СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ „СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ”
БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА БИОХИМИЯ

Любен Иванов Загорчев

Биохимични промени в състава и структурата на клетъчна стена на ембриогенни калусни култури от *Dactylis glomerata* L. третирани с NaCl

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“
професионално направление 4.3. Биологически науки
докторска програма Биохимия

София, 2012 г.

СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ „СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ”
БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА БИОХИМИЯ

Любен Иванов Загорчев

Биохимични промени в състава и структурата на клетъчна стена на ембриогенни калусни култури от *Dactylis glomerata* L. третирани с NaCl

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

Научен ръководител: доц. д-р Мариела Оджакова

Рецензенти: проф. дбн Диана Петкова
доц. д-р Тренка Аргирова

на дисертация за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“
професионално направление 4.3. Биологически науки
докторска програма Биохимия

Дисертацията е написана на 100 страници и включва 34 фигури и 6 таблици. Списъкът на цитираната литература съдържа 227 литературни източника.

Изследванията са проведени в лабораторията по растителна молекулярна биология на катедра Биохимия към Биологически факултет на Софийски Университет "Св. Климент Охридски", в лабораторията по растителна биохимия, Университета Уестминстър, Лондон, в Протеомния център в Университета на Съсекс, Брайтън и в Милениум Сийд Банк, Кралски ботанически градини Кю, Уейкхърст Плейс.

Дисертантът работи като асистент към катедра Биохимия, Биологически факултет, СУ.

Дисертационният труд е финансиран по следните научни проекти и програми:

Към МОМН:
1. ВУ-Б-203/06 Биохимични промени в състава и структурата на клетъчната стена на стресирани с NaCl калусни култури от *Dactylis glomerata* L.
Към ЕСФ:
1. BG051PO 001-3.3.04/58 "Младите учени – потенциал за развитие на науката и технологиите в областта на молекулярната биология"
Към СУ:
1. 164/2009 Влияние на абиотичен стрес върху въглехидратния метаболизъм на суспензионните клетъчни култури от *Dactylis glomerata* L.
2. 080/2007 Изолиране и характеристика на арабиногалактанови белтъци (AGPs) от адаптирани към NaCl ембриогенни клетъчни култури на *Dactylis glomerata* L.

Международни програми и фондове:
1. COST Action FA0901 "Putting Halophytes to Work - From Genes to Ecosystems"
2. The Department for Environment, Food and Rural Affairs (DEFRA), UK
3. The Erasmus Programme (EuRopean Community Action Scheme for the Mobility of University Students)

Дисертационният труд е обсъден и одобрен за защита на разширен катедрен съвет на Катедра Биохимия на Биологически факултет на СУ "Св. Климент Охридски", проведен на 27.06.2012 г.

Използвани съкращения:

На белтъци:

AE – ацетилестерази
AGP – арабиногалактанови белтъци
BSA – говежди серумен албумин
FLA – фасцилин-подобни арабиногалактанови белтъци
HRGP – хидроксипролин богати белтъци
HSP – heat shock proteins
JIM – Джон Инс моноклонални антитела
LEA – late embryogenesis abundant proteins
PME – пектинметил естерази
SAPK – стрес-активирана протеин киназа
SERK – рецепторна киназа на соматичната ембриогенеза
SOS – солево свръх-чувстителни кинази
WAK – кинази, асоциирани с клетъчната стена

Реактиви:

APS – амониев персулфат
BCA – бицинконинова киселина
DAB – диаминобензидин
DMSO – диметил сулфоксид
DTT – дитиотреитол
EDTA – етилендиамино-тетраоцетна киселина
FITC – флуоресцеин изотиоцианат
IAA – йодоацетамид
MES – 2- (N-морфолино) етансулфонова киселина
PBS – phosphate buffered saline
pI – изоелектрична точка
p-NPP – пара-нитрофенилфосфат
SDS – натриев додецилфосфат
TEMED – N,N,N',N'-тетраметилетилендиамид
TFA – трифлуорооцетна киселина
TRIS – трис (хидроксиметил) аминометан

Други:

ANOVA – анализ на вариации между групи
CySS – цистин, цистеин-дисулфид
DM – dry mass, сухо тегло
FM – fresh mass, свежо тегло
GPI – гликозилфосфатидил инозитол
GSH – глутатион, γ-глутамил-цистеинил-глицин
GSSG – окислен глутатион, глутатион дисулфид
IEF – изоелектрично фокусиране
PAGE – полиакриламидна гел електрофореза
SH – хранителна среда Шенк и Хилдебранд
АБК – абсцисиева киселина
ДНК – дезоксирибонуклеинови киселини
$E_{disulphide/2\ thiol}$ (където disulphide/ 2 thiol може да е GSSG/ 2 GSH или CySS/ 2 Cys) – окислително-редукционен потенциал на нискомолекулни тиоли и съответстващите им дисулфиди
ПЕМ – проембриогенни маси
РНК – рибонуклеинови киселини

1. Увод

Процесът на соматична ембриогенеза е уникален за растителните клетки. При него от соматична клетка след редиференциация се формира ембриоид, от който в етапи, сходни с тези при зиготната ембриогенеза може да регенерира цяло растение. Този процес е предпоставка за развитие на съвременните биотехнологии, а също така и атрактивна моделна система за изследване на генната експресия по време на развитието и диференциацията на растенията. Установени са редица гени, които променят експресията си в различните етапи на соматичната ембриогенеза, както и редица белтъци, за които се предполага участие в този процес. Част от тях са широко използвани като молекулни маркери за ембриогенен потенциал. Точните механизми, които направляват процеса и факторите, които насочват определени клетки към реализиране на ембриогенния им потенциал все още не са известни. Редица автори приемат, че първоначалният, механичен стрес от разрязване на експлантите при поставянето им на хранителна среда при *in vitro* култивиране е необходимо условие за отключване на ембриогенния потенциал. В последствие е установено, че различни абиотични стресови фактори също имат стимулиращо соматичната ембриогенеза действие.

Абиотичният стрес при растения е един от основните фактори, ограничаващи добива от културни видове и представляват сериозен проблем пред съвременното земеделие. Сред най-разпространените типове стрес, които се разглеждат в съвременната литература е солевият стрес. На база на чувствителността си към него растенията се разделят на халофити и гликофити, като по-голямата част, в това число и културните видове, се определят като солево-чувствителни (гликофити). Разбирането на механизмите на отговор и адаптация към солевия стрес е предпоставка за развитие на

растителната биология в бъдеще с акцент върху по-успешно усвояване на земеделските площи и по-високи добиви. Растителните организми имат няколко нива на отговор на солевия стрес, сред които са механизми за ограничаване на загубата на вътреклетъчна вода, механизми за освобождаване от йоните в излишък, основно на натриевите йони, запазване на флуидитета на мембраните и неутрализиране на реактивните кислородни видове, чиято свръх-продукция често съпътства абиотичния стрес.

Сред най-малко изследваните клетъчни компартменти по отношение на отговора на солеви стрес се нарежда растителната клетъчна стена. Тази първоначална бариера беше разглеждана като ригидна структура, която просто ограничава растителните клетки в пространството и ги предпазва механично от околни въздействие. С развитието на растителната биология и прилагането на съвременни методики стана ясно, че растителната клетъчна стена е динамична, фино-регулирана система от въглехидратни и белтъчни компоненти, която първа възприема влиянията на околната среда и отговаря бързо и ефективно на абиотичните стресови фактори. Същевременно нейните компоненти са от огромно значение и за процесите на растеж и развитие при растителните организми. Изследването на белтъчните й компоненти е силно затруднено поради редица фактори— сравнително ниско белтъчно съдържание спрямо другите клетъчни компоненти, голяма степен на посттранслационни модификации и особено гликозилиране, както и затруднения в изолиране на чиста фракция от белтъци на клетъчната стена. Механизмите, чрез които клетъчната стена възприема абиотичните стресови фактори, както и голяма част от промените, настъпващи в белтъчния й състав в отговор на стрес и при различни етапи на развитие и соматична ембриогенеза са неизвестни.

Все по-голяма част от изследванията на отговора на абиотичен стрес в съвременната литература се насочват към едносемеделните растителни видове, основно от семейство Житни. Към тях принадлежат по-голямата част от културните видове. Разбирането на механизмите на стресова адаптация и процеса на соматична ембриогенеза при тях са предпоставка за подобряване на земеделските практики и постигане на ефективно производство на хранителни продукти в условията на засолени или слабо-напоявани почви и експоненциално-увеличаващата се необходимост от храна за растящото население на Земята.

В настоящия дисертационен труд са изследвани някои от основните класове белтъци на клетъчната стена при ембриогенни суспензионни култури на представителя на семейство Житни— *Dactylis glomerata* L. Проследени са промените, които настъпват в тяхната активност и локализация във връзка с отговора на солеви стрес и реализиране на ембриогенния потенциал. Изследвани са и редица ниско-молекулни съединения, които да дадат информация за физиологичния статус на културите по време на култивиране при различни солеви концентрации, както и в различни етапи на соматичната ембриогенеза.

2. Цел и задачи

Целта на настоящата докторска дисертация е да се изследва влиянието на солевия стрес върху състава и структурата на клетъчната стена на ембриогенни суспензионни клетъчни култури на *Dactylis glomerata* L. и да се установи взаимовръзката между това влияние и процеса на соматична ембриогенеза.

За постигане на тази цел си поставихме следните по-важни задачи:

1. Оценка на влиянието на солевия стрес върху физиологичния статус на културите и процеса на соматична ембриогенеза.

1.1. Определяне на растежа и формирането на соматични ембриоиди в суспензионни култури под влияние на солевия стрес.

1.2. Количествено определяне на промените в концентрациите на някои по-важни осмопротектанти и антиоксиданти под влияние на солевото третиране и връзката им със соматичната ембриогенеза.

2.2. Селекция на моноклонални антитела срещу белтъци, потенциално свързани със соматичната ембриогенеза и идентифициране на тези белтъци.

2. Изолиране и сравнителен анализ на белтъци от клетъчна стена и от хранителната среда на солево-третираните култури.

2.1. Сравнителен анализ на белтъчния профил на фракции от клетъчната стена и хранителната среда на солево-третирани култури и установяване на белтъци, потенциално имащи отношение към процеса на соматична ембриогенеза.

3. Охарактеризиране на промени, които настъпват в някои основни класове апопластни белтъци под влияние на солевия стрес и в процеса на соматична ембриогенеза.

3.1. Влияние на солевия стрес върху количеството и локализацията на хидроксипролин богати белтъци в клетъчната стена.

3.2. Влияние на солевия стрес върху модифициращи клетъчната стена белтъци – експанзини и естерази.

3. Материали и методи

Експериментален обект на настоящия дисертационен труд са *in vitro* тъканни култури на *Dactylis glomerata* L. от високо-ембриогенния генотип Embryogen – P, Orchardgrass Germplasm, Per.no.GP-2, PI 543748 (Conger and Hanning, 1991), третирани с 0.085 и 0.17 M NaCl.

