отмечают в большом количестве исследований. При этом АФК рассматриваются одновременно как маркеры стрессового состояния и как сигнальные посредники, необходимые для развития адаптивного ответа [23,18]. Результат эффектов АФК как сигнальных посредников определяется не только их количеством, но и клеточной локализацией, взаимодействием с антиоксидантами, другими сигнальными молекулами и стрессовыми фитогормонами. Избыточное образование различных форм активного кислорода является причиной многих патологических состояний организма. Образование избытка АФК изменяет интенсивность экспрессии множества генов, ответственных за биосинтез, как белков, так и низкомолекулярных метаболитов, выполняющих, в том числе, и защитные функции.

Засоление, как и другие абиотические воздействия часто активируют сходные сигнальные пути и клеточные ответы, такие как, например, синтез стрессовых белков, синтез антиоксидантов [*25*] и накопление осмолитов [1].

В настоящее время большое внимание в агробиотехнологии и сельском хозяйстве в целом уделяется поиску новых эффективных регуляторов роста, способных обеспечить стабильно устойчивые урожаи, в том числе и в условиях абиотического стресса. Одним из наиболее перспективных направлений является применение препаратов на основе коротких пептидов [3,4]. Пептиды образуют обширную и многообразную сигнальную регуляторную систему. Короткие сигнальные пептиды играют существенную роль в различных аспектах роста и развитии растений. Они могут запускать или ингибировать самые различные генетические процессы и биохимические реакции в клетке. Например, эндогенные короткие пептиды семейства CLE (CLAVATA3/EMBRYO) участвуют в регуляции развития семян, образовании сосудов и латеральных корней, в проростании пыльцевых трубок, а также в поддержании гомеостаза стволовых клеток в апикальной и корневой меристемах проростков.

Известно, что тетрапептид AlaAspGluLeu стимулирует пролиферацию и функциональную активность основных клеточных структур тканевой культуры и оказывает трофическое и стабилизирующее действие на морфологическую сохранность и регенерацию дифференцированной ткани [3].

Ранее мы обнаружили, что экзогенные короткие пептиды влияют на рост, развитие и дифференцировку каллусной культуры табака *Nicotiana tabacum L.* [4]. Пептиды модулируют экспрессию генов семейств *KNOX* (KNOTTED-like homebox.1, факторы транскрипции), *GRF* (Grouth regulator factor, регуляторы факторов роста) и *CLE* (короткие эндогенные пептиды).

Целью данной работы явилось изучение действия короткого пептида AlaGluAspLeu на проростки и каллусную культуру табака *Nicotiana tabacum L.*, выращенных на питательной среде с добавление хлорида натрия.

Материалы и методы исследований

Объектом исследования служили семена и каллус табака *Nicotiana tabacum L.* сорта Samsun Sn-1.

Короткий тетрапептид AlaGluAspLeu был синтезирован в Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии.

Постановка эксперимента по выявлению эффекта действия AlaGluAspLeu на морфо-физиологические характеристики проростков табака.

Стерилизацию семян проводили в растворе 5% гипохлорита натрия в течение 15 мин с последующей 3-х кратной промывкой стерильной дистиллированной водой. Семена помещали на мостики из фильтровальной бумаги, помещенной в 50 мл водного раствора с добавлением: 1) 2 г/л NaCl; 2) 10^{-7}M AlaGluAspLeu; 3) 2 г/л NaCl и 10^{-7}M AlaGluAspLeu. В качестве контроля использовали дистиллированную воду. Растения культивировали в 120 мл - стеклянных контейнерах при температуре +24^{0}C при 5000 Лк. Анализировали 13-е суточные проростки табака.

Флуоресцентная микроскопия

Кончики корней 13- суточных проростков табака (4-5 мм) отделяли и помещали на предметные стекла в каплю воды не менее 5 шт. на стекло. Для прижизненной визуализации в клетках АФК использовали водный раствор Carboxy-H2DFFDA (Thermo Fisher Scientific, США) в концентрации 25-50 нМ, при этом время инкубации составляло 30 мин с последующей 3х-кратной промывкой в дистиллированной воде. Затем живые корешки помещали в экспериментальные растворы, указанные выше, без красителя.

Прижизненные препараты анализировали с использованием микроскопа Olympus BX51 (Япония), объектив х 10, при длине волны 490 нм. Изображения получали с помощью цифровой камеры Color Vien (Германия).

Постановка эксперимента по выявлению эффекта действия AlaGluAspLeu на морфо-физиологические характеристики каллусогенеза и регенерацию табака в культуре in vitro.

В качестве эксплантов были использованы семядольные листья 13-суточных проростков табака полученные *in vitro*. Культивацию проводили на агаризованной среде Мурасиге-Скуга (МС) [*20*]. с добавлением к ней следующих биологически активных веществ: 2 мг/л 6-бензиламинопурин (6-БАП) и 0,2 мг/л индолилуксусная кислота (ИУК). После прорастания семядоли помещали на питательную среду, содержащую гормоны с добавлением стерилизованного фильтрованием пептида AlaGluAspLeu в концентрации 10^{-7}M. Питательную среду готовили с добавлением: 1) NaCl (5,625 г/л); 2) AlaGluAspLeu (10^{-7}M); 3) AlaGluAspLeu (10^{-7}M) + NaCl (5,625 г/л), а также контроль без пептида. Данные концентрации как оптимальные для применения в культуре *in vitro* были выбраны по результатам предыдущих экспериментов [4].

Культивирование осуществляли в условиях световой комнаты при температуре 26^{0}C, для освещения использовали люминесцентные лампы (5000 Люкс), длительность фотопериода составляла 16 ч. Эксперимент проводили в течение 4-х недель в 4-х повторностях.

Статистическая обработка.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Microsoft Exel.

