

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра биохимии и биофизики

Работа выполнена на базе Учебно-научного центра
физико-химической биологии СГУ и ИБФРМ РАН

**ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА ЗОЛОТЫХ НАНОЧАСТИЦ И ЛПС БАКТЕРИЙ
AZOSPIRILLUM BRASILENSE НА БЕЛКОВЫЙ ПРОФИЛЬ ПОВЕРХНОСТИ
КЛЕТОК ПШЕНИЦЫ.**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 421 группы

направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

биологического факультета

Абдуллаевой Сабины Нияз кызы

Научный руководитель:

доцент кафедры биохимии и
биофизики, к.б.н.

А.А. Галицкая

подпись, дата

Научный консультант:

к.б.н., с.н.с. лаборатории
иммунохимии ИБФРМ РАН

Н.Ю. Селиванов

подпись, дата

Зав. кафедрой биохимии и
биофизики, д.б.н., профессор

С.А. Коннова

подпись, дата

Саратов, 2020

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Существенный прогресс в развитии нанотехнологий в последние годы привел к увеличению производства и широкому использованию наноматериалов (НМ) во многих областях применения. Этот замечательный прогресс неизбежно сопровождается риском выброса НМ в окружающую среду. В результате, они попадают в экосистему и могут создавать невидимую опасность для окружающей среды, путем взаимодействия с живыми организмами. Растения, как неотъемлемая часть экологической системы, могут быть потенциальной мишенью и переносчиком наноматериалов и введения их в пищевую цепь. Поэтому крайне важным является изучение влияния НМ на растения (включая их поглощение, транслокацию), а также их потенциальной токсичности.

В связи с этим, актуальными представляются исследования, которые посвящены воздействию наночастиц на растения, способам проникновения частиц в клетки, их последующей трансформации и удалению. При этом исследованиям биораспределения и токсичности наночастиц в клетках млекопитающих посвящено довольно большое количество работ, а взаимодействие наночастиц с клетками растений во многом является малоисследованной областью.

Цели и задачи исследования. Целью данной работы являлось исследование влияния абиогенных и биогенных эффекторов на состав полипептидов апопласта корней, как специфического компартмента, обеспечивающего водный транспорт, минеральное питание и метаболический обмен в растительном организме.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Исследовать влияние ЗНЧ на состав белков апопласта корней проростков пшеницы. Определить факторы, влияющие на проявление ответных реакций.

2. Исследовать влияние ЛПС ризосферных бактерий на состав белков апопласта корней проростков пшеницы.
3. Исследовать возможность выделения препаратов белков из апопласта каллусной культуры пшеницы.
4. Исследовать влияние ЛПС ризосферных бактерий на состав белков апопласта каллусной культуры пшеницы.

Структура бакалаврской работы: работа состоит из списка сокращений, введения, основной части, заключения, выводов и списка использованных источников. Литературный обзор написан с использованием 75 источников, в нём рассмотрены следующие вопросы: общая характеристика наночастиц и их влияние на растения, апопласта и его строение, общая характеристика бактерий рода *Azospirillum* и характеристика *Azospirillum brasilense*.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования. Основными объектами исследования являлись 14-и дневные каллусы двух изогенных линий гексаплоидной мягкой яровой пшеницы сорта Саратовская 29 и 5-12 дневные проростки пшеницы сортов Саратовская 29 и Саратовская 42.

Далее в разделе описаны основные методы, использованные в работе: приготовление питательных сред, предварительная обработка семян, культивирование проростков, выделение белков апопласта, электрофоретический анализ белкового спектра в полиакриламидном геле (ПААГЭ).