За изпълнение на поставените задачи бяха използвани редица методични подходи:

- Инициация и подържане на *in vitro* култури
- HPLC анализ на токохроманоли
- HPLC анализ на ниско-молекулни тиолни съединения
- Определяне на окислително-редукционния потенциал на тиолни съединения по уравнение на Нернст
- Спектрофотометрично определяне на L-пролин
- Сравнителен анализ на белтъци от клетъчна стена и от хранителната среда посредством 2D-E
- Получаване на моноклонални антитела чрез фагов дисплей
- Изолиране на пречистен антиген срещу имобилизирано антитяло
- Масспектрометричен анализ на пречистения антиген
- Анализ на активността на експанзини чрез turbidity assay
- Количествено определяне на арабиногалактанови белтъци
- Имуноблот и имунофлуоресцентен анализ на арабиногалактанови белтъци
- Зимограмен анализ на ацетилестерази и пектинметилестерази
- Статистически анализ – ANOVA и Student’s T-test

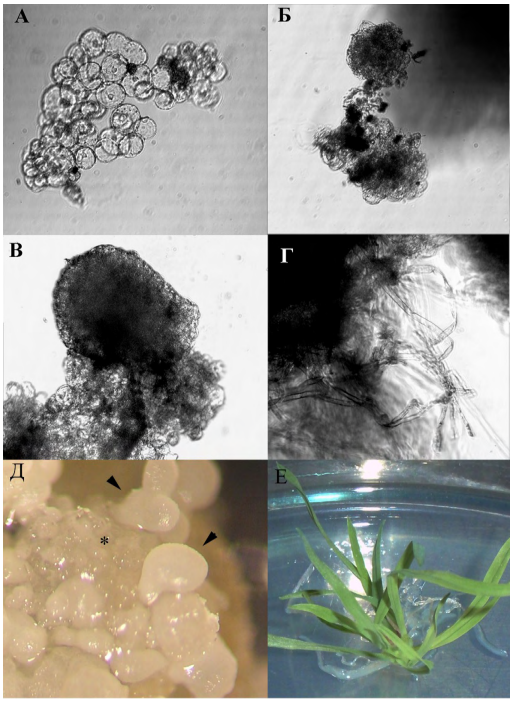
4. Резултати

4.1. Влияние на солевия стрес върху ембриогенния отговор и нарастването на суспензионните култури

Резултатите не се различават съществено от утвърдените в лабораторията по растителна молекулярна биология на катедра Биохимия, СУ и публикувани неколкократно (Atanasov & Odjakova, 2005; Odjakova et al., 1992; Tchorbadjieva & Odjakova, 2001; Odjakova et al., 2001). Наличието на ауксина DICAMBA и култивирането в отсъствие на светлина подтискат регенерационната способност на културите и насочват физиологичния отговор към ембриогенеза. При по-продължително култивиране *in vitro* и повече на брой пасажи на първоначално инициираната калусна култура се наблюдава поява на етиолирани регенеранти, които са нежизнеспособни. Поради това за инциация на суспензионни култури се използват ембриоиди от култури на твърда среда след не повече от два до три пасажа, когато има налична ембриогенна маса.

В сравнително синхронизираните суспензионни култури се различават ясно няколко фази на развитие. До пети ден се наблюдава усилено делене и формиране на микроклъстери, което продължава до десети ден, когато се формират проембриогенните маси (ПЕМ). Към 15ти ден в суспензионните култури вече се наблюдават зрели соматични ембриоиди (фиг. 6), като при последващо култивиране те рекалусират и започва наново делене на клетките.

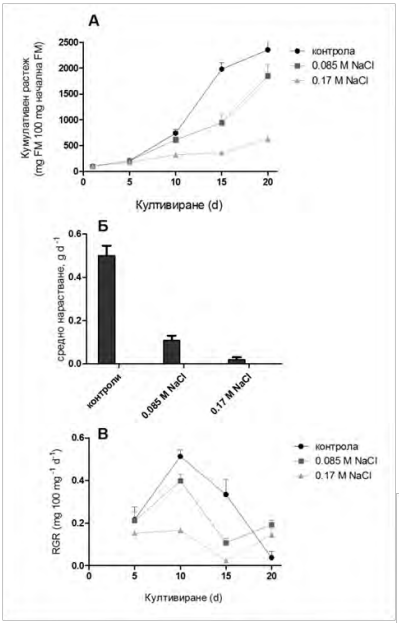
В рамките на 20 дни култивиране на суспензионните култури контролите показват най-висок кумулативен растеж, достигайки натрупване на почти 2.5 g свежа маса за всеки 100 mg изходен материал. Инхибиращо влияние на 0.085 M NaCl се наблюдава след десети ден на култивиране, но натрупването на растителна маса е сравнително високо. Високата солева концентрация показва отчетлив подтискащ ефект, като при 0.17 M NaCl натрупването на свежа маса е близо пет пъти по-малко в сравнение с контролите (фиг. 7).



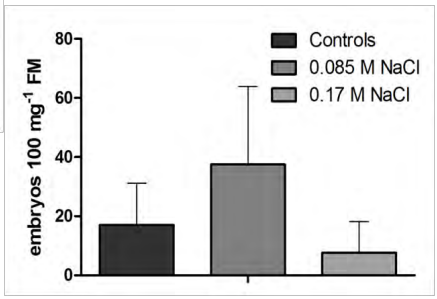
Фиг. 6. Микроскопски снимки на *in vitro* култури на *Dactylis glomerata* L., представящи различните етапи на развитие. А – Единични клетки и микроклъстери в суспензия, наблюдавани между първи и пети ден от култивирането. Б – Проембриогенни маси (ПЕМ) – появяват се около десети ден. В- Регенеранти на твърда хранителна среда. В – Зрели соматични ембриоиди – след 15ти ден. Г – Органогенеза (формиране на корени) при култури, третирани с 0.17 M NaCl. Д – Соматични ембриоиди на твърда хранителна среда (означени със стрелки). С * се означава недиференцирана тъкан - калус. Е – Регенерант на твърда хранителна среда. При 0.085 M NaCl в течна хранителна среда се наблюдава по-интензивно образуване на ПЕМ и соматични ембриоиди, докато при 0.17 M NaCl соматичната ембриогенеза е почти напълно блокирана и се наблюдава органогенеза.

Контролите показват най-голямо натрупване на свежа маса за ден, докато с увеличаване на концентрацията на NaCl средното нарастване намалява експоненциално (фиг. 7). Данните за нарастване, представени като относителен растеж показват близки стойности за контролите и културите, третирани с 0.085 M NaCl до десети ден (фиг. 7). На петнайсети ден се наблюдава рязко спадане на относителния растеж на култури, третирани с ниска сол, който е сравнително по-слабо изразен при контролите. Към 20ти ден относителния растеж на контролите е практически спрял, докато при култури, третирани с 0.085 M NaCl се наблюдава повишаване. Културите, третирани с 0.17 M NaCl показват сравнително постоянен, но значително по-нисък от другите третирания, относителен растеж през целия период на култивиране.

При култури, третирани с 0.085 M NaCl се наблюдават сравнително повече ембриоиди на грам свежа маса (фиг. 8). По-високата солева концентрация (0.17 M NaCl) значително инхибира и дори блокира формирането на соматични ембриоиди. При високата солева концентрация към края на периода на култивиране се наблюдава формирането на корени (фиг. 6).



Фигура 7. Натрупване на свежа растителна маса при ембриогенни суспензионни култури на *Dactylis glomerata* L., третирани с различни солеви концентрации. А – Изразено като кумулативен растеж на различни дни от развитието. Б – Изразено като средно нарастване на ден. В – Изразено като относително нарастване на различни дни от развитието. Представени са средни стойности и стандартно отклонение при n = 15.

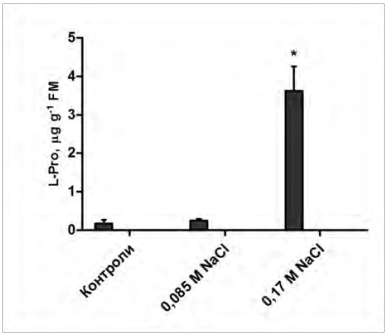


Фигура 8. Брой соматични ембриоиди, отнесени към единица свежа маса при различните солеви концентрации.

4.2. Съдържание на нискомолекулни съединения

4.2.1.Съдържание на L-Пролин

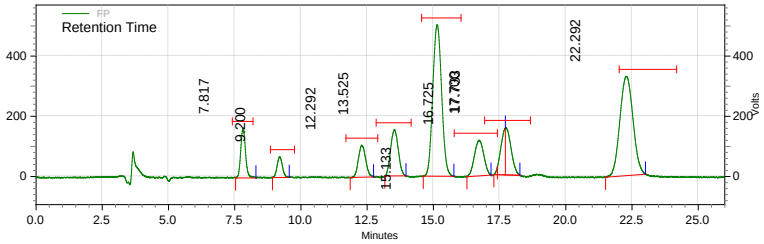
Суспензионните култури, третирани с 0.17 M NaCl показват над петнайсет кратно увеличение на количеството на свободен L-пролин в сравнение с контролите и култури, третирани с 0.085 M NaCl (фиг. 9) Съответно стойностите са 3.63 ±0.63 μg g^{-1} свежо тегло срещу 0.17±0.09 при контролите и 0.24±0.05 при култури, третирани с 0.085 M NaCl.



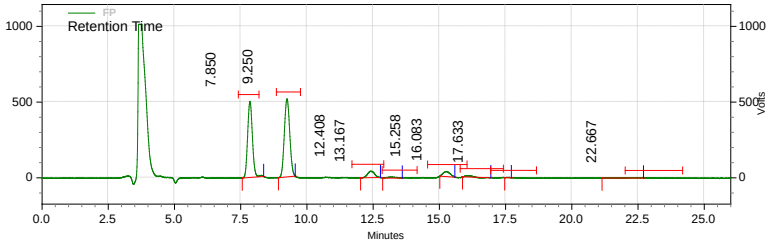
Фигура 9. Количество на L-пролин в солево-третирани ембриогенни суспензионни култури на *Dactylis glomerata* L. Колонките изразяват средна стойност и стандартно отклонение при n = 5. Със звездички са означени стойности, които значително се различават от контролата, $P < 0.05$.

4.2.2.Съдържание на токохроманоли

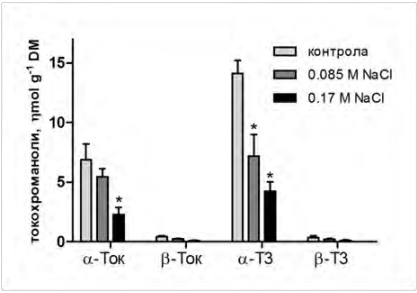
В суспензионни клетъчни култури на *D. glomerata* са установени четири различни токохроманола на база на стандартите (фиг. 10 и 11), като преобладаващи са α-токоферол и α-токотриенол, а β-формите на посочените съединения са на границата на чувствителността на метода. В по-голямо количество е установен α-токотриенол: приблизително два пъти по-голямо количество (около 0.012 ηmol mg^{-1}) от α--токоферол (около 0.006 ηmol mg^{-1}) (фиг. 12). И четирите установени токохроманола намаляват с увеличаване на солевата концентрация, като култури, третирани с 0.17 M NaCl показват около три пъти по-ниски стойности в сравнение с контролите.



Фигура 10. Хроматограма на стандартни токохроманоли. Време на изтичане: 7.8 мин.: α-токоферол; 9.2 мин.: α-токотриенол; 12.3 мин.: β-токоферол; 13.6 мин.: γ-токоферол; 15.1 мин.: β-токотриенол; 16.7 мин.: γ- токотриенол; 17.7 мин.: δ-токоферол; 22.3 мин.: δ -токотриенол. Токохроманолите в ембриогенни суспензионни култури на *Dactylis glomerata* са идентифицирани на база на тези свидетели. За количествен анализ са изготвени стандартни прави при пет различни концентрации на свидетелите.



