

# Ауксин-зависимая регуляция гомеостаза ROS в культурах клеток *Rubia cordifolia* L, экспрессирующих *rolA* агропинового типа

Соломатина Т.О.<sup>1</sup>, Веремейчик Г.Н.<sup>1</sup>, Горпенченко Т.Ю.<sup>1</sup>, Григорчук В.П.<sup>1</sup>, Чернодед Г.К.<sup>1</sup>, Булгаков В.П.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФНЦ Биоразнообразие ДВО РАН, Владивосток, Россия

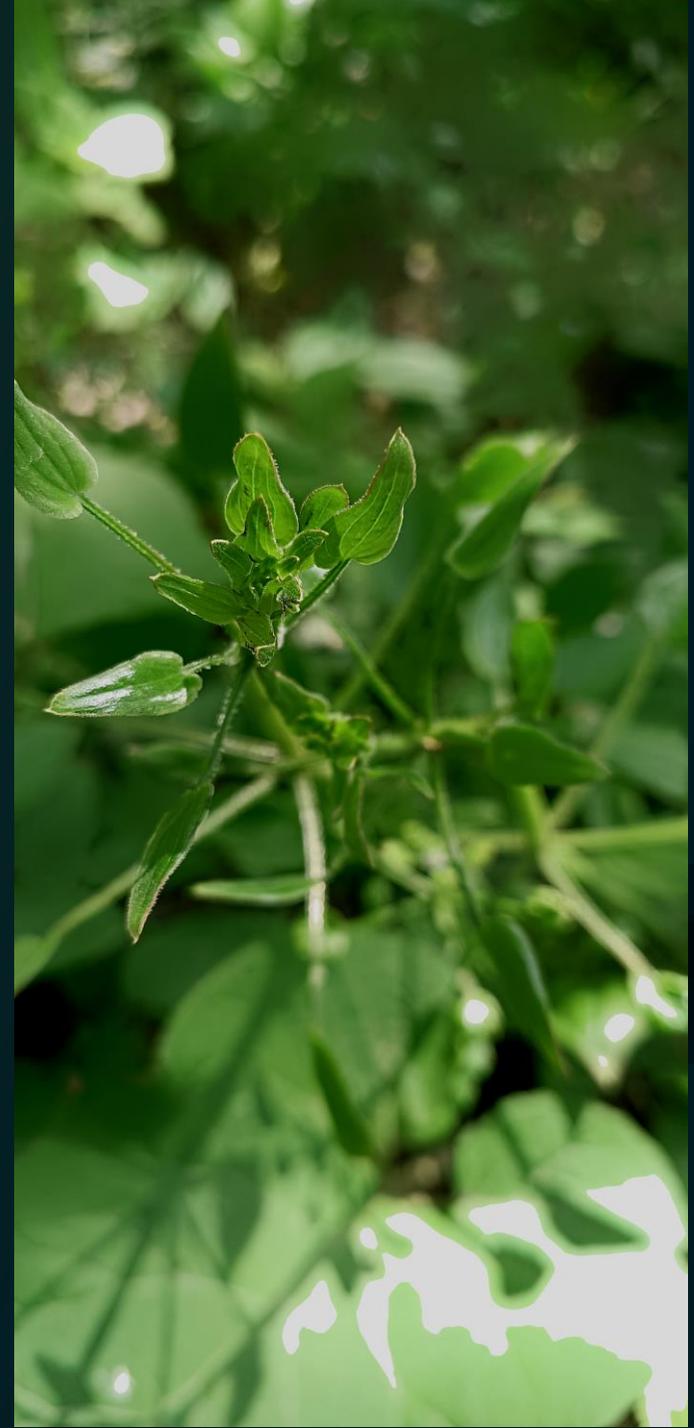
**Цель исследования** – изучение ауксин-зависимой регуляции гомеостаза ROS в культурах клеток *Rubia cordifolia* L, экспрессирующих *rolA* агропинового типа.