Результаты и обсуждение. В качестве основного абиогенного эффектора при анализе белкового спектра апопласта корней и листьев был использован раствор ЗНЧ размером 15 нм, который способен вызывать биохимические эффекты на этапе прорастания зерна злаковых и изменять рост и развитие суспензионной культуры *Arabidopsis thaliana* (L.). Биогенным эффектором являлся водный раствор ЛПС 50мкг/мл *A. brasilense*

SR 65 имеющий структуру аналогичную *A. brasilense* SR 65 – штамма, выделенного из ризосферы пшеницы сорта Саратовская 40.

Выделение белков апопласта проводили с использованием 50 мМ TRIS-HCl буфера pH 7,0 в присутствии 0,5 М сахарозы с последующим дробным центрифугированием. Условия центрифугирования подбирались дополнительно для максимального извлечения белков из апопласта при сохранении целостности клеток. Для сопоставления полипептидного состава корней и листьев, а также оценки целостности клеток тканей, приготовили образец экстракта листьев. Результаты электрофоретического анализа приведены на рисунке 1.



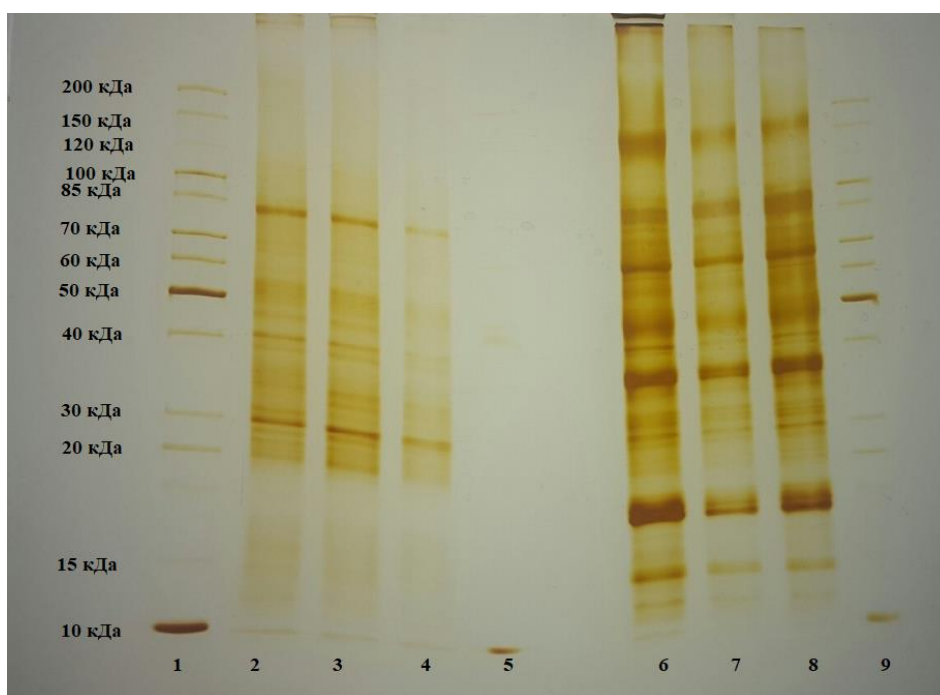
1-апопласт корней, полученный при 1000 g; 2-апопласт корней, полученный при 2000 g; 3-стандарт молекулярных масс (4 мкл); 4-экстракт листьев; 5-апопласт листьев, полученный при 1000 g; 6-апопласт листьев, полученный при 2000 g; 7-стандарт (2 мкл).

Рисунок 1 — Влияние условий выделения на полноту извлечения полипептидов апопласта проростков пшеницы

Результаты электрофоретического показывают, что комплексный полипептидный состав корней и листьев отличается, но они оба кардинально отличаются от спектра белков тотального экстракта листьев.

На втором этапе был проведен анализ изменения спектра полипептидов апопласта растений в присутствии ЗНЧ. Растения выдерживали 24 часа в

присутствии 25 мл ЗНЧ (30 мг/л), затем выращивали в течение 12 суток на среде Мурасиге и Скуга. Результат электрофоретического анализа белков образцов апопластов представлен на рисунке 2.