Результаты и обсуждение

Недавно было показано, что короткие экзогенные пептиды регулируют экспрессию генов [4]. Они модулируют экспрессию генов семейств *CLE*, кодирующих известные эндогенные регуляторные пептиды, генов *KNOX1* (гены факторов транскрипции) и *GRF* (гены - регуляторы факторов роста, кодирующие соответствующие

ДНК-связывающие белки, такие как топоизомеразы, нуклеазы и другие). Таким образом, было показано, что на уровне экспрессии генов у растений может существовать система пептидной регуляции образования известных более длинных пептидных регуляторов роста и развития [4]. Эти результаты позволяют предположить, что короткие пептиды могут оказывать значительное влияние на процессы формирования растений при действии абиотических факторов, в частности засоления. Для установления влияния AlaAspGluLeu на развитие проростков и каллусообразование растений табака при добавлении NaCl мы проанализировали эффекты данного тетрапептида на морфологические характеристики: 1) проростков - на длину корня и гипокотеля, уровень и локализацию АФК; 2) каллусов - на эффективность регенерации, количество регенерантов на эксплант и размеры листовых пластинок регенерантов.

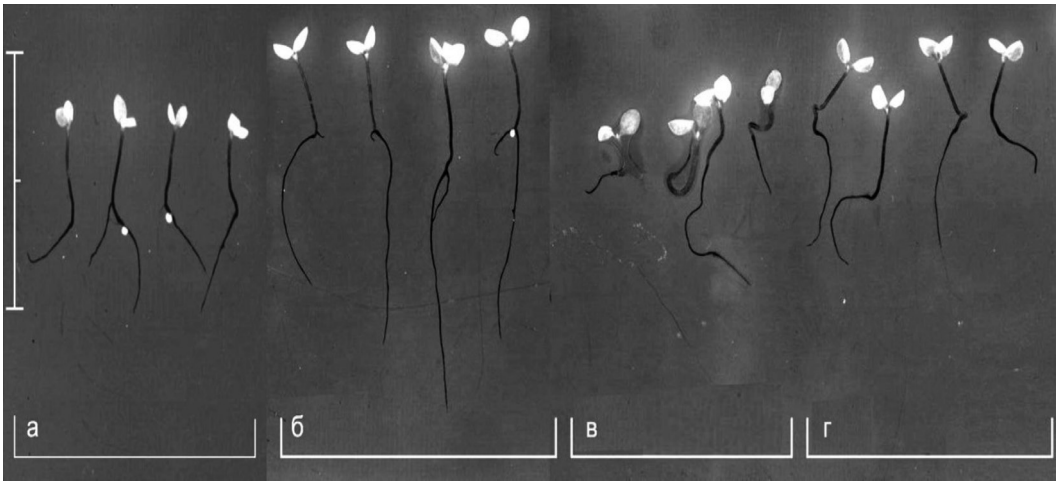

Рис. 1. Влияние NaCl и AlaAspGluLeu на развитие проростков табака Nicotiana tabacum L: Контроль (H_2O) – а, с добавлением 10^{-7}M AlaAspGluLeu – б, с добавлением 2 г/л NaCl – в, с добавлением 10^{-7}M AlaAspGluLeu+2 г/л NaCl – г. Масштабный отрезок 2 см

На 13 сутки проростки *Nicotiana tabacum* L. имели хорошо развитый корень, гипокотиль и два семядольных листа (рис.1.а). При добавлении 10^{-7}M AlaAspGluLeu проростки имели большую длину корня, гипокотиля и более развитые семядольные листья (рис. 1 б). В целом увеличивался размер растения по сравнению с контролем (рис.1 а, б.). Хлорид натрия в концентрации 2 г/л вызывал уменьшение общей длины проростка, искривление корня и гипокотиля в области перехода в корень, выражавшиеся в уменьшении длины как корня, так и надземной части проростка относительно контрольного варианта и варианта с добавлением 10^{-7}M AlaAspGluLeu (рис. 1 а, б, в,). У проростков, которые развивались в присутствии 10^{-7}M AlaAspGluLeu и 2 г/л NaCl, наблюдался изгиб гипокотиля в зоне перехода в корень, небольшая изогнутость корня (рис.1 г). При этом общая длина проростка была больше, чем в варианте с добавлением 2 г/л NaCl, контрольном варианте, но при этом меньше, чем в варианте с добавлением 10^{-7}M AlaAspGluLeu (рис.1 а, б, в, г,).

Таблица 1

Влияние NaCl и AlaAspGluLeu на развитие проростков растений табака

Вариант	Длина надземной части, мм	Длина корневой системы, мм
Контроль	7±2	9±2
AlaAspGluLeu	9±3	19±3
NaCl	5±1	7±2
AlaAspGluLeu+ NaCl	7±3	12±3

Таким образом, при анализе действия 2 г/л NaCl и 10^{-7}M AlaAspGluLeu, а также их сочетания (10^{-7}M AlaAspGluLeu+2 г/л NaCl) отмечалось изменение размеров проростков *Nicotiana tabacum* L. (рис. 1, табл. 1). 2 г/л NaCl оказывал ингибирующее действие на развитие проростков, заключавшееся в снижении длины проростков и изменении формы, т. е. в искривлении гипокотиля и корня (рис.1.а, в.). Влияние тетрапептида AlaAspGluLeu (10^{-7}M) вызывало увеличение общей длины проростков и надземной части растения по сравнению с контролем (рис.1 а, б.). При совместном воздействии AlaAspGluLeu (10^{-7}M) и 2 г/л NaCl отмечали защитное действие тетрапептида на рост и развитие проростков табака, при этом частично сохранялся эффект действия 2 г/л NaCl, выраженный в изменении формы гипокотиля в его нижней части (рис.1 в, г). В таблице 1 наглядно представлены результаты воздействия AlaAspGluLeu на корневую систему проростков *Nicotiana tabacum* L. Добавление к питательной среде МС AlaAspGluLeu увеличивает длину надземной части растений в 1,5 раза, а длину корней – больше, чем в 1,5-2 раза. Добавление NaCl ожидаемо угнетает рост как надземной части растений, так и корневой системы. А при взаимодействии AlaAspGluLeu с засоленной средой МС снижает чувствительность растений *Nicotiana tabacum* L. к засолению, что приводит к увеличению длины надземной части почти в 2 раза и длины корневой системы почти в 1,5 раза.