Таким образом, ставятся **следующие задачи**:

- Выяснить возможную причину изменения вторичного метаболизма в долговременно культивируемой линии трансгенной клеточной культуры *R. Cordifolia*
- Изучить влияние индивидуальной экспрессии гена *rolA* на гомеостаз ROS



Финансовая поддержка была предоставлена Российским научным фондом, грант № 23-24-00215.



## Материалы и методы

1. Методы классической биотехнологии растений

2. Современные стандартизированные методы молекулярной биологии

3. Спектрофотометрия анализ активности нативного белка пероксидаз

4. Протеомный анализ двумерный гель-электрофорез и масс-спектрометрия MALDI

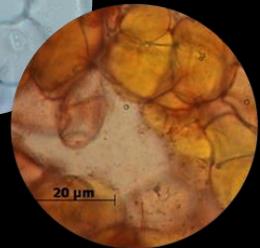
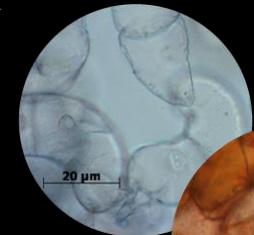
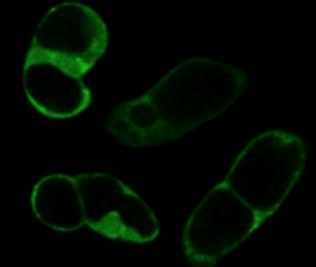
5. Конфокальная и электронная микроскопия визуализация АФК в клетках

6. Статистическая обработка данных велась общепринятыми методами *t*-теста, ANOVA, Post hoc анализа.

получение и культивирование нормальных и трансгенных клеточных культур и растений

ПЦР, ПЦР-РВ, клонирование, рестрикция, электрофорез нуклеиновых кислот

анализ жизнеспособности клеток



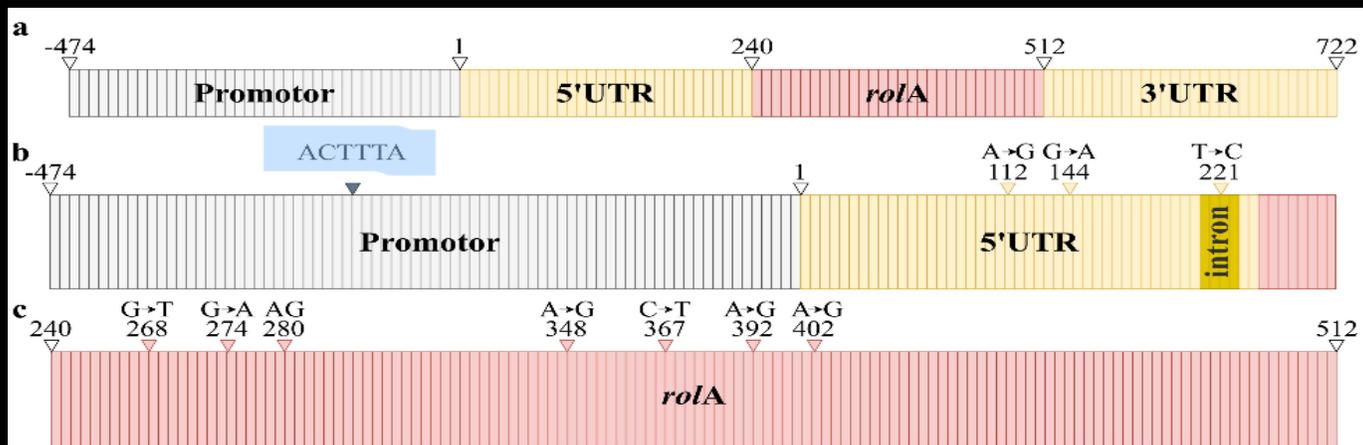


Рис. 1

Идентификация SNPs в гене *rolA* у длительно культивируемых трансгенных каллусов *R. cordifolia*  
Нативный мотив b