1-стандарты молекулярных масс (4 мкл); 2-апопласт корней (контроль); 3-апопласт корней растений, выросших в присутствии ЗНЧ, полученный при 1000 г; 4- апопласт корней растений, выросших в присутствии ЗНЧ, полученный при 2000 г; 5-стандарт молекулярных масс (2 мкл); 6-апопласт листьев (контроль); 7-апопласт листьев растений, выращенных в присутствии ЗНЧ, полученный при 1000 г; 8-апопласт листьев растений, выращенных в присутствии ЗНЧ, полученный при 2000 г; 9- стандарты молекулярных масс (3 мкл).

Рисунок 2 — Изменение полипептидного спектра апопласта проростков пшеница под влиянием ЗНЧ

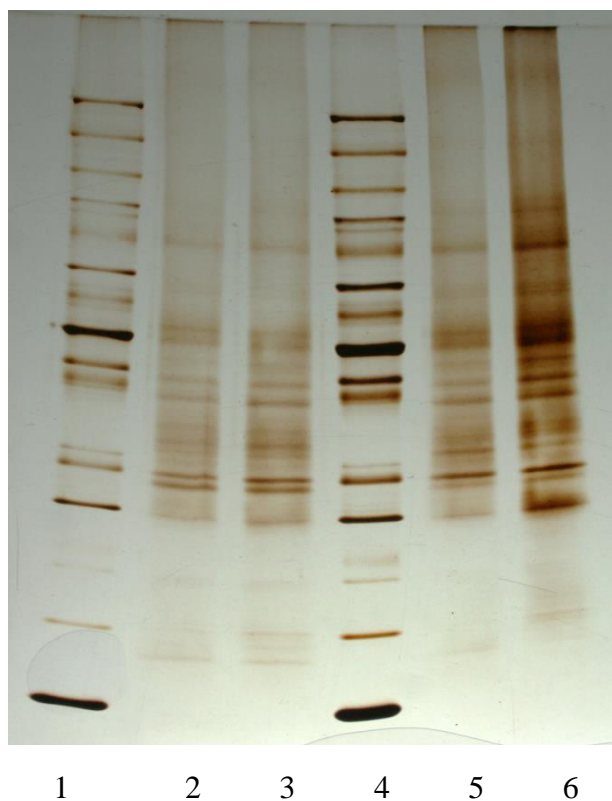
Результаты анализа показывают, что в апопласте корней, выращенных на ЗНЧ, можно наблюдать изменение состава полипептидов в зоне 30-35кДа. В частности, появляются новые полипептиды и уменьшается содержание белка, присутствующего в контроле. Важно отметить, что общее содержание полипептидов также уменьшается. Выявленные изменения набора белков в апопластах как корней, так и листьев носят слабовыраженный скорее количественный характер. Было выдвинуто предположение, что для проявления эффекта воздействия ЗНЧ требуется более длительное воздействие. Также ограничивающим фактором может выступать возраст проростков, определяющий степень дифференцировки паренхимы —

основной области формирования апопласта, проницаемости кортекса корней и процентное соотношение кортекса и всасывающей зоны корневых волосков.

Для более детального исследования роли этих факторов были проведены дополнительные исследования на более молодых проростках и с увеличенным временем обработки корней препаратом ЗНЧ до 48 часов. Также анализ был проведен на двух сортах яровой мягкой пшеницы Саратовская 29 и Саратовская 42, различающихся временем создания и селекционными характеристиками.