Таким образом, установлено, что тетрапептид вызывает значительное увеличение размера надземной и корневой системы (рис.1, табл.1), что может быть вызвано усилением пролиферативной активности, как было установлено ранее [3], индуцированной увеличением экспрессии генов, кодирующих факторы роста *GRF* [4], и/или усилением поглощения воды, связанным с действием соли [19] или гормональным эффектом [17].

Известно, что АФК выполняют как сигнальную, так и регуляторную функцию в клетках растений при засолении [12] Они образуются в различных компартментах клетки: в хлоропластах, митохондриях, пероксисомах, плазматической мембране, цитозоле, клеточной мембране [10]. Окрашивание корней табака сорта Самсун флуоресцентым красителем на АФК показало, что при засолении АФК детектируется во всех тканях корня (в контроле – единичные окрашенные клетки выявляются на поверхности корня), однако интенсивность окрашивания варьирует в клетках из разных зон. Так как не все зоны корней были одинаково окрашены на АФК, мы оценили распределение клеток с повышенным уровнем АФК в разных зонах корней путем совмещения изображений, снятых с помощью фазово-контрастной микроскопии и флуоресцентной меткой в одной фокальной плоскости (рис. 2).

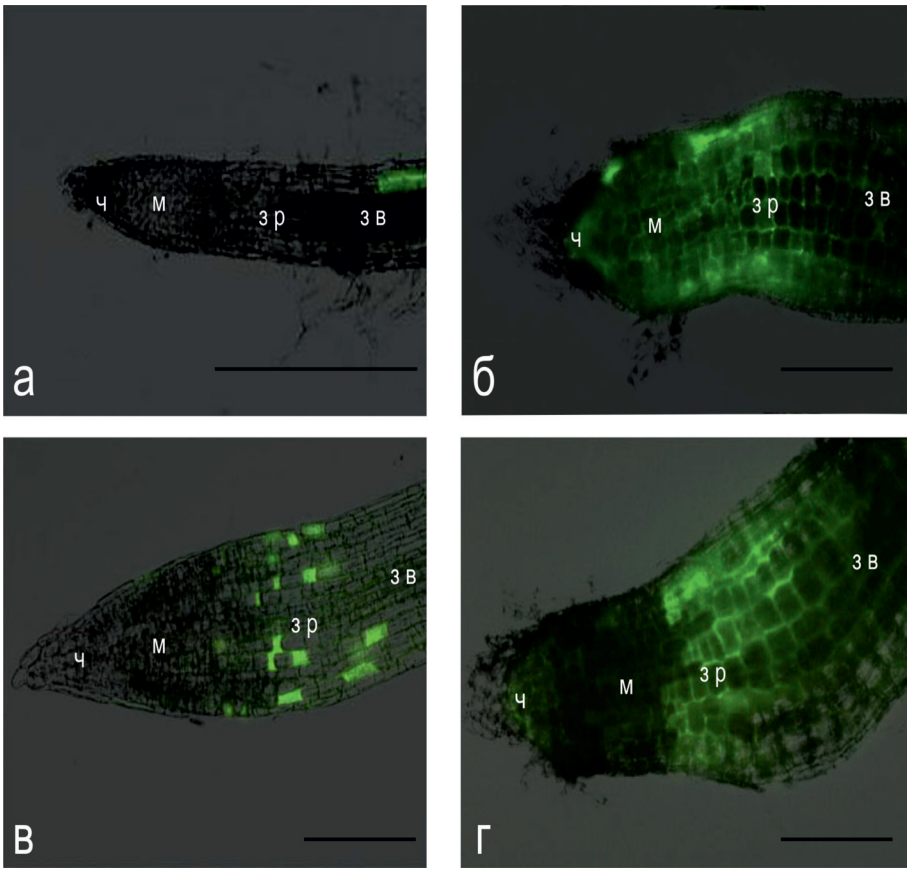

Рис. 2. Флуоресцентная микроскопия корней табака с маркером АФК Carboxy-H2DFFDA в клетках корня растений табака после инкубации с AlaAspGluLeu в присутствии NaCl (а – контроль, б – NaCl, в – AlaAspGluLeu, г – AlaAspGluLeu + NaCl). Масштабный отрезок 400 мкм. Зоны корня: корневой чехлик – ч; зона деления (меристема) – м; зона растяжения – з р; зона всасывания – з в

После инкубации с маркером АФК Carboxy-H2DFFDA, у контрольных растений табака наблюдали зоно-специфичное окрашивание корня. Так, в корневом чехлике, зоне деления и зоне растяжения краситель не идентифицировали. Окрашивание наблюдали в зоне всасывания. (рис. 2, 3). Причем, в этой зоне окрашивались клетки периферических тканей корня – эпидермы и коры, ткани центрального цилиндра почти не окрашивались (рис. 4).

При воздействии NaCl маркер АФК Carboxy-H2DFFDA наблюдали во всех зонах: в клетках чехлика, зоне деления, зоне растяжения и в зоне всасывания, причем более интенсивным окрашивание было в зоне растяжения, что указывает на повышение содержания в этих клетках/зонах уровня выработки АФК и активацию оксилительного стресса. Во всех остальных зонах окрашивание было примерно одинаковым (рис.2в, рис.3). В периферических тканях корня были ярко окрашены клетки коры, менее ярко – клетки эпидермы и совсем слабо - клетки центрального цилиндра (рис. 4)

После инкубации табака с AlaAspGluLeu, маркер АФК вообще не идентифицировали в клетках чехлика и зоне деления, небольшое флуоресценцентное свечение

наблюдалось в зонах растяжения и всасывания. (рис. 2 в, 3). Флуоресценция в этих зонах наиболее четко определялась в клетках эпидермы и в меньшей степени - клетках коры (рис. 4).

При воздействии NaCl с тетрапептидом AlaAspGluLeu маркер АФК накапливался во всех зонах, причем, наиболее яркое свечение наблюдается в области зоны растяжения (рис. 2. г). В зоне чехлика и зоне всасывания наблюдается менее интенсивное свечение, а в зоне деления свечение было минимальным (рис. 2г, 3). Более интенсивная флуоресценция периферических тканей корня была отмечена в коре и эпидерме и минимальная – в центральном цилиндре (рис. 4). Анализ распределения АФК-положительных клеток в корнях табака, которые инкубировали с AlaAspGluLeu и NaCl показал, что AlaAspGluLeu защищает зоны деления и растяжения от окислительного стресса, вызываемого засолением.