Фигура 11. Хроматограми на хептанов екстракт от произволна проба. В мин. са показани времената, в които се очаква детекцията на различните токохроманоли. Добре изразени пикове се наблюдават при 7.8 (α-токоферол) и 9.2 (α-токотриенол). Пикове на границата на чувствителността на метода се установяват при 12.4 и 13.2 (β-токоферол и β-токотриенол). Количеството на отделните токохроманоли е изчислено по относителната площ на пика по стандартна права и отнесено към единица суха маса на клетките, от които е направен екстракта.



Фигура 12. Съдържание на токохроманоли в солево-третирани ембриогенни суспензионни култури на *Dactylis glomerata* L. Ток – токоферол; Т3 – токотриенол. Колонките показват средна стойност и стандартно отклонение, n = 5. Със звездички са означени стойности, които значително се различават от контролите, $P < 0.05$.

4.2.3.Съдържание на ниско-молекулни тиолни съединения

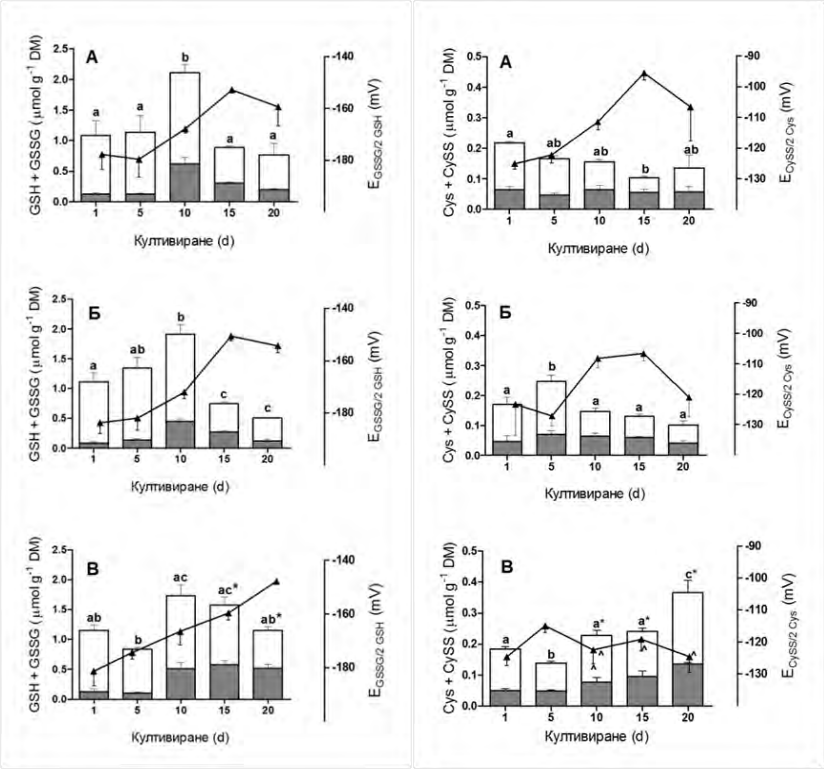
γ-Glu-Cys и Cys-Gly (междинни съединения при синтеза на GSH) не са установени в нито една от пробите. Съдържанието на общ глутатион (GSH+GSSG) се покачва от 1.1 μmol g^{-1} през първите дни до около 2 μmol g^{-1} до десети ден на култивиране, след което намалява до стойности под началните концентрации (0.7 μmol g^{-1}) при контроли и култури, стресирани с 0.085 M NaCl (фиг. 13). При култури, третирани с 0.17 M NaCl концентрациите на общ глутатион остават високи на 15ти и 20ти ден от култивирането. Количеството на глутатион-

дисулфид (GSSG), изразено като процент от общото количество глутатион е сравнително ниско в първите дни при всички третирания (10%), но се увеличава до близо 35% към 15ти ден, след което намалява в края на култивационния период (таблица 2). Единствено при култури, третирани с 0.17 M NaCl процента на GSSG се увеличава допълнително до 45% към 20ти ден.

Концентрацията на общ свободен цистеин (Cys+CySS) показва леко увеличение от първи до пети ден, особено при култури, третирани с 0.085 M NaCl (0.23 μmol g^{-1} в сравнение с 0.17 μmol g^{-1} в началната фаза). Следва намаление на концентрацията на общ цистеин при контроли и при култури, третирани с ниска сол, докато в култури, третирани с 0.17 M NaCl се наблюдава значително увеличение на цистеина до 0.35 μmol g^{-1} към края на третирането (фиг. 13). Концентрацията на CySS остава сравнително непроменена при всички третирания освен при култури, третирани с 0.17 M NaCl, където се увеличава от 0.05 μmol g^{-1} до почти 0.15 μmol g^{-1} в края на третирането (таблица 3), но остава без съществена промяна спрямо контролите като процентно съдържание.

При всички култури окислително-редукционният потенциал на двойката глутатион-глутатион дисулфид ($E_{GSSG/2\ GSH}$) се увеличава от -180 mV до около -150 mV. Култури, третирани с 0.085 M NaCl показват малко по-негативни стойности, отколкото контролите по време на третирането. Културите, третирани с 0.17 M NaCl показват значително по-позитивни стойности за $E_{GSSG/2\ GSH}$ на пети и двайсети ден от третирането (фиг. 13).

Окислително-редукционният потенциал на двойката цистеин-цистин ($E_{Cyss/2\ Cys}$) в контроли и култури, третирани с 0.085 M NaCl се увеличава от -120 mV на пети ден до значително по-позитивни стойности към 15ти ден, след което отново се измества към по-негативните стойности. В култури, третирани с 0.17 M NaCl стойностите на $E_{CySS/2\ Cys}$ остават почти непроменени по време на целия период на култивация (фиг. 13).



Фигура 13. Окислително-редукционен потенциал на глутатион (лява колона) и цистеин (дясна колона) в контролни култури (А) и култури, третирани с 0.085 M NaCl (В) и 0.17 M NaCl (С). Сивите колонки показват глутатион дисулфид (GSSG), съответно цистин (CySS), белите глутатион (GSH), съответно цистеин (Cys) и линиите показват окислително-редукционния потенциал на глутатиона ($E_{GSSG/2\ GSH}$) и цистеина ($E_{CySS/2\ Cyss}$). Със звездички са означени статистически различаващите се стойности между контролните култури и солево-третираните култури при $p \leq 0.05$ (ANOVA). Различните букви над колонките показват статистически достоверни разлики между едно и също солево третиране на различни дни от култивационния период. Стойностите показват средна стойност и стандартно отклонение при n = 5.

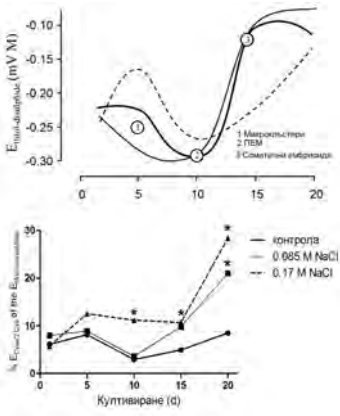
Време на култивиране, дни	Контролни култури	0.085 M NaCl	0.17 M NaCl
1	12.0±2.3	7.6±2.1	10.5±3.8
5	11.2±2.9	10.7±2.2	12.2±2.0
10	29.3±2.5	23.6±1.9	29.3±5.2
15	34.8±1.4	36.8±1.8	36.6±2.5
20	26.6±5.2	24.3±3.8	45.0±1.3 *

Таблица 2. GSSG, представен като процент от общото количество глутатион (GSH+GSSG) в контроли и солево-третирани култури на *Dactylis glomerata*. Със звезда са означени стойности, които значително се различават между контролите и солево-третираните култури при $P \leq 0.005$ (One way ANOVA).

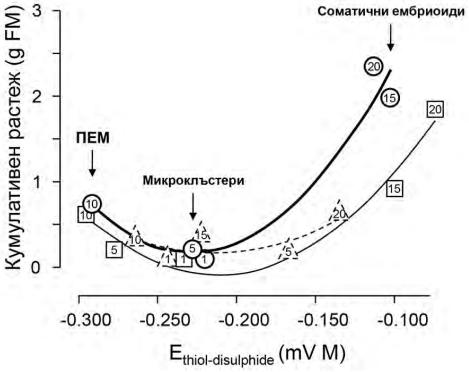
Време на култивиране, дни	Контролни култури	0.085 M NaCl	0.17 M NaCl
1	29.4±3.1	28.0±11.9	27.7±3.1
5	28.6±3.1	28.5±4.0	35.4±2.3
10	40.7±4.9	44.2±3.8	33.7±5.3 *
15	54.2±3.4	46.1±1.8 *	39.5±5.4 *
20	43.9±8.9	40.3±6.4	37.5±4.5

Таблица 3. CySS, представен като процент от общото количество цистеин (Cys + CySS) в контроли и солево-третирани култури на *Dactylis glomerata*. Със звезда са означени стойности, които значително се различават между контролите и солево-третираните култури при $P \leq 0.005$ (One way ANOVA).

Общият окислително-редукционен потенциал на ниско-молекулните тиолни съединения показва близки стойности за контроли и култури, третирани с 0.085 M NaCl. Най-ниските стойности се установяват на 10ти ден от третирането – около - 0.3 mV M и показва най-високи стойности към 15ти и 20ти ден. При култури, третирани с 0.17 M NaCl $E_{thiol\text{-}disulfide}$ са сравнително по-позитивни от тези на контролите в началните фази на стреса (5ти ден), но намаляват към по-негативни стойности към 10ти ден, след което отново се повишават към позитивните стойности сравнително по-бавно, отколкото при контролите (фиг. 14А). Приносът на двойката цистеин-цистин към общия окислително-редукционен потенциал на ниско-молекулните тиолни съединения е по-висок при солево-третираните култури, отколкото при контролите, особено в края на култивационния период (фиг. 14Б).



Фигура 14. (А) Стойности на $E_{thiol\text{-}disulphide}$, изразени по дни и в зависимост от етапа на развитие на ембриогенните култури. (Б) Процентен дял на $E_{CySS/2\ Cys}$ към общия клетъчен редокс-потенциал $E_{thiol\text{-}disulphide}$ при контроли и култури, третирани с 0.085 M NaCl и 0.17 M NaCl. $E_{thiol\text{-}disulphide}$ е изчислен като сума на $E_{GSSG/2\ GSH}$ и $E_{CySS/2\ Cys}$ и техният редуциращ капацитет.



Фигура 15. Връзка между кумулативния растеж и клетъчния окислително-редукционен потенциал $E_{thiol\text{-}disulphide}$. С цифри са означени дните на култивиране за съответните стойности. Физиологичния статус на културите е показан за контролите: по-редуциращи стойности на $E_{thiol\text{-}disulphide}$ се наблюдават при усилено натрупване на свежа маса, докато по-окислени стойности се наблюдават в етапите на формиране на соматични ембриоиди. Подобна връзка се наблюдава и при култури, третирани с 0.085 M NaCl, докато при култури, третирани с 0.17 M NaCl $E_{thiol\text{-}disulphide}$ почти не показва флуктуации.