При этом были выявлены различия в морфометрических характеристиках проростков после обработки. Результат электрофоретического анализа показал (рисунок 3), что в целом, в контрольных условиях, состав белков апопласта корней пшениц двух сортов консервативен, присутствуют только незначительные различия полипептидов в области 30-35 кДа. Вместе с тем, обнаружено, обработка ЗНЧ в течение 48 ч вызывает накопление низкомолекулярных белков с молекулярной массой 12-16 кДа в апопласте корней обоих сортов пшеницы. Мы не располагаем данными по идентификации выявленных белков, однако, как следует из литературных данных, именно в этой области молекулярных масс локализуются металлотионеины – низкомолекулярные белки богатые цистеином, способные связывать и детоксифицировать ионы тяжелых металлов. Исходя из условий эксперимента можно предположить, что препарат наночастиц выступает в данном случае как фактор, действующий аналогично ионам тяжелых металлов и индуцирующий похожую ответную защитную реакцию.

На следующем этапе работы, мы постарались выяснить насколько специфичной является ответная реакция поверхности растительных клеток на ЗНЧ. Для этого было проведено исследование изменения состава белков апопласта в ответ на воздействие препарата ЛПС ризосферных бактерий

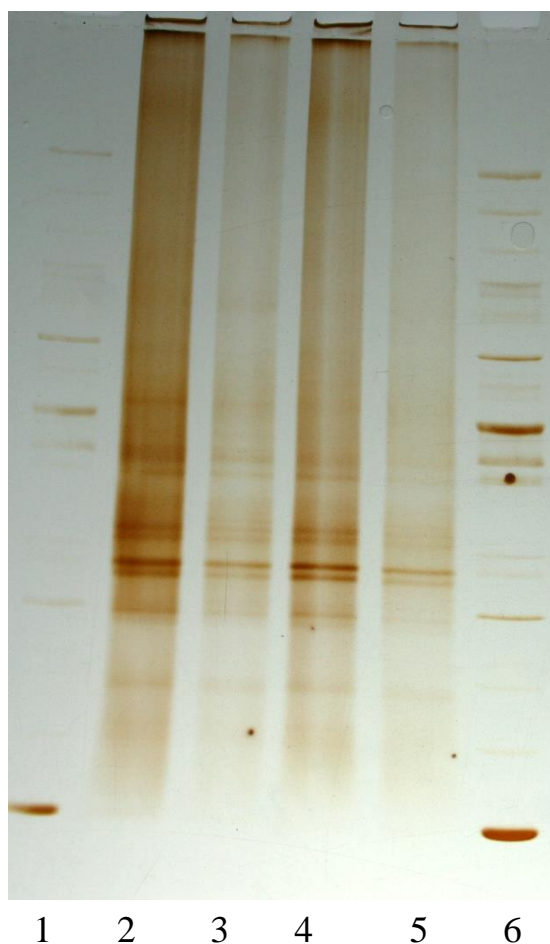


1-стандарты молекулярных масс (4 мкл); 2-апопласт корней растений пшеницы Саратовская 42 (контроль); 3-апопласт корней растений пшеницы Саратовская 42, выросших в присутствии ЗНЧ, полученный при 2000 g; 4-стандарты молекулярных масс (5 мкл); 5- апопласт корней растений пшеницы Саратовская 29 (контроль); 6-апопласт корней растений пшеницы Саратовская 29, выросших в присутствии ЗНЧ, полученный при 2000 g;

Рисунок 3 – Влияние 48 часовой инкубации с ЗНЧ на состав белков апопласта 7 суточных проростков пшеницы сортов Саратовская 29 и Саратовская 42

A. brasilense SR 65, который рассматривался нами в данном случае как пример биогенного воздействия. Проростки обрабатывали препаратом ЛПС в концентрации 50 мкг/мл (что в 5 раз превышает описанную в литературе минимальную концентрацию) при 24 часовой экспозиции.

Результат электрофоретического анализа белков апопласта корней проростков пшеницы приведен на рисунке 4.



1-стандарты молекулярных масс (3 мкл); 2-апопласт корней растений пшеницы Саратовская 29 (контроль); 3-апопласт корней растений пшеницы Саратовская 29, выросших в присутствии ЛПС, полученный при 2000 г; 5- апопласт корней растений пшеницы Саратовская 42 (контроль); 6-апопласт корней растений пшеницы Саратовская 42, выросших в присутствии ЛПС, полученный при 2000 г; 7- стандарты молекулярных масс (5 мкл).