Таким образом, действие хлорида натрия на растения контрольного табака отличается от воздействия хлорида натрия в сочетании с AlaAspGluLeu. Отличительной особенностью при обработке хлоридом натрия в сочетании с AlaAspGluLeu является снижение доли клеток, окрашенных АФК, в зонах деления и растяжения корней табака. Так, если прямое воздействие хлорида натрия на клетки корня табака приводит к увеличению числа клеток, с повышенным содержанием АФК, в зонах деления и растяжения (в 12 и 18 раз соответственно), то в присутствии AlaAspGluLeu количество клеток, имеющих увеличенный пул АФК, в этих зонах увеличивается значительно меньше (в 6 и 3 раза соответственно). В зоне чехлика и в зоне всасывания корня табака как при хлориде натрия, так и при засолении с AlaAspGluLeu, количество клеток, окрашенных на АФК, примерно одинаково. Следовательно, применение AlaAspGluLeu при засолении повышает устойчивость к стрессовым условиям клеток зоны деления (меристема) и зоны всасывания (рис. 3). Действие AlaAspGluLeu при засолении на ткани корня табака показало, что наиболее защищенными являются клетки эпидермы, по сравнению с клетками коры.

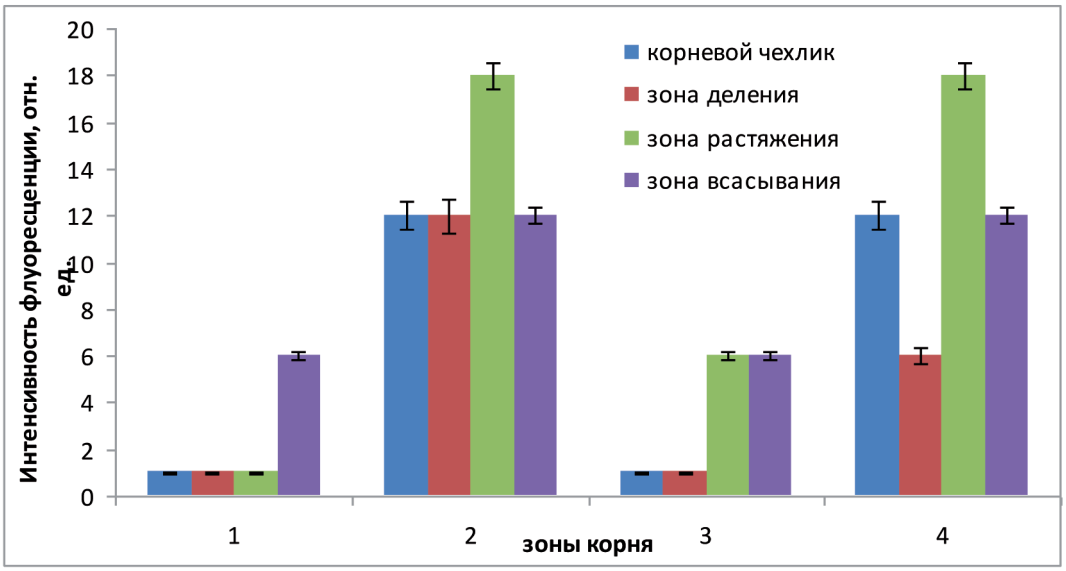

Рис. 3. Действие AlaAspGluLeu на клетки корневых зон табака, окрашенных на АФК (1 – контроль; 2- NaCl; 3 – AlaAspGluLeu; 4 – AlaAspGluLeu + NaCl)

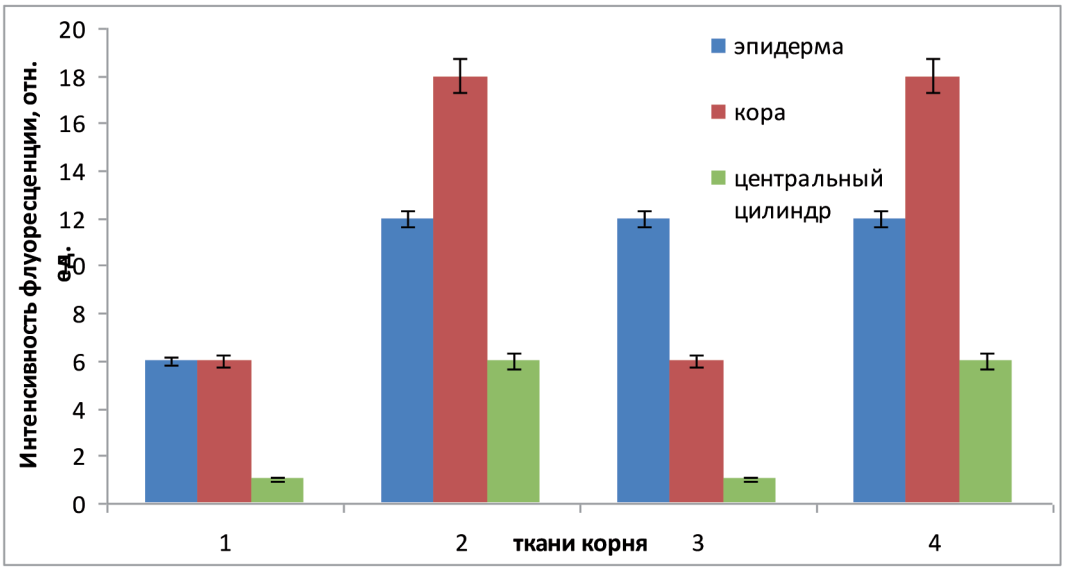

Рис. 4. Действие AlaAspGluLeu на клетки тканей корня табака, окрашенных на АФК (1 – контроль; 2- NaCl; 3 – AlaAspGluLeu; 4 – AlaAspGluLeu + NaCl)

Накопление флуоресцентного маркера АФК Carboxy-H2DFFDA в клетках корней при действии абиотических стрессовых факторов (в данном случае – засолении) указывает на то, что в данных клетках и тканях корней табака нарушается гомеостаз АФК, что может привести к запуску ПКГ. Следовательно, определение функционального состояния клеток с помощью прижизненных маркеров в дальнейшем может быть эффективно использовано для экспресс-оценки окислительного статуса клеток корней растений, выращиваемых под действием различных стрессовых факторов.