4.3. Сравнителен анализ на белтъчния профил на белтъци от клетъчна стена и от хранителната среда на двумерни електрофорези;

Сравнени са белтъчните профили на фракция, изолирана от клетъчна стена на контролни и третирани с 0.085 M и 0.17 M и съответните белтъчни фракции от хранителната среда (фиг. 17). Установяват се значителни разлики в белтъчните профили с повишаване на солевата концентрация при третиране на културите.

В клетъчната стена редица белтъци, които се откриват в контролите, изчезват или са трудно забележими в солево-третираните култури, особено при концентрации на NaCl от 0.17 и 0.255 M. В хранителната среда при 0.085 и особено при 0.17 M NaCl се наблюдава появата на редица белтъци, отсъстващи в контролите. За идентифициране на белтъците, които потенциално биха имали отношение към солевия стрес и ембриогенния отговор е направен подробен анализ на белтъчните профили, като са определени молекулните маси и изоелектричните точки на всички белтъчни петна от представените профили. Установени са общо 81 ясни белтъчни петна, чието разпределение е дадено на фигура 18. Сравнително нисък процент, едва 6% от установените петна са белтъци, които са характерни за хранителната среда само при високи солеви концентрации.

Arabidopsis (Wei-Tao et al., 2011), но като цяло не е застъпен в литературата, като преобладава мнението, че пролинът има изцяло протективен ефект при различни типове стрес.

Високо съдържание на пролин е установено и при контроли и култури, третирани с 0.085 M NaCl в експерименти, когато не е постигнат добър температурен контрол и когато културите фенотипно се различават от нормално наблюдаваното – кафеникав калус, слабо натрупване на свежа растителна маса и инхибирана ембриогенеза (данните не са представени).

Това ни дава основание да смятаме количеството на ендогенен пролин като чувствителен маркер за физиологичното състояние на културите и да изключим от последващи експерименти култури, които показват нехарактерно високи концентрации.

Друг аспект на натрупването на пролин е свързан с биосинтезата на HRGPs. Те, както и пролин-богатите белтъци заемат основен дял от секреторните белтъци на растителните клетки. Хидроксилирането на пролина до хидроксипролин се осъществява във вече транслираната полипептидна верига от пептидил-пролил хидроксилаза и служи като основно място, където се извършва O-гликозилирането на HRGPs (Shimizu, et al., 2005). Данните показват увеличение на концентрацията на AGPs в хранителната среда на солево-третираните култури (фиг. 23), което е в корелация с увеличената концентрация на свободен пролин вътре в клетките. Подобна взаимовръзка е установена и от други автори (Mattioli et al., 2009). За момента не може да се даде недвусмислен отговор на въпроса дали натрупването на свободен пролин е в пряко отношение към de novo синтезата на AGP.

5.1.3.Съдържание на токохроманоли

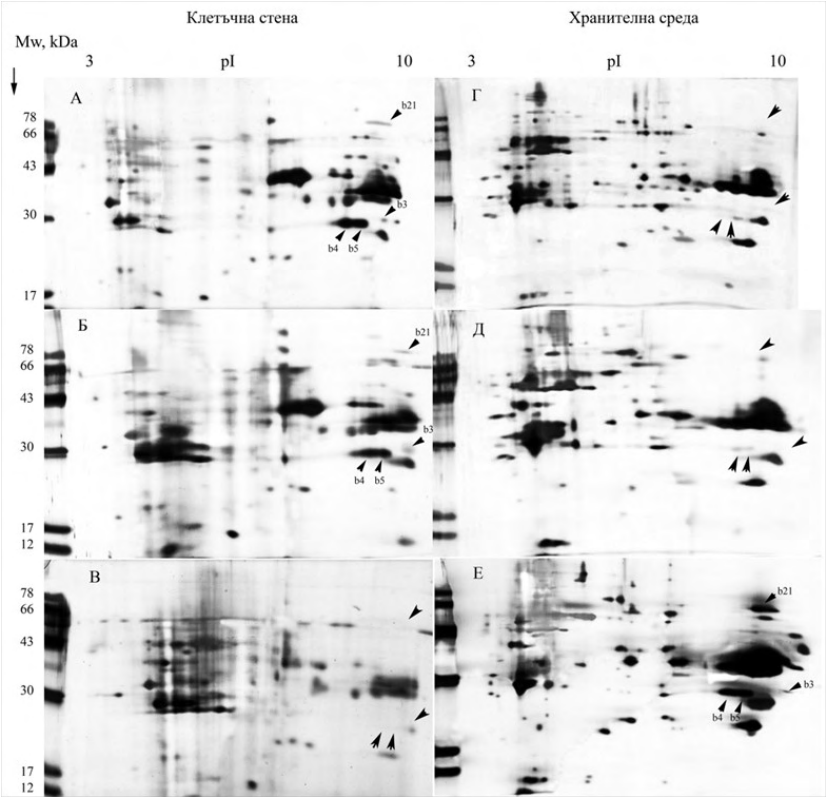
Липоразтворимите токохроманоли от семейството на витамин Е са известни с антиоксидантното си действие, насочено най-вече към предпазване на липидите от прекисно окисление, настъпващо при оксидативен стрес (обзор от Falk & Munee-Bosch, 2010). Обратно на пролина, наблюдаваното намаляване на концентрациите на α-токоферол и α-токотриенол с нарастване на солевата концентрация (фиг. 12) противоречи на очакването, че солевият стрес предизвиква

повишаване на количеството на тези антиоксиданти, както е установено от други автори (Skłodowska et al., 2009; Ellouzi et al., 2011; Queirós et al., 2011). Частично обяснение на тези резултати може да се крие във факта, че метаболитния път за получаване на токохроманоли е свързан с метаболитния път на хлорофила (Mène-Saffrané & Della Penna, 2010), а при изследваната система фотосинтезата и съответно метаболизма на пигменти е подтиснат. Вероятно намаляването на концентрациите на токохроманолите се дължи на изчерпване на началния запас и невъзможност на клетките да го възстановят. Отново при култури, третирани с 0.17 M NaCl се наблюдават много по-сериозни промени, отколкото при третираните с ниска солева концентрация, където намаляването, особено на α-токоферол е незначително. Доколкото α-токотриенола е прекурсор на α-токоферола, по-сериозното му намаляване при култури, третирани с 0.085 M NaCl може да се обясни с пренасочването му към синтеза на α -токоферол за преодоляване на предполагаемо-настъпващия оксидативен стрес.

5.1.4.Нискомолекулни тиолни съединения и окислително-редукционен потенциал на тиол-дисулфидите

Изследването на друга група антиоксиданти – нискомолекулните тиолни съединения, също демонстрира сериозното влияние на солевия стрес върху клетъчните функции. Липсата на γ-Glu-Cys и Cys-Gly може да се обясни с интензивния метаболизъм, водещ до продукцията на глутатион, в който скоростоопределяща реакция е именно формирането на γ-Glu-Cys, който след това много бързо се метаболизира до GSH (Noctor et al., 1998).

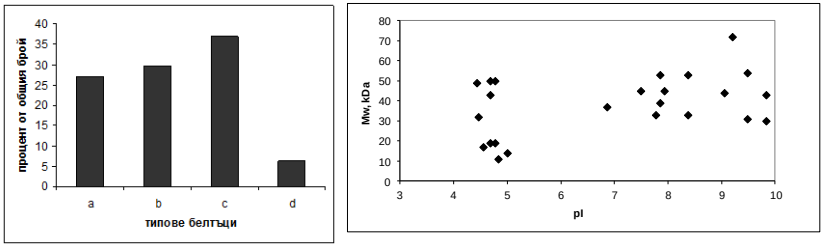
Изследвания на (Belmonte et al., 2005) и (Stasolla, 2010) показват, че GSH е необходим за ранните етапи от процеса на соматична ембриогенеза при *Picea glauca*, когато растежа и деленето на клетките са интензивни. Подобно, в изследваните култури на *Dactylis glomerata* концентрацията на общия глутатион (GSH + GSSG) започва да расте към пети ден (фиг. 13), когато се формират микроклъстери и продължава да се увеличава до десети ден заедно с формирането на ПЕМ (фиг. 6). Най-високите концентрации на общ глутатион при всички третирания се наблюдават именно на десетия ден от култивирането, което съвпада с пика в относителния растеж (фиг. 7). Това потвърждава необходимостта от високи концентрации



Фигура 17. Двумерни електрофорези на белтъци от клетъчна стена (лява колона) и белтъци от хранителната среда (дясна колона) на контролни култури (А и Г) и култури, третирани с 0.085 M NaCl (Б и Д) и 0.17 M NaCl (В и Е) . Със стрелки са означени белтъци с pI в алкалната област, които присъстват в клетъчната стена при контролите и култури, треатирани с 0.085 M NaCl и се появяват в хранителната среда при култури, третирани с по-високите солеви концентрации.

Разпределението на установените белтъчни петна по молекулна маса и изоелектрична точка е дадено на фигура 18. Белтъците, означени с [b], които се откриват в клетъчната стена на контроли и култури, третирани с 0.085 M NaCl, но изчезват или се откриват в хранителната среда при по-високи солеви концентрации, са групирани по следния начин: нискомолекулни (10-20 kDa) белтъци с изоелектрична точка в киселия диапазон (pH 4.5-5); средномолекулни (40-50 kDa) белтъци с изоелектрична точка в киселия диапазон (pH 4.5 -5); средномолекулни (30-80 kDa) белтъци с изоелектрична точка в

широк алкален pH диапазон (pH 7.5-10). Подбрани са четири белтъчни фракции с изоелектрична точка в алкалния pH диапазон, които показват наличие в клетъчната стена на контролни култури и хранителната среда на солево-третирани култури и отсъствие в клетъчна стена на солево-третирани и хранителна среда на контролни култури. Тези белтъчни фракции са означени условно като b3 (pI 9.8; Mw 34 kDa), b4(pI 7.8; Mw 33 kDa), b5(pI 8.4; Mw 33 kDa) и b21(pI 9.2-9.4; Mw 72 kDa).

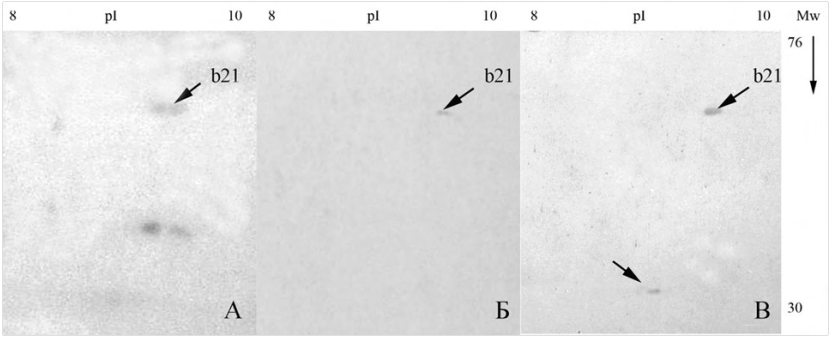


Фигура 14. Разпределение на различните типове белтъци в зависимост от поведението им в проценти спрямо общия брой изследвани белтъчни петна; с **[a]** са означени белтъците, които се установяват в клетъчната стена независимо от концентрацията на стресовия фактор; с **[b]** са означени белтъци, които присъстват в клетъчната стена само при ниски солеви концентрации. Някои от тях се откриват при високи солеви концентрации в хранителната среда; с **[c]** са означени белтъци, характерни само за хранителната среда; с **[d]** са означени белтъци от хранителната среда, които се откриват само при високи солеви концентрации. Дясната схема показва само белтъци, които присъстват в клетъчната стена при контроли и култури, третирани с 0.085 M NaCl, които се появяват в хранителната среда при по-високи солеви концентрации.