Рисунок 4 – Влияние 24 часовой инкубации с ЛПС на состав белков апопласта корней 12 суточных проростков пшеницы сортов Саратовская 29 и Саратовская 42

По данным электрофоретического анализа выявлено снижение общего содержания белков в апопласте корней. При этом, как и в случае обработки проростков ЗНЧ, практически отсутствуют качественные и количественные изменения в содержании полипептидов по сравнению с контролем. Полученные данные позволяют предположить, что препарат ЛПС ризосферной бактерии *A. brasilense* SR 65 распознается как биогенный эффектор, но не вызывает специфических ответных реакций на уровне протеома апопласта. Однако снижение общего содержания белка в апопласте

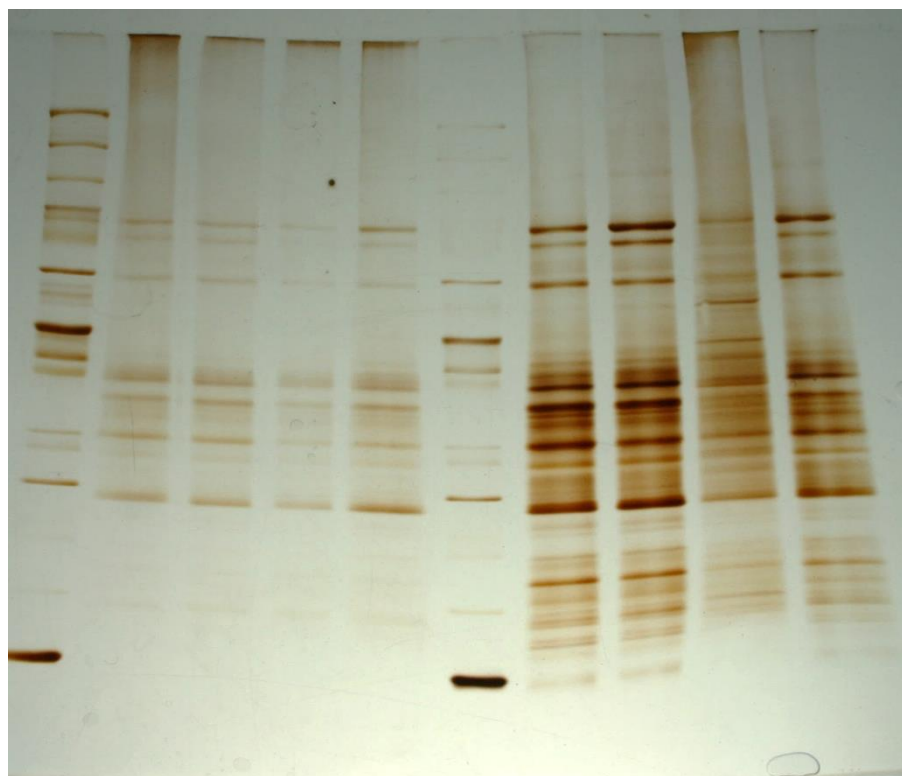
носит схожий характер с ранними этапами действия повышенных концентраций абсцизовой кислоты – стрессового гормона растений.

Для контроля чувствительности растительного биотеста проведено исследование влияния препарата ЛПС на состав белков поверхности клеток и белков апопласта в каллусной культуре пшеницы Саратовская 29. По литературным данным, каллусные культуры различных растений способны формировать специфические ответные реакции на различные компоненты фитопатогенных микроорганизмов.