Обнаружен консервативный мотив ACTTTA для факторов транскрипции, опосредованных ауксинами

	1	240	512	722
<i>RolA</i> -WT	5'UTR	<i>rolA</i> -CDS	3'UTR	
<i>RolA</i> -MU1	5'UTR	<i>rolA</i> -CDS	3'UTR	
		112A→G		
<i>RolA</i> -MU2	5'UTR	<i>rolA</i> -CDS	3'UTR	
		144G→A		
<i>RolA</i> -MU3	5'UTR	<i>rolA</i> -CDS	3'UTR	
		221T→C		
<i>RolA</i> -MC123	5'UTR	<i>rolA</i> -CDS	3'UTR	
		280A→G 348A→G 403A→G		
<i>RolA</i> -MC4	5'UTR	<i>rolA</i> -CDS	3'UTR	
		392A→G		
<i>RolA</i> -MC5	5'UTR	<i>rolA</i> -CDS	3'UTR	
		268G→T		
<i>RolA</i> -MC6	5'UTR	<i>rolA</i> -CDS	3'UTR	
		274G→A		
<i>RolA</i> -MC7	5'UTR	<i>rolA</i> -CDS	3'UTR	
		367C→T		

Рис. 2

Мутации, обнаруженные на ДНК 2024 года

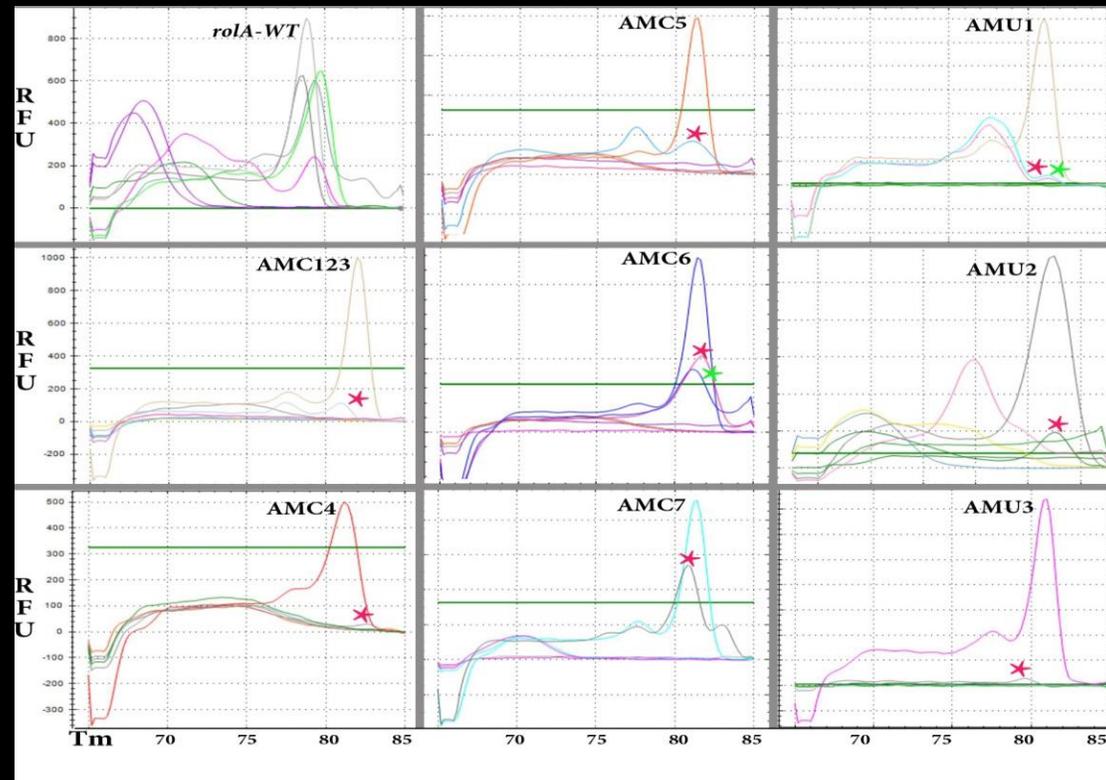


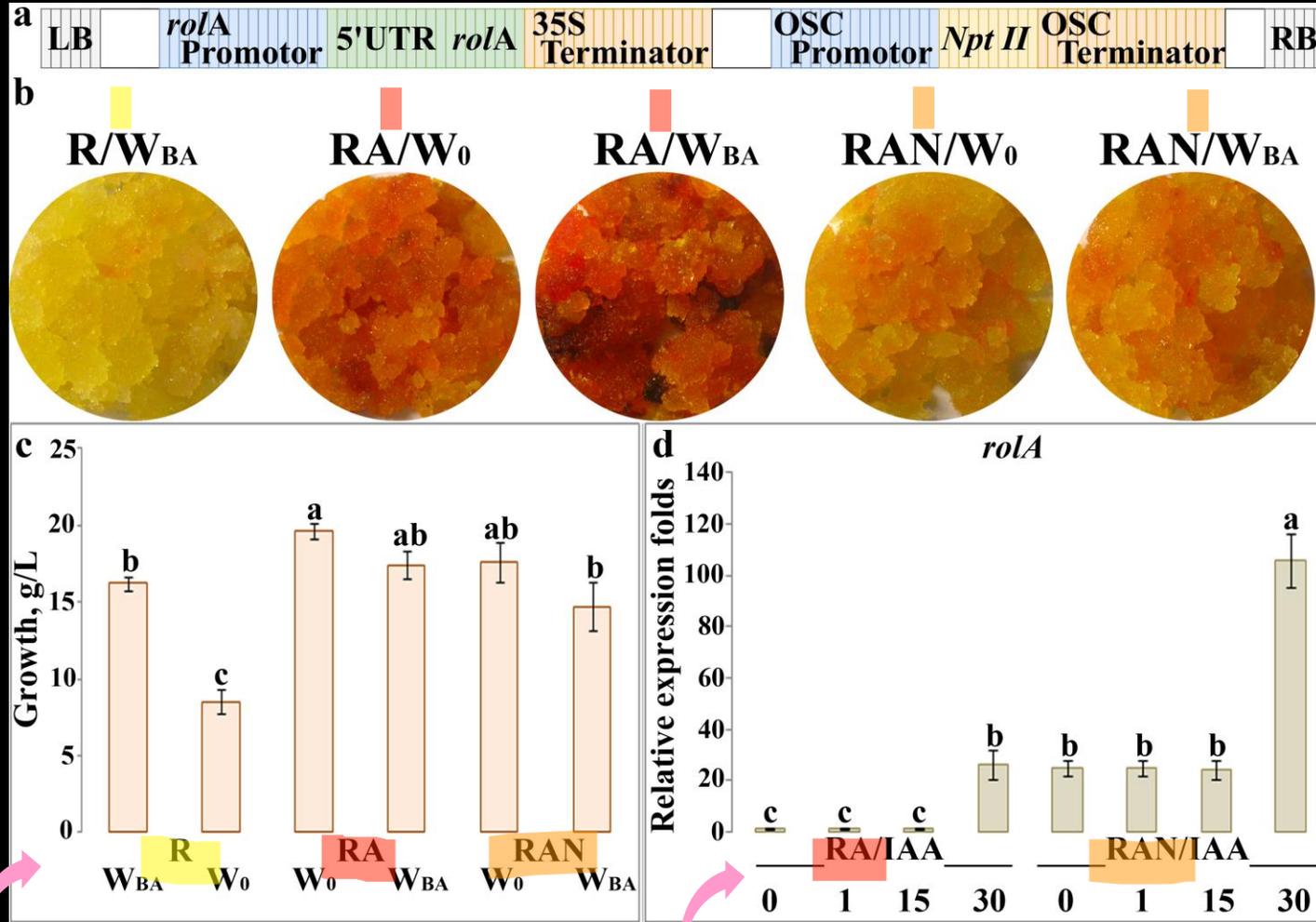
Рис. 3

Анализ уровня экспрессии обнаруженных мутаций

Рис. 4

Получение и сравнительный анализ новой *rolA*-трансформированной каллусной культуры *R. cordifolia*.

генетическая конструкция: Т-ДНК часть вектора pPZP



ФЕНОТИПЫ