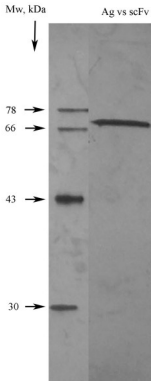
4.4. Фагов дисплей. Получаване на антитела срещу белтък, свързан с отговора на солеви стрес.

Срещу предварително избран антиген b21 са проведени четири рунда на селекция с фаговата библиотека, като след последния рунд са отбрани осем клона фаги. Всички те показват сходна специфичност на имуноблот (резултатите не са представени), поради което на случаен принцип е избран един клон (scFv6) с който да продължат анализите. Проведен имуноблот със спасени фаги, носещи фузирано антитяло показва разпознаване на над 8 белтъчни петна след двумерна електрофореза (фиг. 19A). Сред тях е и белтъчно петно, което отговаря по молекулна маса и изоелектрична точка на избрания антиген b21.

От избрания клон са получени разтворими антитела, с които е проведен имуноблот на двумерна електрофореза на белтъци от хранителната среда на култури, третирани с 0.17 M NaCl и белтъци от клетъчна стена на култури, третирани с 0.085 M NaCl (фиг. 19Б и 19В). Разтворимите антитела разпознават две белтъчни фракция в белтъци от хранителна среда, една с молекулна маса 72 kDa и изоелектрична точка 9.2, която отговаря на изходния антиген b21 и една нискомолекулна (Mw 33 kDa; pI 8.4;), която отговаря на друг белтък със сходно поведение в зависимост от солевата концентрация – b5. В клетъчна стена разтворимите антитела разпознават само една белтъчна фракция, която отговаря по електрофоретична подвижност на b21.



Фигура 19. Уестърн блот с моноклоналното mAb DG b21.4.6, фузирано с фагови частици [A] и в разтворима форма [B и C] след двумерна електрофореза на белтъците. A – белтъци от хранителната среда на култури, третирани с 0.17 M NaCl. B – белтъци от клетъчната стена на култури, третирани с 0.085 M NaCl. C- белтъци от хранителната среда на култури, третирани с 0.17 M NaCl. b21 и b5 са белтъци, потенциално свързани със соматичната ембриогенеза, от които b21 е използван като антиген за получаване на



С разтворимите антитела е изолиран в пречистен вид антигенът им, като се установява наличието на една фракция, отговаряща по молекулна маса на изходния антиген (фиг. 20).

Фигура 20. Изолиране на антигена на моноклоналното антитяло mAb DG b21.4.6 след имобилизация на антитялото на нитроцелулозна мембрана. Антигена е разделен на SDS PAGE и визуализиран с кумаси, след което е трипсинизиран в гела и използван за масспектрометрични анализи.

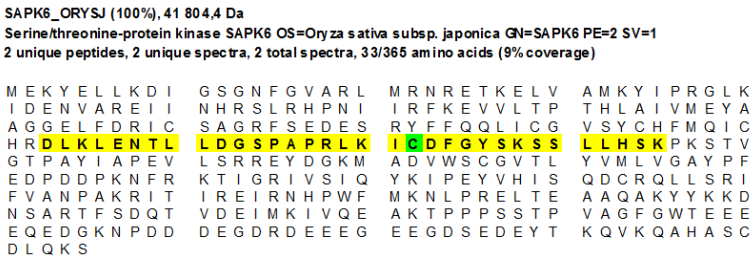
4.5. Масспектрометрична идентификация на белтък, потенциално свързан със соматичната ембриогенеза.

Пептидният фингърпринт на изолиран, пречистен с антитялото белтък, отговарящ по молекулна маса на избрания антиген b21 показва сходство с два познати белтъка от базата данни - MADS-box транскрипционен фактор 57 OS и серин/треонин протеин киназа SAPK6 OS, и двата от ориз (*Oryza sativa*) (таблица 4).

Белтък	Номер на белтъка в базата данни	Молекулна маса, Da	Вероятност на идентификацията	Брой на спектрите	Процент покрита секвенция
MADS-box transcription factor 57 OS=Oryza sativa subsp. japonica GN=MADS57 PE=2 SV=2	MAD57_ORYSJ	27 218,9	99,6%	2	6,22%
Serine/threonine-protein kinase SAPK6 OS=Oryza sativa subsp. japonica GN=SAPK6 PE=2 SV=1	SAPK6_ORYSJ, SAPK7_ORYSJ	41 786,4	99,8%	2	9,04%

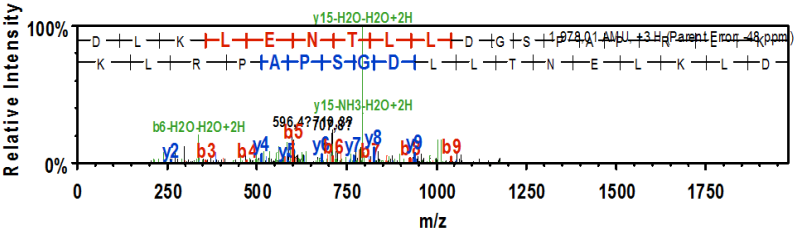
Таблица 4. Информация и MS/MS данни за два протеина, които са възможни кандидати за идентификация на белтъка, b21, потенциално свързан със соматичната ембриогенеза.

Поради факта, че транскрипционният фактор не се очаква да бъде локализиран в клетъчната стена, е обърнато внимание само на серин/треонин протеин киназата. Установено е припокриване с два от спектрите, установени в пробата, които покриват около 9% от пълната секвенция на белтъка, или 33 от общо 365 аминокиселини (фиг. 21). Спектрите на двата пептида са показани на фигура 22.

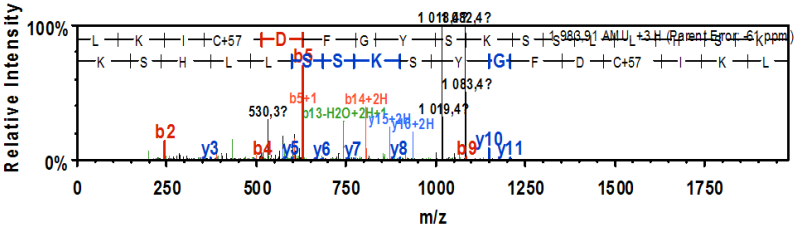


Фигура 21. Белтъчна секвенция на SAPK6 серин/треонин протеин киназата от ориз. В жълто са означени аминокиселинните последователности, които се покриват от установените с MS/MS анализ пептиди от антигена b21. Установени са два пептида, покриващи около 9 % от пълната секвенция на SAPK6.

Спектър на пептид (R)DLKLENTLLDGSPAPRLK(I)



Спектър на пептид (R)LKICDFGYSKSSLLHSK(P)

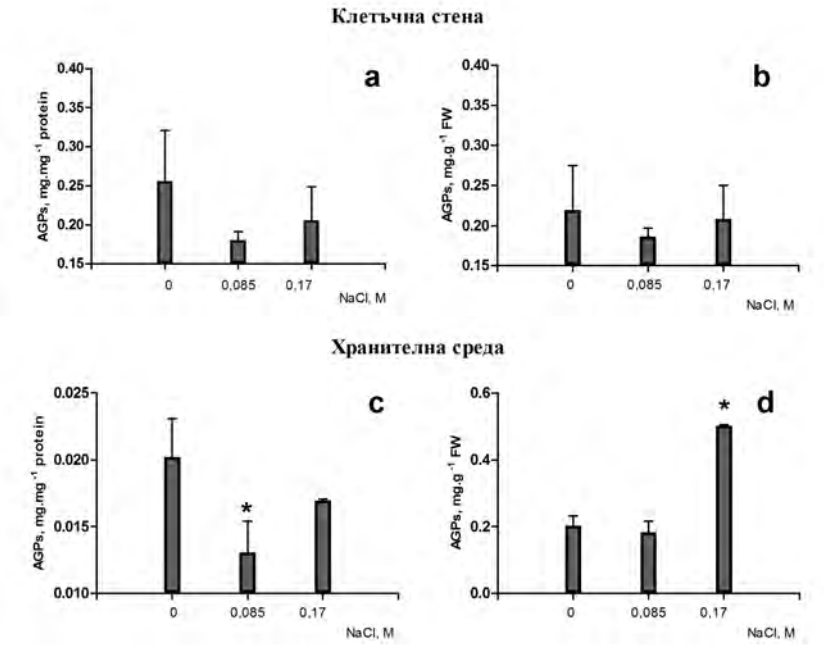


Фигура 22. Спектри на двата пептида, съвпадащи с пептиди на SAPK6 протеин-киназата от ориз.

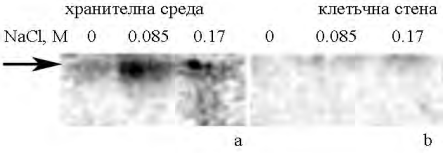
4.6. Арабиногалактанови белтъци – количествен и качествен анализ, клетъчна локализация;

Количественият анализ на AGPs в белтъчни фракции от клетъчна стена и от хранителната среда показва, че докато в клетъчната стена почти няма разлика в количеството с увеличаване на солевата концентрация на третиране, то в хранителната среда се наблюдава значително увеличение, като при култури, третирани с 0.17 M NaCl увеличението е 2.5 пъти. При всички останали третирания, както и при всички третирания в клетъчна стена общото количество на AGPs е между 0.15 и 0.25 mg g^{-1} (фиг. 23).

Оцветяването с Ярив реагент на гел показва, че повечето детектируеми AGPs остават на границата на концентриращия и разделящия гел дори при сравнително ниско-процентна (7.5% T) SDS PAGE. Подобна електрофоретична подвижност отговаря на молекулна маса над 200 kDa (фиг. 24).

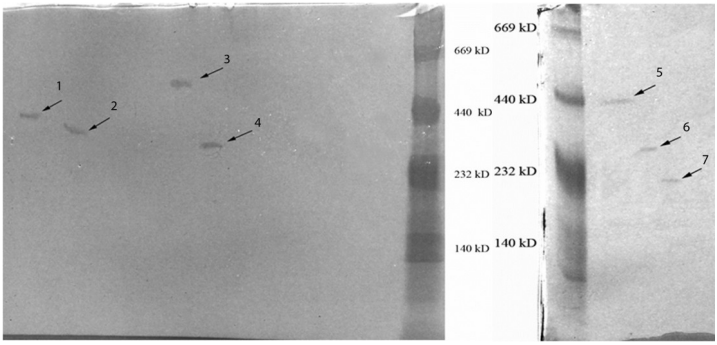


Фигура 23. Количествен анализ на AGPs в клетъчна стена (горен ред) и хранителна среда (долен ред) на ембриогенни суспензионни клетъчни култури на *Dactylis glomerata* L. Количеството AGPs е изразено като mg mg^{-1} белтък **(a** и **c)** и като mg g^{-1} свежо тегло **(b** и **d)**. Колонките изразяват средно аритметично и стандартно отклонение от n = 3. Със звезди са означени стойностите, които значително се различават от контролите, $P < 0.05$.