В процессе эксперимента каллусы стерильно инкубировали в 12-и луночном планшете в среде с добавлением препарата ЛПС 50мкг/мл в течении 24-26 часов. Затем среду отбирали для анализа белков поверхности, а каллусы обрабатывали изотоническим буфером для выделения апопласта. После выравнивания образцов по количеству белка был проведен электрофоретический анализ полипептидного спектра апопластов каллусных культур, результаты представлены на рисунке 5.

Данные электрофоретического анализа показали высокое сходство спектров белков поверхности каллусов и белков апопласта выделенных центрифугированием из межклетников каллусной ткани. Важно отметить, что концентрация и общее содержание белка в препаратах апопласта в несколько раз выше. Анализ показал, что в контрольных образцах состав белков апопласта каллусов различных линий пшеницы Саратовская 29. Показано что в присутствии ЛПС снижается общая концентрация белка в препаратах апопластов каллуса. Также присутствуют качественные изменения состава белков апопласта что особенно выражено на каллусах линии 4 в образце 9 (рисунок 5). Каллусы именно этой линии при культивировании на среде спонтанно инициируют ризогенез – формирование корнеподобных ризоидов. Этот факт очень важен для понимания проявления эффекта действия ЛПС в каллусной культуре в присутствии высоких концентраций фитогормонов. Возможно, именно изменение количества зон

вторичной дифференциации лежит в основе различий белковых спектров апопластов каллуса.



1

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

1-стандарты молекулярных масс (4 мкл); 2-белки поверхности каллуса линии 4 (контроль); 3- белки поверхности каллуса линии 5 (контроль); 4- белки поверхности каллуса линии 4 + 24 часа ЛПС 50мкг/мл; 5- белки поверхности каллуса линии 5 + 24 часа ЛПС 50мкг/мл; 6-стандарт молекулярных масс (2 мкл); 7- белки апопласта каллуса линии 4 (**контроль**), выделенных в присутствии 0,1% ДОХ при 1000 g; 8- белки апопласта каллуса линии 5 (**контроль**), выделенных в присутствии 0,1% мДОХ при 1000 g; 9- белки апопласта каллуса линии 4, + 24 часа ЛПС 50мкг/мл, выделенных в присутствии 0,1% мДОХ при 1000 g; 10- белки апопласта каллуса линии 5, + 24 часа ЛПС 50мкг/мл, выделенных в присутствии 0,1% мДОХ при 1000 g;

Рисунок 5 — Влияние 24 часовой инкубации с ЛПС на состав белков поверхности и апопласта каллуса двух изогенных линий пшеницы Саратовская 29

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты позволяют провести сравнение особенностей протекания межклеточных реакций растительных тканей, выявленных для

абиотического эффектора – ЗНЧ и для биогенного эффектора – бактериального ЛПС. В обоих вариантах эффект выражается в формировании изменений в апопласте – обособленном компартменте растительных тканей – при сочетании компетентности ткани: временной (онтогенетической) и функциональной, а также доступности поверхности растительной клетки (наличии зон всасывания или слабо дифференцированных клеток).

ВЫВОДЫ:

1. Показано, что 48-мичасовое культивирование 7-мисуточных проростков пшеницы в присутствии 30мкг/мл золотых наночастиц размером 15нм вызывает накопление в апопласте корней низкомолекулярных белков с молекулярной массой 12-16 кДа, при этом отмечается уменьшение общего содержания белка в апопластах корней и листьев. Выявленный эффект зависит от возраста проростков и времени обработки.
2. Обработка 12-тидневных проростков пшеницы препаратом липополисахарида азоспирилы вызывает снижение общего содержания белков в апопласте корней, но качественные и количественные изменения в содержании полипептидов отсутствуют.
3. Впервые показана возможность выделения препаратов белков апопласта из каллусной культуры пшеницы.
4. Показано, что в присутствии ЛПС происходят качественные изменения состава белков апопласта в каллусах пшеницы, что особенно выражено в линиях с высоким морфогенным потенциалом, также снижается общая концентрация белка в препаратах апопластов каллуса.