Полученные данные показывают, что при засолении, наиболее интенсивное окрашивание на АФК наблюдается в зоне растяжения. В то же время, по сравнению с контролем, повышение уровня АФК в наибольшей степени наблюдается в клетках коры, и меньшей степени – в зоне центрального цилиндра. Следовательно, для изучения влияния окислительного стресса, индуцированного засолением, более предпочтительными объектами являются клетки коры из зоны растяжения [2].

Каллус является традиционным объектом для выявления эффектов воздействия новых регуляторов роста на процессы развития, дифференциации, и регенерационной способности клеток морфогенных тканей растений [6]. В ходе исследования изучались такие показатели как скорость образования каллусной массы, количество регенерантов, скорость роста регенерантов, образование листовой системы у регенерантов в системе *in vitro*.

Для того чтобы охарактеризовать каллусы, использовали такие показатели как: плотность, окраску, обводненность и вес сырой каллусной массы. Через 3 недели после помещения экспланта на среду с добавлением NaCl и бронхогена проводилась оценка частоты каллусогенеза и морфологии образовавшихся каллусов по следующим показателям: цвет, текстура, величина, 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.

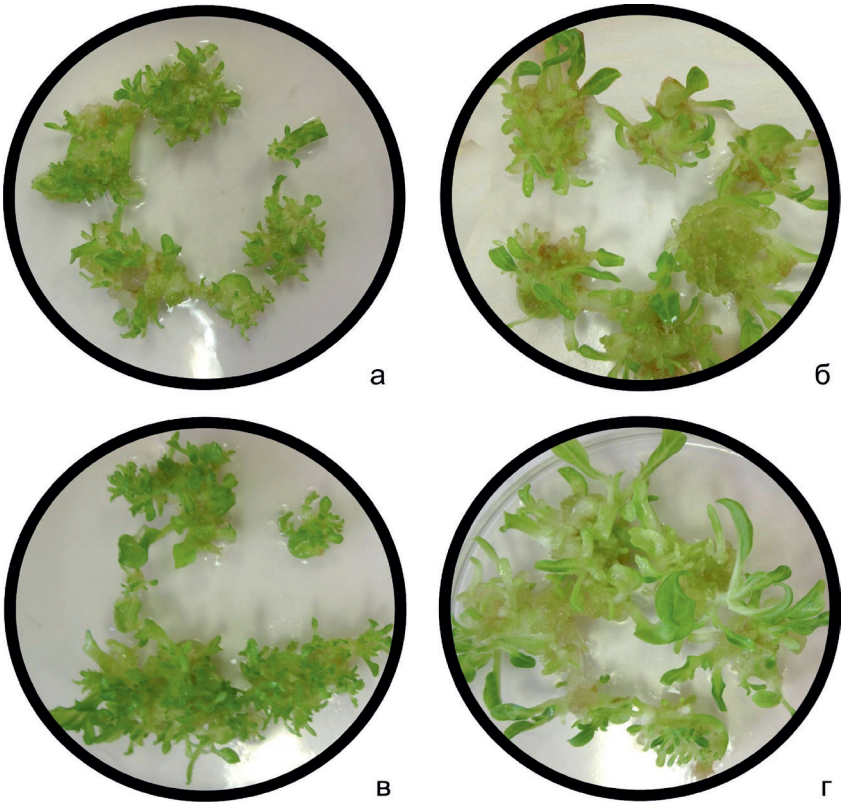

Рис. 5. Влияние AlaAspGluLeu на солеустойчивость растений на примере каллусогенеза табака Nicotiana tabacum L: Регенерация на среде МС в контрольном варианте – а, с добавлением NaCl– б, с добавлением AlaAspGluLeu – в, с добавлением AlaAspGluLeu+NaCl– г

На 4х-недельных эксплантах наблюдали образование больших очагов каллусной ткани с появлением множества мелких регенератнов (рис. 5 а). Добавление NaCl приводило к образованию рыхлого обводненного каллуса с крупными регенерантами (рис. 5. б, таб. 2). AlaAspGluLeu вызывал увеличение массы каллуса и увеличение числа регенерантов на 1 эксплант (рис. 5. в, таб. 2) Совместное действие NaCl и AlaAspGluLeu приводит к образованию каллуса с большим числом крупных регенерантов и значительному увеличению биомассы (рис. 5. в, таб. 2).

При выращивании растений табака на среде МС с применением AlaAspGluLeu наблюдаются существенное ускорение роста каллусов и увеличение каллусной массы по сравнению с контролем.

При добавлении NaCl в питательную среду МС наблюдалась более светлая, желтоватая окраска каллуса, он был более рыхлый и обводненный.

При воздействии AlaAspGluLeu на среду МС с добавлением NaCl было отмечено улучшение структуры каллуса и более интенсивное образование регенерантов.

Таблица 2

Влияние AlaAspGluLeu на рост каллусной массы и регенерационный потенциал табака

Вариант	Эффективность регенерации, %	Число регенерантов на эксплант, шт	Размер листа крупных регенерантов, мм	Размер листа мелких регенерантов, мм
Контроль	300	3,0	9,1±1	2,5±2
AlaAspGluLeu	667	6,7	23,5±2	6,5±5
NaCl	417	4,1	17,3±5	4,7±4
AlaAspGluLeu+ NaCl	750	7,5	27,6±6	4,6±3

Как видно из таблицы 2, добавление AlaAspGluLeu в питательную среду с NaCl приводит к увеличению не только количества регенерантов, но и биомассы в целом в 1,5-2 раза.