Фигура 24. Оцветяване на AGPs с Ярив реагент след проведена 7,5% T SDS PAGE. Белтъците са от хранителна среда **(a)** и клетъчна стена **(b)** на третирани с различна концентрация NaCl ембриогенни суспензионни култури на *Dactylis glomerata* L. Стрелката посочва оцветените фракции с молекулна маса над 200 kDa.

Изолираните и пречистени AGPs от хранителната среда са разделени на ниско-процентна (5% T) SDS PAGE, като са установени различни фракции (данните са обобщени в таблица 4). Установена е високо-молекулна фракция, около 530 kDa, характерна единствено за култури, третирани с 0.085 M NaCl.

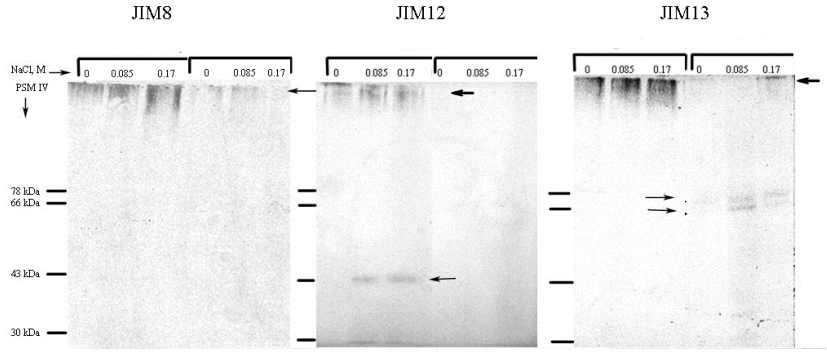


Фигура 25. Сребърно оцветяване на AGPs, изолирани с Ярив реагент, пречистени и частично фракционирани на PD10 хроматографски колонки и разделени на 5 % SDS PAGE/AGE. Със стрелки и цифри са означени отделните фракции, обединени в табл. 4.

Молекулна маса, kDa	Контроли	0.085 M NaCl	0,17 M NaCl
~ 530	-	+ (3)	-
~ 440	+ (1)	-	+ (5)
~ 350	+ (2)	-	-
~ 300	-	+ (4)	+ (6)
~ 230	-	-	+(7)

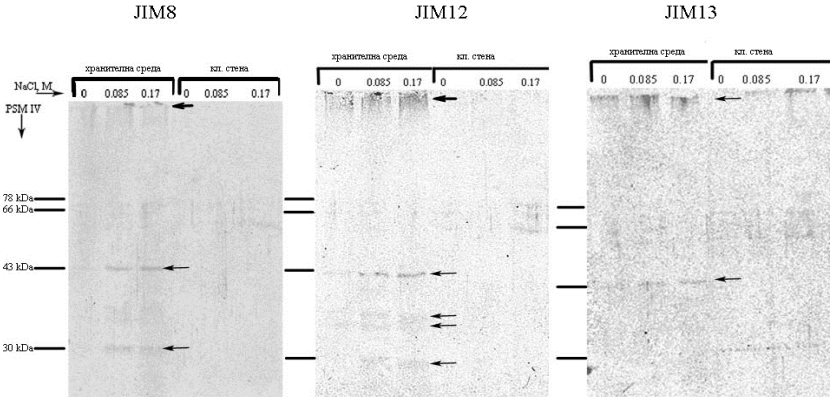
Таблица 4. Фракции AGPs, получени след изолиране с Ярив реагент и пречистване на PD10 хроматографски колонки. Молекулната маса е определена след разделяне на 5 % SDS PAGE/AGE. Цифрите в скобите отговарят на цифрите от Фигура 25.

При проведен имуноблот след SDS PAGE в редуциращи (фиг. 27) и нередуциращи (фиг. 26) условия са установени редица фракции AGPs (с антитела JIM8 и JIM13), както и екстензини (JIM12). Данните са обобщени в таблици 5 и 6. В нередуциращи условия и трите антитела разпознават фракция на границата на разделящия и концентриращия гел с предполагаема молекулна маса над 200 kDa. Тези фракции се наблюдават основно при контроли и култури, третирани с 0.085 M и 0.17 M NaCl в белтъчна проба от хранителната среда. Анти-екстензиновото антитяло JIM12 разпознава фракция с молекулна маса около 43 kDa единствено в хранителна среда на солево-третирани култури (0.085 M и 0.17 M NaCl). В клетъчна стена на солево третирани култури са разпознати фракции с молекулни маси 70 и 73 kDa от анти-арабиногалактановото антитяло JIM13 (фиг. 26).



Фигура 26 Уестърн блот анализ след 7.5 % T SDS PAGE в нередуциращи условия на белтъци от клетъчната стена и белтъци от хранителната среда на култури, третирани с различни концентрации NaCl. Използвани са анти-екстензиново антитяло JIM12 и анти-AGPs антитела JIM8 и JIM13. Със стрелки са означени разпознаваните фракции.

В редуциращи условия всичките три използвани антитела разпознават високо-молекулни фракции в хранителната среда (фиг. 27). Резултатите са подобни на тези в нередуциращи условия (фиг. 26). Всички антитела разпознават фракция с молекулна маса от 43 kDa в хранителна среда на солево-третираните култури. Допълнително антителата JIM8 и JIM12 разпознават три ниско-молекулни фракции с молекулни маси 30, 35 и 37 kDa в хранителна среда на солево-третирани култури.



Фигура 27 Уестърн блот анализ след 10 % T SDS PAGE в редуциращи условия на белтъци от клетъчната стена и белтъци от хранителната среда на култури, третирани с различни концентрации NaCl. Използвани са анти-екстензиново антитяло JIM12 и анти-AGPs антитела JIM8 и JIM13. Със стрелки са означени разпознаваните фракции.

Антитяло	JIM8			JIM12			JIM13		
NaCl, M/ Mw, kDa	0	0.085	0.17	0	0.085	0.17	0	0.085	0.17
>200	+	+	следи	+	+	+	+	+	+
43	+	++	-	+	++	++	-	+	+
37	-	-	-	следи	+	+	-	-	-
35	-	-	-	следи	+	+	-	-	-
30	-	+	-	-	+	+	-	следи	следи

Таблица 5. Протеинови фракции от хранителна среда на суспензионни култури на *Dactylis glomerata* L., разпознавани от антителата JIM 8, JIM 12 и JIM 13 на имуноблот анализ след 10% T SDS PAGE в редуциращи условия. (++) ясно видими; (+) видими; (следи) следови сигнали; (-) не са детектирани.

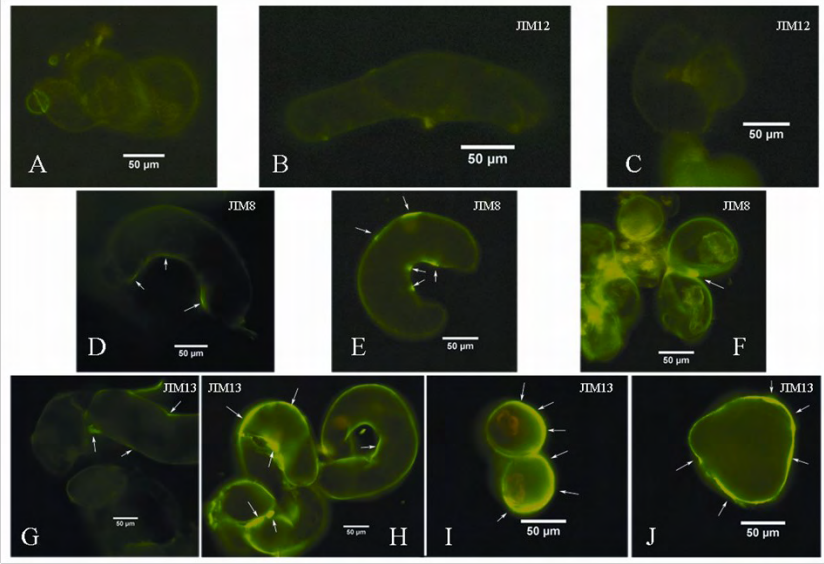
Антитяло	JIM8			JIM12			JIM13		
NaCl, M/ Mw, kDa	0	0.085	0.17	0	0.085	0.17	0	0.085	0.17
>200	-	следи	следи	-	следи	следи	следи	+	++
73	-	-	-	-	-	-	-	следи	+
70	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Таблица 6. Протеинови фракции от клетъчна стена на суспензионни култури на *Dactylis glomerata* L., разпознавани от антителата JIM 8, JIM 12 и JIM 13 на имуноблот анализ след 10% T SDS PAGE в редуциращи условия. (++) ясно видими; (+) видими; (следи) следови сигнали; (-) не са детектирани.

При имунолокализация с антителата е установено, че JIM8 епитопите са разположени само по локализирани места на удължени клетки в контроли и култури, третирани с 0.085 M NaCl. Сигналът е сравнително по-силен при солево-третираните култури. Епитопи на JIM8 се наблюдават и на местата на междуклетъчните контакти. При кръглите клетки и при култури, третирани с 0.17 M NaCl не се наблюдава специфично разпознаване.

Подобно JIM13 антитялото показва увеличена експресия на епитопите му при удължените клетки на култури, третирани с 0.085 M NaCl в сравнение с контролите. JIM13 епитопите са по-застъпени и по -равномерно разпределени от тези на JIM8 антитялото. Освен това се наблюдават и кръгли клетки, при които цялата повърхност е осеяна с JIM13 епитопи. JIM12 антитялото не показва сигнал нито при контролите, нито при солево третираните култури.

При всички проби се наблюдава слаб, жълтеникав сигнал, различен от специфичното светене на FITC багрилото, с което е конюгирано второто антитяло. Тази фонова флуоресценция се дължи на голямото количество фенолни съединения, намиращи се в растителните клетъчни стени (фиг. 28).

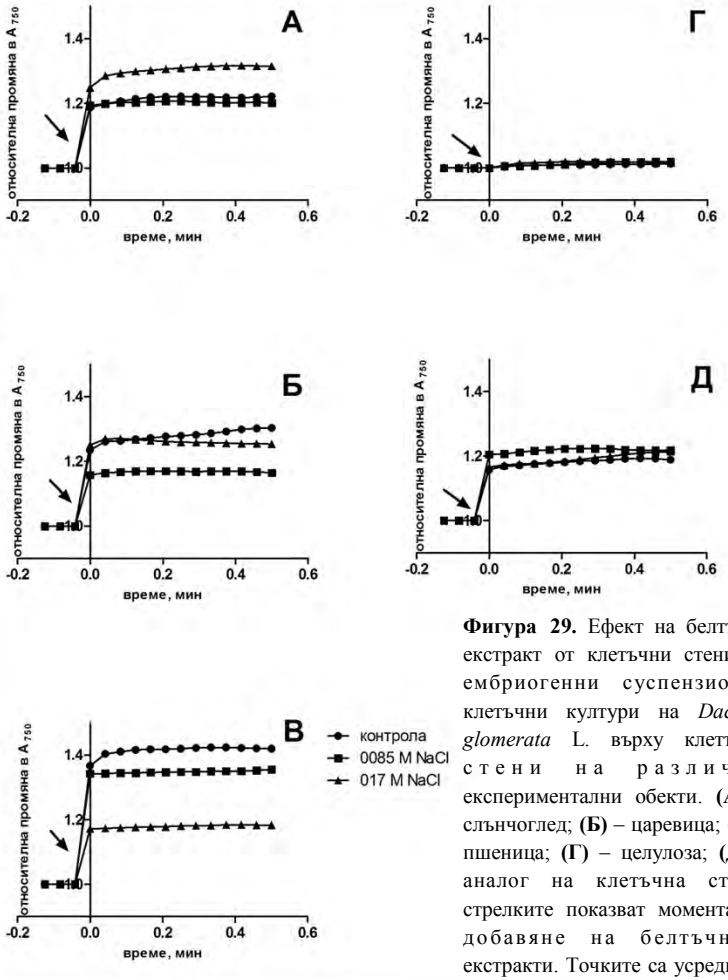


Фигура 28. Имунолокализация с флуоресцентен микроскоп на епитопи на HRGPs, разпознавани от антителата JIM8 **(D, E** и **F)**, JIM12 **(B** и **C)** и JIM13 **(G, H, I** и **J)**. **A** – отрицателна контрола без първо антитяло. Второ антитяло е FITC конюгирано антиплъше. **B, D** и **G** – контролните култури. **C, E, F, H, I** и **J** – култури, третирани с 0,.085 M NaCl. Със стрелки са означени местата, показващи флуоресцентен сигнал. 40x увеличение, линиите за мащаб = 50 µm.