R - контрольная культура клеток, стабильно растущая на среде W/BA;  
 RA и RAN - *rolA*-трансформированные культуры клеток, стабильно растущие на средах W<sub>0</sub> и W/BA (с экзогенными регуляторами роста IAA), соответственно.

длительно культивируемая линия (RA)

вновь полученная (RAN)

рост (г/л)

экспрессия гена *rolA*

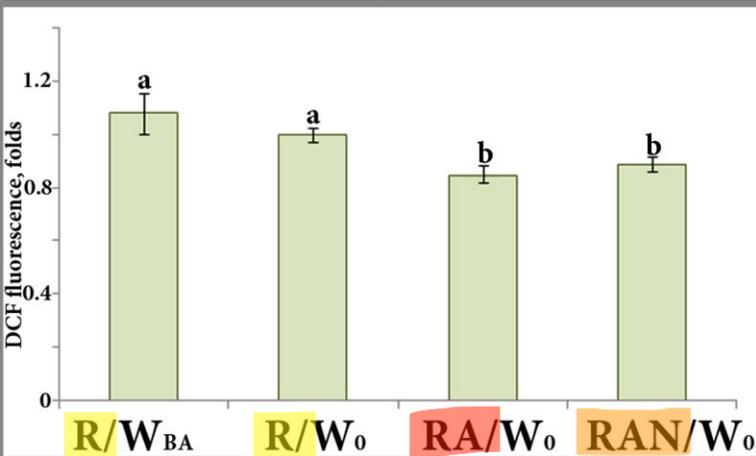
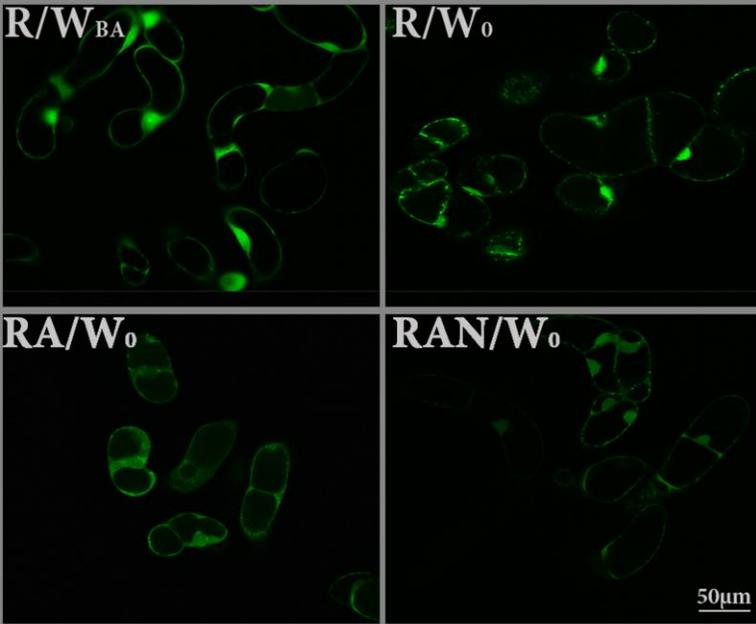


Рис. 5

Накопление ROS в клетках *R. cordifolia* измеряли с помощью конфокальной микроскопии (а) и флуоресценции DCF (б).