Каллус в контрольном варианте имеет более светлый окрас и его структура более рыхлая, чем в варианте с AlaAspGluLeu, и образование регенерантов проходило медленнее (рис. 5. а, в). NaCl вызывал незначительное снижение окраски регенерантов. При применении AlaAspGluLeu каллус имел более яркий зеленый окрас, был плотнее, регенерантов в этом варианте было в 2 раза больше (табл.2). Они были лучше сформированы, площадь листовых пластинок увеличивалась в 2 и более раза (рис. 5. в, табл. 2). Совместное действие NaCl и AlaAspGluLeu приводило к незначительному снижению интенсивности окрашивания фотосинтетической ткани, менее выраженное, чем в отсутствии AlaAspGluLeu (рис. 5. г).

Выявленные эффекты влияния AlaAspGluLeu свидетельствуют о том, что он способствует увеличению биомассы и регенерационного потенциала. Ранее было показано, что AlaAspGluLeu индуцирует увеличение экспрессии генов, кодирующих факторы роста *GRF* (данные Федореевой) и генов семейства *KNOX1*, отвечающих за дифференцировку регенерантов. Увеличение объема каллуса вероятно вызвано усилением поглощения воды связанным с действием соли (Munns, R, 2000) и гормональным эффектом (McCormick S. – 2006). Усиление интенсивности окраски регенерантов в присутствие AlaAspGluLeu вероятно связано с влиянием пептида на процессы формирования хлоропластов.

Заключение

AlaAspGluLeu способствует усилению роста растений в нормальных условиях и оказывает протекторное действие, снижая ингибирующие действие соли как на надземную часть растений, так и на корневую систему. Наблюдаемый эффект пептид оказывает в очень низкой концентрации 10^{-7}M, что позволяет предположить, что его действие сравнимо с регуляторным действием гормонов растений.

Применение пептида AlaAspGluLeu при засолении повышает устойчивость клеток зоны деления (меристема) и зоны всасывания к стрессовым условиям. Действие тетрапептида при засолении на ткани корня табака показало, что наиболее защищенными являются клетки эпидермы, по сравнению с клетками коры.

Вызываемое действием NaCl обводнение в клетках каллусной ткани и регенерантов в присутствие AlaAspGluLeu приводит к усиленному развитию регенерантов, увеличению листовой пластины и сохранению интенсивной зеленой окраски, свидетельствующей о протекторном действии на фотосинтетическую систему.

Таким образом, AlaAspGluLeu является эффективным регулятором роста растений, обладающим защитным действием при неблагоприятных абиотических воздействиях, в частности вызванных хлоридным засолением.

Работа выполнена по госзаданию 0574 2014 0003.

Выражаем благодарность академику РАН Хавинсону В.Х. за предоставленный пептид AlaGluAspLeu.

Библиографический список

1. *Баранова Е. Н., Гулевич А. А.* Проблемы и перспективы генноинженерного подхода в решении вопросов устойчивости растений к засолению (обзор) //Сельскохозяйственная биология. 2006. №. 1. С. 39-56.

2. *Колупаев Ю. Е.* Активные формы кислорода и стрессовый сигналинг у растений / Ю.Е. Колупаев, Ю.В. Карпец // Ukrainian biochemical journal. - 2014. - Vol.86. - № 4. - С. 18-35. .

3. *Монаселидзе Дж.Р., Хавинсон В.Х., Горгошидзе М.З., Хачидзе Д.Г., Ломидзе Э.М., Джохадзе Т.А., Лежава Т.А.* Влияние тетрапептида бронхогена (AlaAspGluLeu) на термостабильность ДНК // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2010. Т. 150, № 9

4. *Федореева 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.

5. *Харченко П.Н.* Проблемы агробиотехнологии. ФГБНУ «Росинформагротех», 2012. С.1 – 260.

6. *Arnao M. B., Hernández-Ruiz J.* Melatonin: plant growth regulator and/or biostimulator during stress? //Trends in plant science. – 2014. – Т. 19. – №. 12. – С. 789-797.

7. *Betsuyaku S., Sawa S., Yamada M.* The function of the CLE peptides in plant development plant microbe interactions // Arabidopsis book. 2011. №9. P.149.

8. *Cheesman S.E*. and Guillemin K. / We know you are in there: Conversing with the indigenous gut microbiota / S.E. Cheesman and K. Guillemin // Res. Microbiol. - 2007. – 158. – P. 2-9. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2006.10.005Get rights and content

9. *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.

10. *Foyer C.H.* Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications / C.H. Foyer, G. Noctor // Antioxid. Redox Signal. – 2009. – 11. – P. 861-906.

11. *Gechev T.S.* Reactive oxygen species as signals that modulate plant stresss responses and programmed cell death / T.S. Gechev // Bioessays. 2006. – Nov. - 28(11):1091-101. .

12. *Gibson S.W.,Todd C.D.* Arabidopsis AIR12 influences root development. Physiol Mol Biol Plants 2015 oct. 21(4): P.479-489.

13. *Grob S*. Characterization of chromosomal architecture in *Arabidopsis*by chromosome conformation capture licensee /S. Grob, M.W. Schmid, N.W Luedtke, T. Wicker, U. Grossniklaus // BioMed Central Ltd. 2013 *Genome Biology* – 2013. - **14**:R129

14. *Hojin Ryu and Yong-Gu Cho*. Plant Hormones in Salt Stress Tolerance // J. Plant Biol. 2015. 58:147-155.

15. *Jiménez V. M.* Involvement of plant hormones and plant growth regulators on in vitro somatic embryogenesis // Plant Growth Regulation. 2005. T. 47. №2-3. C. 91 – 110.

16. *Jimenez-Del-Rio M*. The bad, the good, and the ugly about oxidative stress / M. Jimenez-Del-Rio, C. Velez-Pardo // Oxidative medicine and cellular longevity. 2012. – 45. - P. 1-13. doi:10.1155/2012/163913

17. *McCormick S. D., Bradshaw D.* Hormonal control of salt and water balance in vertebrates //General and comparative endocrinology. – 2006. – T. 147. – №. 1. – C. 3-8.