4.7. Активност на експанзини.

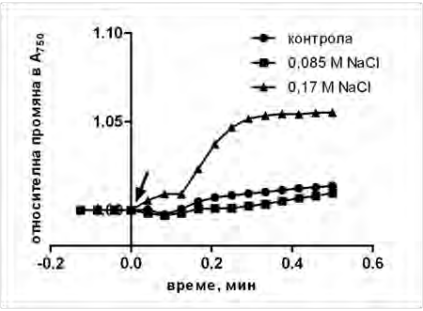
Активността на експанзини на тотален белтъчен екстракт от клетъчна стена на третирани с различни солеви концентрации суспензионни култури на *Dactylis glomerata* показва различен ефект върху клетъчните стени от различни експериментални обекти (фиг. 29). Относително най-висока активност се наблюдава върху клетъчна стена от хипокотили на пшеница (фиг. 29B). При този обект

с увеличаване на концентрацията на сол активността на експанзини на белтъчния екстракт намалява. При слънчоглед (фиг. 19А) и царевица (фиг. 19Б) ефекта е сравнително по-слаб и няма ясно изразен ефект на солевата концентрация на третиране. Активността на експанзини върху чиста целулоза (фиг. 19Г), получена от *Acetobacter* е почти незабележим, но такава се наблюдава върху експериментален обект, аналог на клетъчна стена (целулоза/пектин/ксилоглюкан) (фиг.19Д), където обаче не се забелязва ефект на солевата концентрация.



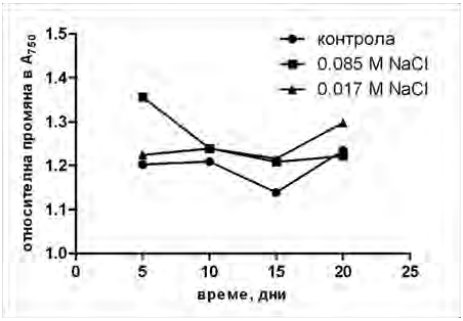
Фигура 29. Ефект на белтъчен екстракт от клетъчни стени на ембриогенни суспензионни клетъчни култури на *Dactylis glomerata* L. върху клетъчни стени на различни експериментални обекти. **(А)** – слънчоглед; **(Б)** – царевица; **(В)** - пшеница; **(Г)** – целулоза; **(Д)** – аналог на клетъчна стена; стрелките показват момента на добавяне на белтъчните екстракти. Точките са усреднени стойности, n = 3.

Ефектът на α-експанзини от домат върху екстензибилитета на клетъчна стена от *Dactylis glomerata* е почти незабележим при контроли и култури, третирани с 0.085 M NaCl и сравнително по-силен при култури, третирани с 0.17 M NaCl (фиг. 30). Забелязва се и известно забавяне на този ефект – относителното покачване на A_{750} започва след 0.1 – 0.2 min, докато при предишната експериментална постановка е незабавен.



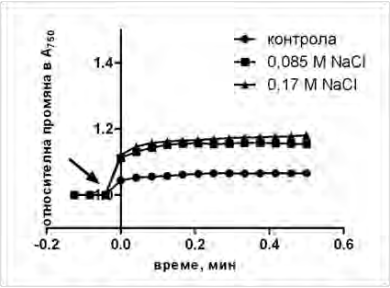
Фигура 30. Влияние на α-експанзини върху екстензибилитета на клетъчна стена от *Dactylis glomerata* от суспензионни култури, третирани с различни солеви концентрации. Със стрелка е означен момента на добавяне на α-експанзините. Точките са усреднени стойности, n = 3.

Експериментите с влияние на екстрактите от клетъчна стена на *Dactylis glomerata* от различни дни на развитие са проведени върху аналог на клетъчна стена (фиг. 31). Последният дава най-стабилна суспензия. При контролата се наблюдават най-ниски стойности на относително увеличение на абсорбцията при всички дни, с най-ниски стойности на 15ти ден, като следва покачване към 20ти. Солево-третираните култури следват подобна тенденция на промяна, макар и по-малко изразена, а при екстракти от култури, третирани с 0.17 M NaCl се наблюдават най-високи стойности на 20ти ден от развитието.



Фигура 31. Влияние на белтъчен екстракт от клетъчна стена на ембриогенни суспензионни култури на *Dactylis glomerata* L., третирани с различни солеви концентрации върху аналог на клетъчна стена. Точките показват усреднени максимални стойности в относителната промяна на абсорбцията при 750 nm. на различни дни от третирането на културите.

След проведено изолиране на пречистена фракция на експанзини чрез FPLC (данните не са показани) от контроли и солево-третирани култури отново се установява, че контролите показват най-слаба активност при изравнено количество на белтък (фиг. 32).

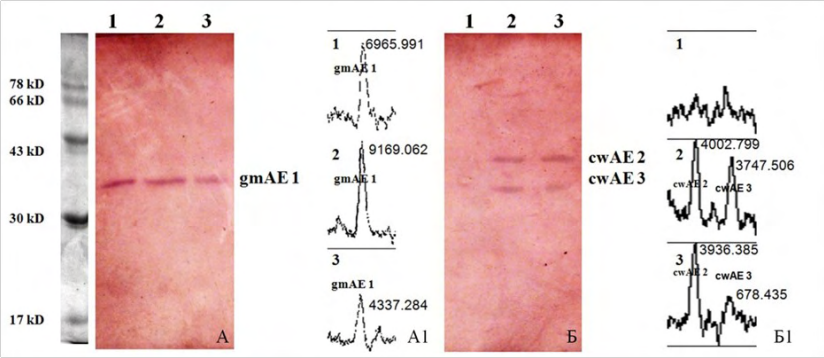


Фигура 32. Влияние на частично пречистени експанзини от ембриогенни суспензионни култури на *Dactylis glomerata* L., третирани с различни солеви концентрации върху аналог на клетъчна стена. Експанзините са пречистени чрез FPLC от проф. Стюърт Томпсън, Университет на Уестминстър. Стрелката посочва момента на добавяне на експанзините. Точките показват усреднени стойности, n = 3.

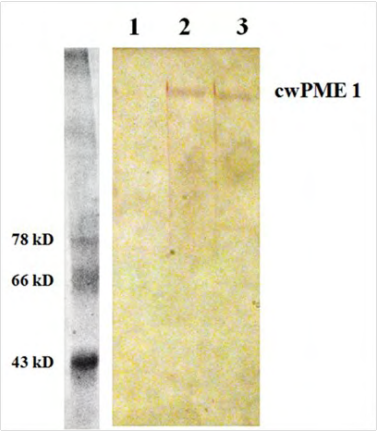
4.8. Ензимни активности на пектинметил естерази и ацетил естерази.

Зимограмният анализ на киселите ацетилестерази показва, че докато в хранителната среда се установява само една фракция (фиг. 33A), то в клетъчната стена се проявяват две такива (фиг. 33B). Относителната активност на фракцията от хранителна среда (gmAE1) се повишава при култури, третирани с 0.085 M NaCl (фиг. 33A1) и намалява под контролните стойности при култури, третирани с 0.17 M NaCl. И двете изоформи, установени в клетъчната стена се проявяват основно при солево-третираните култури, докато при контролите те почти отсъстват. Фракцията с по-ниска молекулна маса показва намалена активност при култури, третирани с 0.17 M NaCl, докато другата фракция запазва относителните си нива на активност (фиг. 33B1).

Зимограмният анализ на пектинметилестерази показва една-единствена, високо-молекулна изоформа в клетъчна стена на култури, третирани с 0.085 M NaCl и 0.17 M NaCl (фиг. 34).



Фигура 33. Зимограмен анализ след 10% T SDS PAGE на ацетилестерази в хранителната среда (А) и клетъчната стена (Б) на контроли (1) и култури, третирани с 0.085 M NaCl (2) и 0.17 M NaCl (3). Означени са изоформите gmAE1, cwAE2 и cwAE3. На A_1 и B_1 са означени пиковете и относителната им площ на съответните изоформи, изчислени дензитометрично на ImageJ.



Фигура 34. Зимограмен анализ на пектинметилестерази в клетъчна стена на контроли (1) и третирани с 0.085 M NaCl (2) и 0.17 M NaCl (3) култури след 7.5 % T SDS PAGE. Със cwPME1 е означена единствената изоформа, която е специфично проявена. В белтъци от хранителната среда не са установени изоформи на пектинметилестерази.

5. Дискусия

5.1. Влияние на солевия стрес върху растежа и соматичната ембриогенеза на суспензионните култури

5.1.1.Влияние на солевия стрес върху растежа и соматичната ембриогенеза

Солевото третиране на ембриогенните суспензионни култури на *Dactylis glomerata* L. води до значително намаляване, както на натрупването на свежа растителна маса, така и върху средното нарастване за ден (фиг. 7). Този ефект е очакван предвид на общоприетото схващане, че високите концентрации на сол и особено на NaCl водят до съществено намаляване на растежа. Подобни резултати са публикувани както за едносемеделни земеделски култури в следствие на висока почвена соленост – ечемик (Yang et al., 2009; Roshandel & Flowers, 2009), така и при *in vitro* култури (Zhao et al., 2009; Wang et al., 2011; Summart et al., 2010) и при халофити над определена концентрация (Ma et al., 2011). Докато ефектът на ниската концентрация (0.085 M NaCl) върху общото натрупване на свежа растителна маса не е толкова изявен, то при високи солеви концентрации (0.17 M NaCl) се наблюдава петкратно по-малко крайна маса в сравнение с контролите (фиг. 7). За разлика от някои халофитни растения, които отбелязват увеличено натрупване на биомаса при концентрации от 0.1 M NaCl спрямо контролите, а при по -високи концентрации показват инхибиране на растежа (Flowers & Colmer, 2008; Zhao et al., 2009; Ma et al., 2011), *Dactylis glomerata* показва характеристики на гликофит, но със сравнително висока толерантност към солеви стрес. Според някои публикации това е вид, който може да се причисли към факултативните халофити (Wrobel et al., 2006).