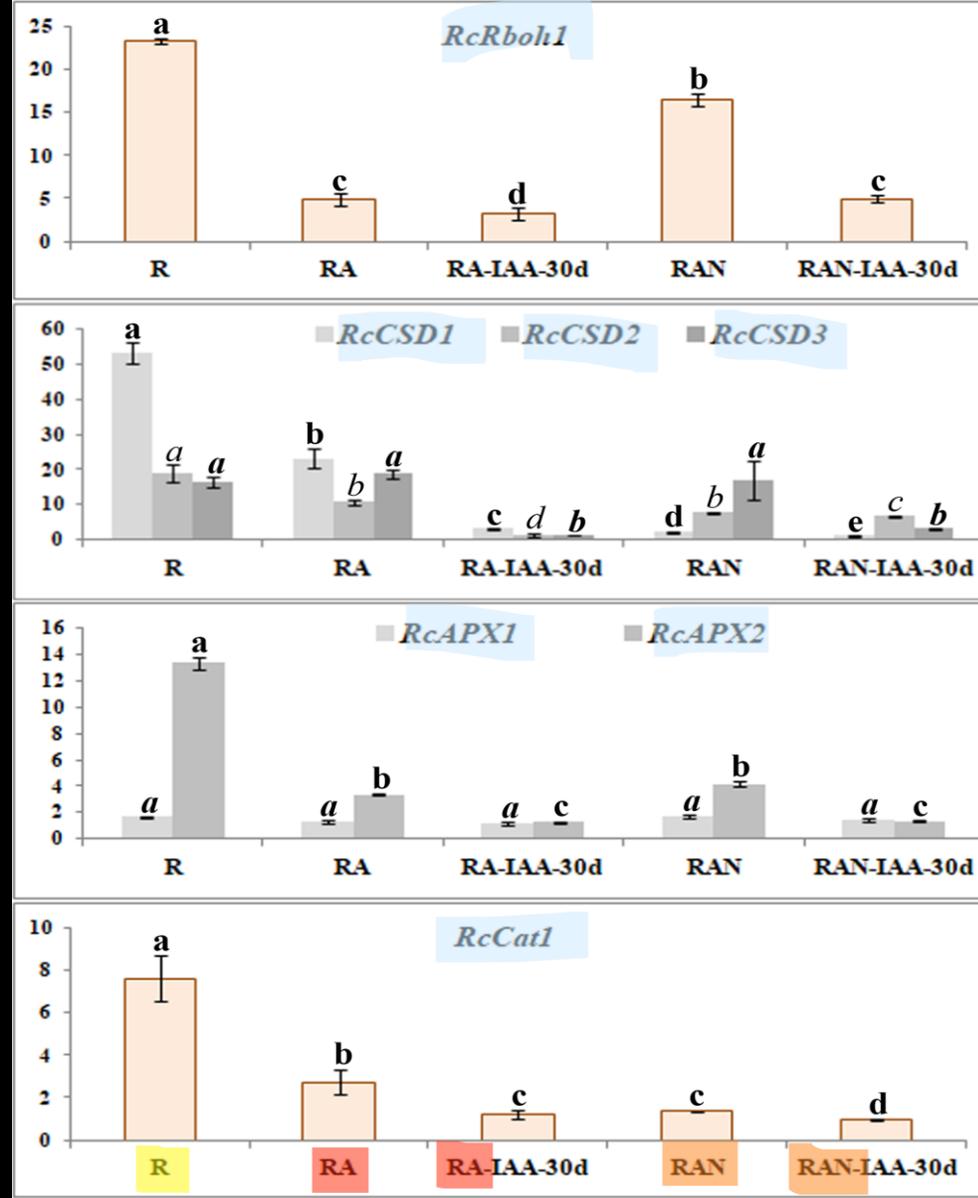
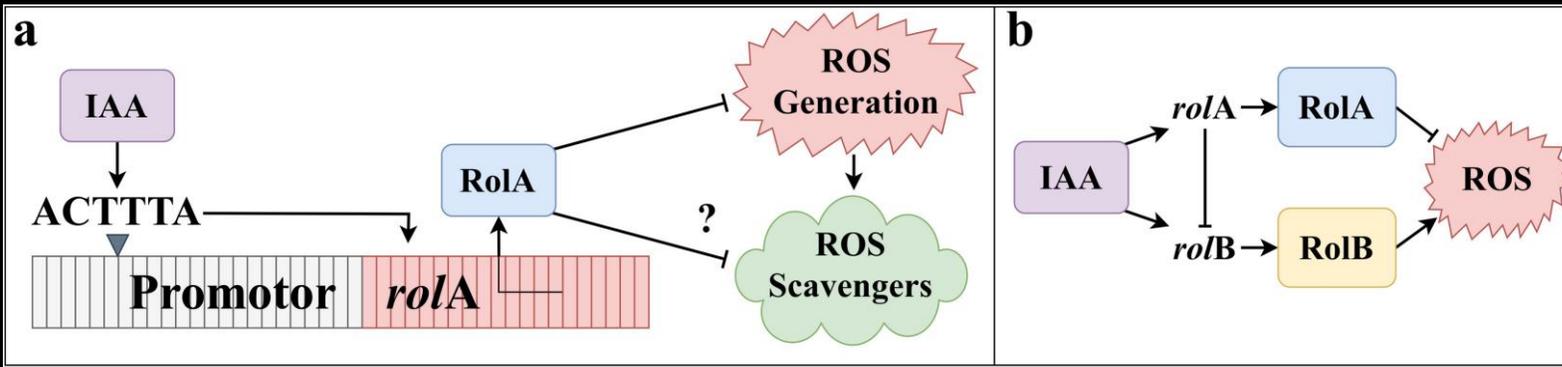