18. *Mittler R*. ROS signaling: the new wave? / R. Mittler, S. Vanderauwera, N. Suzuki, G. Miller, V.B. Tognetti, K. Vandepoele, M. Gollery, V. Shulaev, F. Van Breusegem // Trends Plant Sci. – 2011. – 16. – P. 300-309.

19. *Munns,* R., Passioura, J. B., Guo, J., Chazen, O., & Cramer, G. R. (2000). Water relations and leaf expansion: importance of time scale. *Journal of Experimental Botany*, *51*(350), 1495-1504

20. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // Physiologia plantarum. 1962. T. 15. №. 3. C. 473 – 497.

21. *Murphy E., Smith S., De Smet I.* Small signallinig peptides in Arabidopsis development: how cells communicate over a shot distance // Plant Cell. 2012. №24. P. 3198 – 3217.

22. *Omidbakhsfar 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.

23. *Pucciariello C.* ROS signaling as common element in low oxygen and heat stresses / C. Pucciariello, V. Banti, P. Perata // Plant Physiol. Biochem. – 2012. – 59. – P. 3-10.

24. *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.

25. *Zhang W., Yu R.* /Molecular mechanism of stem cells in *Arabidopsis thaliana //* Pharmacogn. Rev. 2014. №8(16). P. 105 – 112..

PROTECTIVE EFFECT OF THE PEPTIDE ALAGLUASPLEU ON SPROUTS AND CALLUS CULTURE OF TOBACCO (*NICOTIANA TABACUM* L.), GROWN UNDER SALINE CONDITIONS

N.V. KONONENKO[1], YE.N. BARANOVA[1], T.A. DILOVAROVA[1], S.V. SMESOVA[1,2], R.V. KANAVSKIY[2], L.I. FEDOREYEVA[1]

([1] All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, Russian Academy of Sciences; [2] Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy)

At present scientists of agrobiotechnology and agriculture are searching for new effective growth regulators capable of ensuring stable and sustainable yields, especially under conditions of abiotic stress. Short peptides can possibly make a significant effect on the processes of plant formation under the action of abiotic factors, in particular, salinity. It has been shown that the tetrapeptide AlaAspGluLeu affects the development of seedlings and callus formation of tobacco plants with the NaCl addition. The following effects of AlaAspGluLeu on the morphological characteristics have been revealed: 1) for seedlings - the root and hypocotyl length, the ROS level and localization; 2) for calli - the regeneration efficiency, the number of regenerants per explant and the dimensions of leaf plates of regenerants. AlaAspGluLeu provides the growth of plant under normal conditions and has a protective effect by reducing the inhibitory effect of salt both on the

overground part of plants and on the root system. The observed effect of the peptide is found in a very low concentration of 10-7M, which suggests that its effect is similar to the regulatory effect of plant hormones. The use of the AlaAspGluLeu peptide in salinity increases the stress resistance of the meristem cells and the suction region. The effect of the tetrapeptide upon salinity on the root tissue of tobacco has shown that the epidermal cells are the most protected, as contrasted to the cortex cells. The turgid of callus tissue and regenerants caused by the action of NaCl with addition of AlaAspGluLeu results in the enhanced development of regenerant and an increase in the leaf plate. Also, the preservation of an intense green color indicates the protective effect on the photosynthetic system. It is proposed that AlaAspGluLeu is an effective regulator of plant growth, which has a protective effect in adverse abiotic factors, in particular, caused by chloride salinity.

Key words: plant growth regulators, callus, Nicotiana tabacum L., tobacco, saline stress, short peptides, active forms of oxygen.

References

1. *Baranova Ye. N., Gulevich A.A.* Problemy i perspektivy gennoinzhenernogo podkhoda v reshenii voprosov ustoychivosti rasteniy k zasoleniyu (obzor) [Problems and perspectives of the genetic engineering approach in solving the problems of plant resistance to salinity (review)] // Sel'skokhozyaystvennaya biologiya. 2006. No. 1. Pp. 39-56.

2. *Kolupayev Yu. Ye.* Aktivnyye formy kisloroda i stressovyy signaling u rasteniy [Active forms of oxygen and stress signaling in plants] / Yu.Ye. Kolupayev, Yu.V. Karpets // Ukrainian biochemical journal. - 2014. - Vol. 86. – No. 4. - Pp. 18-35.

3. *Monaselidze Dzh.R., Khavinson V.Kh., Gorgoshidze M.Z., Khachidze D.G., Lomidze E.M., Dzhokhadze T.A., Lezhava T.A.* Vliyaniye tetrapeptida bronkhogena (AlaAspGluLeu) na termostabil'nost' DNK [Influence of the bronchogen tetrapeptide (AlaAspGluLeu) on the thermostability of DNA] // Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny. 2010. Vol. 150, No. 9

4. *Fedoreyeva L.I., Dilovarova T.A., Ashapkin V.V., Martirosyan Yu.Ts. , Khavinson V.Kh., Kharchenko P.N., Vanyushin B.F.* Korotkiye ekzogennyye peptidy reguliruyut ekspressiyu genov CLE, KNOX1 i GRF u Nicotiana tabacum [Short exogenous peptides regulate the expression of CLE, KNOX1 and GRF genes in Nicotiana tabacum]. // Biokhimiya. 2017. No. 82. Pp. 700 – 709.

5. *Kharchenko P.N.* Problemy agrobiotekhnologii [Problems of agrobiotechnology]. FGBNU "Rosinformagrotekh", 2012. Pp.1 – 260.

6. *Arnao M. B., Hernández-Ruiz J.* Melatonin: plant growth regulator and/or biostimulator during stress? //Trends in plant science. – 2014. – Vol. 19. – No. 12. – Pp. 789-797.

7. *Betsuyaku S., Sawa S., Yamada M.* The function of the CLE peptides in plant development plant microbe interactions // Arabidopsis book. 2011. No. 9. P. 149.

8. *Cheesman S.E*. and Guillemin K. / We know you are in there: Conversing with the indigenous gut microbiota / S.E. Cheesman and K. Guillemin // Res. Microbiol. - 2007. – 158. – Pp. 2-9. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2006.10.005Get rights and content

9. *Czyzewicz N., Yue K., Beeckman T., De Smet I.* Message in bottle: small signalling peptides outputs during growth and development // J. Exp. Biol. 2013. No. 66. Pp. 5229 – 5243.