Рис. 6

Экспрессия генов ферментов метаболизма ROS в контрольных и rolA-трансформированных каллусных культурах *R. cordifolia*.

R - контрольная культура клеток, стабильно растущая на среде W/BA и выращиваемая на среде W0 в течение одного пассажа; многолетняя (RA) и вновь полученная (RAN)

представлены уровни мРНК, измеренные методом ПЦР в реальном времени, и представлены в виде относительной экспрессии гена Rboh и генов, кодирующих антиоксидантные ферменты.



Упрощенная модель, предполагающая возможный ауксин-зависимый механизм действия *rolA*-опосредованного гена *rolB*.

IAA (ауксин) индуцирует экспрессию гена *rolA*, что сопровождается снижением экспрессии генов, кодирующих ферменты системы метаболизма ROS.

## ВЫВОДЫ

- Мы проанализировали SNPs в 5'UTR и кодирующей области гена *rolA*. Эти мутации не затрагивают известные функционально значимые аминокислоты белка RolA.
- В промоторе гена *rolA* был обнаружен консервативный мотив ACTTTA для факторов транскрипции, опосредованных ауксинами.
- Была продемонстрирована сильная зависимость экспрессии гена *rolA* от ауксинов с использованием двух отдельных культур клеток.
- Зафиксировано снижение уровня экспрессии генов, участвующих в метаболизме ROS в ответ на ауксин-опосредованное увеличение экспрессии гена *rolA*.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Было сделано два предположения:

- Длительное культивирование клеточной культуры может приводить к изменению её гормонального состояния с течением времени, что может модулировать действие белка RolA. Кроме того, ауксин-зависимая экспрессия гена *rolA* приводит к снижению метаболизма ROS.
- Антагонистическое взаимодействие между *rolA* и *rolB* предотвращает сильную *rolB*-индуцированную чувствительность к ауксину и окислительные всплески, чтобы сбалансировать состояние клеток.