10. *Foyer C.H.* Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications / C.H. Foyer, G. Noctor // Antioxid. Redox Signal. – 2009. – 11. – Pp. 861-906.

11. *Gechev T.S.* Reactive oxygen species as signals that modulate plant stresss responses and programmed cell death / T.S. Gechev // Bioessays. 2006. – Nov. - 28(11):1091-101. *https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17041898.*

12. *Gibson S.W.,Todd C.D.* Arabidopsis AIR12 influences root development. Physiol Mol Biol Plants 2015 Oct. 21(4): Pp. 479-489.

13. *Grob S*. Characterization of chromosomal architecture in *Arabidopsis*by chromosome conformation capture licensee / S. Grob, M.W. Schmid, N.W Luedtke, T. Wicker, U. Grossniklaus // BioMed Central Ltd. 2013 *Genome Biology* – 2013. - **14**: R129

14. *Hojin Ryu and Yong-Gu Cho*. Plant Hormones in Salt Stress Tolerance // J. Plant Biol. 2015. 58:147-155.

15. *Jiménez V. M.* Involvement of plant hormones and plant growth regulators on in vitro somatic embryogenesis // Plant Growth Regulation. 2005. Vol. 47. No. 2-3. Pp. 91 – 110.

16. *Jimenez-Del-Rio M*. The bad, the good, and the ugly about oxidative stress / M. Jimenez-Del-Rio, C. Velez-Pardo // Oxidative medicine and cellular longevity. 2012. – 45. - Pp. 1-13. doi:10.1155/2012/163913

17. *Mittler R*. ROS signaling: the new wave? / R. Mittler, S. Vanderauwera, N. Suzuki, G. Miller, V.B. Tognetti, K. Vandepoele, M. Gollery, V. Shulaev, F. Van Breusegem // Trends Plant Sci. – 2011. – 16. – Pp. 300-309.

18. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // Physiologia plantarum. 1962. Vol. 15. No. 3. Pp. 473 – 497.

19. *Murphy E., Smith S., De Smet I.* Small signallinig peptides in Arabidopsis development: how cells communicate over a shot distance // Plant Cell. 2012. No. 24. Pp. 3198 – 3217.

20. *Omidbakhsfar 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. No. 8. Pp. 998 – 1010.

21. *Pucciariello C.* ROS signaling as common element in low oxygen and heat stresses / C. Pucciariello, V. Banti, P. Perata // Plant Physiol. Biochem. – 2012. – 59. – Pp. 3-10.

22. *Wang G., Zhang G., Wu M.* CLE peptide signaling and crosstalk with phytohormones and environmental stimuli // Frontiers in Plant science 2016. No. 6. Pp. 1211 – 1217.

23. *Zhang W., Yu R.* /Molecular mechanism of stem cells in *Arabidopsis thaliana //* Pharmacogn. Rev. 2014. No. 8(16). Pp. 105 – 112.

24. *Knight H., Knight M.R.* Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. //Trends Plant Sci. 2001. 6. Pp. 262 – 267.

25. *Zhu J.K.* Salt and drought stress signal transduction in plants. // Annu. Rev. Plant Biol. 2002. 53. Pp. 247 – 273.

Кононенко Неонила Васильевна – к. б. н., вед. науч. сотр. лаборатории клеточной биологии ФГБНУ «Всероссийский НИИ сельскохозяйственной биотехнологии» (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42; e-mail: nilava@mail.ru).

Баранова Екатерина Николаевна – к. б. н., вед. науч. сотр. лаборатории клеточной биологии ФГБНУ «Всероссийский НИИ сельскохозяйственной биотехнологии» (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42; e-mail: greenpro2007@rambler.ru).

Диловарова Татьяна Анатольевна – к. б. н., ст. науч. сотр. группы геномной модификации ФГБНУ «Всероссийский НИИ сельскохозяйственной биотехнологии» (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42; e-mail: dilovarova@yandex.ru.).

Смесова Светлана Викторовна – студ. **РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева** (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49); мл. науч. сотр. группы геномной

модификации ФГБНУ «Всероссийский НИИ сельскохозяйственной биотехнологии» (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42; e-mail: smesova.svetlana@mail.ru).

Канавский Роман Валерьевич – студ. **РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева** (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; e-mail: rkanav@yandex.ru).

Федореева Лариса Ивановна – д. б. н., вед. нау. сотр. группы геномной модификации ФГБНУ «Всероссийский НИИ сельскохозяйственной биотехнологии» (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42; e-mail: fedlara@inbox.ru).

Neonila V. Kononenko – PhD (Bio), Leading Researcher of the Laboratory of Cell Biology, All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology (127550 Timiryazevskaya Str., 42; e-mail: nilava@mail.ru).

Yekaterina N. Baranova – PhD (Bio), Leading Researcher of the Laboratory of Cell Biology, All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology (127550 Timiryazevskaya Str., 42; e-mail: greenpro2007@rambler.ru).

Tatyana A. Dilovarova – PhD (Bio), Senior Researcher of the Genomic Modification Group, All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology (127550 Timiryazevskaya str., 42; e-mail: dilovarova@yandex.ru).

Svetlana V. Smesova – student of Russian State Agrarian University - Timiryazev Moscow Timiryazev Agricultural Academy (127550, Moscow, Timiryazevskaya Str., 49); Junior Research Associate of the Genomic Modification Group, All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology (127550 Timiryazevskaya Str., 42; e-mail: smesova.svetlana@mail.ru).

Roman V. Kanavskiy – student of Russian State Agrarian University - Timiryazev Moscow Timiryazev Agricultural Academy (127550, Moscow, Timiryazevskaya Str., 49; e-mail: rkanav@yandex.ru).

Larisa I. Fedoreyeva – DSc (Bio), Senior Researcher of the Genomic Modification Group, All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology (127550 Timiryazevskaya Str., 42; e-mail: fedlara@inbox.ru).