Данните за относително нарастване по дни отново демонстрират инхибиращия ефект на 0.17 M NaCl върху растежа на културите (фиг. 7). Стойностите почти не се променят в хода на третирането и остават значително по-ниски от тези на контролите и културите, третирани с 0.085 M NaCl. При контролите пикът на относителен растеж, който се наблюдава към десети ден от

на започналата диференциация и формиране на зрели соматични ембриоиди. Подобен ход на протичане на соматичната ембриогенеза е наблюдаван и документиран при различни растителни видове в суспензия (Dhekney et al., 2011; Márquez-Martín et al., 2011) и обобщено в Rose et al (Rose, et al., 2010). Получените резултати не се различават съществено от предходни изследвания върху Dactylis glomerata (Somleva et al., 2000; Tchorbadjieva & Odjakova, 2001). Повторното увеличаване на относителния растеж след 15 ден е индикация за рекалусиране и реактивиране на растежа, както и вероятно за адаптация на солево третираните култури. Допълнителното намаляване на растежа на контролите вероятно се дължи на изчерпване на хранителните ресурси в средата, както и на ограничението на обема. При контролите натрупването на свежа растителна маса е най-голямо и към края на третирането почти цялата хранителна среда е изпълнена с клетки.

Високите солеви концентрации инхибират или напълно блокират формирането на соматични ембриоиди. При култури, третирани с 0.17 M NaCl зрели ембриоиди не се наблюдават, или са съвсем малко (фиг. 8). Формирането на корени при *in vitro* тъканни култури (фиг. 6), третирани с високи солеви концентрации е свидетелство за стреса, на който са подложени културите и вероятно се дължи на репрограмиране на клетките от соматична ембриогенеза към органогенеза. По-големият относителен брой соматични ембриоиди при култури, третирани с 0.085 M NaCl е индикация за стимулиращия ефект на тази солева концентрация върху реализирането на ембриогенния потенциал (фиг. 8). Това е в съответствие с общото схващане, че ниски нива на стрес са необходимо условие за отключване на процеса на соматична ембриогенеза (Karami & Saidi, 2010; Zavattieri et al., 2010), както и с предишни данни за *Dactylis* (Odjakova et al., 1992) и данни за ориз (Kikuchi et al., 2006), *Arabidopsis* (Ikeda-Iwai et al., 2003) и морков (Kiyosue et al., 1989). Вероятно по-ниските стойности за относително нарастване на 15ти ден на културите, третирани с тази солева концентрация е свързано с по-интензивна диференциация и формиране на соматични ембриоиди (фиг. 7). Същевременно по-големият брой ембриоиди и по-малкото натрупване на свежа

растителна маса в сравнение с контролите потвърждават предишни изследвания, които показват избирателното инхибиране на растежа на неембриогенните клетки в сравнение с ембриогенните при ниски солеви концентрации (Odjakova, непубликувани данни).

5.1.2.Количество на ендогенния пролин като маркер за физиологичното състояние на суспензионните култури в условията на солеви стрес

Получените резултати за съдържанието на свободен пролин (фиг. 9) са в съответствие с достъпните литературни данни (обобщени в (Verbruggen & Hermans, 2008) и показват, че около двайсети ден на инкубация културите, третирани с 0.085 M NaCl са достигнали до ниво на физиологична адаптация, докато при по-високата сол се наблюдава постоянен стресов отговор. Увеличение на съдържанието на свободен вътреклетъчен пролин е често наблюдаван ефект, следствие на абиотичен стрес и по-конкретно при повишени солеви концентрации и засушаване (Mohammadkhani & Heidari, 2008; Gomes et al., 2010; Xiong et al., 2011; Bavei et al., 2011). Пролинът, освен като аминокиселина, участваща в изграждането на белтъците, е и важен метаболитен регулатор, който активира синтезата на редица гени, чиито продукти участват в антиоксидантната защита, а според някои данни има и директно антиоксидантно действие (Kaul et al., 2008). Основна негова функция е също така осмопротекцията в условия на воден дефицит (Vanková, 2012). Установено е, че освен увеличаване на вътреклетъчните нива, екзогенно добавеният пролин към солево-третирани *in vitro* култури на различни растителни видове също има положителен ефект върху преодоляване на стресовия фактор (Nounjan et al., 2012). Високите нива на пролин при култури, третирани с 0.17 M NaCl са индикация за сериозния абиотичен стрес, на който са подложени клетките и вероятно спомага за оцеляване на поне част от тях, както и за поддържане на сравнително запазения воден баланс – водното съдържание при тази солева концентрация почти не се променя в сравнение с контролите. Същевременно клетките не са в състояние да изпълняват нормално функциите си и не се наблюдава растеж и соматична ембриогенеза. Инхибиращ ефект на пролина върху растежа е наблюдаван при *Dactylis glomerata* (Somleva, 1995) и

глутатион за подходящи за натрупване на свежа растителна маса условия. За разлика от контролите и културите, подложени на ниска солева концентрация, културите, третирани с 0.17 M NaCl демонстрират високи концентрации на общ глутатион, независимо, че относителния растеж е значително подтиснат (фиг. 7 и 13). Затова предполагаме, че високите нива на общ глутатион при тази солева концентрация се дължат на солевия стрес, в потвърждение на данните на (Herbinger et al., 2002) и (Herschbach et al., 2010). Не трябва да се пренебрегва и факта, че *in vitro* култивирането само по себе си представлява стрес за растителните култури (Gaspar, et al., 2002), така че повишените нива на общ глутатион в контролите може да се дължи до голяма степен и на този стрес. Към двайсети ден на култивиране нивата на общ глутатион в контролите и при култури, подложени на нисък стрес намаляват близо и дори под началните нива, докато при високите солеви концетрации се запазват високи (фиг. 13). Предполагаме, че докато при 0.17 M NaCl стресът е прекалено висок, за да бъде преодолян, то при контроли и 0.085 M NaCl се наблюдава адаптация на културите. Това предположение се потвърждава от предишни изследвания за памук (*Gossypium hirsutum* L.) (Gossett et al., 1996), където солево-толерантните генотипове показват по-ниски концентрации на общ глутатион в сравнение с дивия тип, но противоречи на други (Tausz et al., 2004), според които устойчивите на стрес генотипове подържат високи концентрации на глутатион.

В литературата съотношението между редуцираната (GSH) и окислената (GSSG) форма на глутатион се счита за по-съществен показател, отколкото концентрацията на общ глутатион като цяло. Най-високи нива на GSSG (като процентно съотношение спрямо общ глутатион) се наблюдават на 15ти ден при контроли и култури, третирани с 0.085 M NaCl, което съвпада с формирането на зрели соматични ембриоиди (табл. 2). Тези данни са в потвърждение на схващането, че изместването към окислената форма на глутатиона е необходимо за протичане на клетъчна диференциация и късните фази на соматичната ембриогенеза (Belmonte & Yeung, 2004; Belmonte et al., 2005; Stasolla, 2010). Към 20ти ден тези нива падат, като единствено при култури, третирани с 0.17 M NaCl се покачват дори

повече. Понеже способността на клетките да подържат благоприятно съотношение между GSH и GSSG е от жизненоважно значение за оцеляването им и същевременно високата активност на ензима глутатион-редуктаза, който редуцира окислената форма се смята за важна стрес-толерантна характеристика (обзор на (Ashraf & Akram, 2009), неспособността на културите при тази солева концентрация да регулират успешно това съотношение предполага неспособността им да се справят със стреса.

Подобно, значително по-високите концентрации на свободен цистеин и цистин в култури, третирани с 0.17 M NaCl в сравнение с контролите след десети ден (фиг. 13) са допълнително свидетелство за подтискащото действие на тази солева концентрация върху растежа и соматичната ембриогенеза. Високи нива на свободен цистеин могат да бъдат очаквани при ниски нива на глутатион, в условия на оксидативен стрес, когато редуцирания глутатион се изчерпва или съотношението редуциран към окислен глутатион се измества към окислената форма (Kocsy et al., 2004). По отношение на солевия стрес, има данни за едновременно увеличаване на активността на ензимите, участващи в синтезния път на глутатиона и цистеина, или повишената им експресия (Ruiz & Blumwald, 2002). Следователно едновременното увеличение на концентрациите на глутатион и свободен цистеин в култури, третирани с 0.17 M NaCl може да се смята за характерен ефект на високата солева концентрация. Подобни резултати са наблюдавани при рапица, подложена на висока соленост (Ruiz & Blumwald, 2002). Увеличени нива на свободен цистеин са наблюдавани и при други типове абиотичен стрес като тежки метали (Ning et al., 2010; Roychoudhury et al., 2011).

За разлика от свободния цистеин, ролята на съответстващия му дисулфид цистин не е изяснена при растения. Едва в последно време има публикации, показващи увеличение на концентрациите му при лишеи, подложени на високи нива на стрес, макар че данните касаят микобионта в симбионтния организъм (Kranner, et al., 2005). За момента нямаме обяснение на високите нива на цистин и като процентно съотношение спрямо общата концентрация на свободен цистеин (табл. 3), макар че има данни, че цистина може да образува комплекси с едновалентни катйони и това го прави потенциален

участник в секвестирането на натриевите йони (Apruzzese et al., 2003). Това са изцяло *in silico* данни, които тепърва предстои да се проверят в растителни обекти.

В съвременната литература окислително-редукционния потенциал на двойката глутатион-окислен глутатион се счита за по-точен маркер за жизнеспособност, отколкото съотношението между глутатион и глутатион дисулфид (Kranner et al., 2006). В противоречие на достъпните литературни данни, в културите на *Dactylis glomerata* са установени по-високи стойности на $E_{GSSG/2\ GSH}$. Стойности от порядъка на -180 и -160 mV се считат за такива, при които се инициира програмирана клетъчна смърт в човешки (Schafer & Buettner, 2001), но също и в растителни клетки (Kranner et al., 2006). Над -160 mV вече е установена загуба на способност за неутрализиране на реактивни кислородни видове и некроза. В настоящото изследване при всички третирания, стойности, които вече се смятат за критични, са установени в началото на културационния период (фиг. 13), а към края са установени стойности от около - 150 mV, които би трябвало да се считат за сублетални. Подобни стойности са получени при семена от царевица (Dragičević et al., 2010), където началните данни са приблизително -160 mV и се покачват стремително до -115 mV при ускорено застаряване на семената.

Наблюдаваната връзка между продължителността на култивиране и стойностите на $E_{GSSG/2\ GSH}$ може да се дължи и на стреса, който *in vitro* култивирането по принцип представлява (Gaspar, et al., 2002). Подобно повишаване на окислително-редукционния потенциал може да се дължи на застаряване, поне на част от клетъчната популация. В крайна сметка предполагаме, че повишаването на стойностите на редукционния потенциал е нормално за суспензионни растителни клетъчни култури и е свързано с различните стадии на развитие, от микроклъстери през ПЕМ до зрели соматични ембриоиди (фиг. 14).

По отношение на окислително-редукционния потенциал на двойката цистеин-цистин, значението му при растителните организми почти не е коментирано. Това прави впечатление на фона на факта, че при животински клетки $E_{Cyss/2\ Cys}$ се разглежда наравно с $E_{GSSG/2\ GSH}$ по важност и драстични изменения в него се асоциират с различни заболявания и метаболитен дисбаланс (обзори от Go & Jones, 2008;

Jones & Go, 2011). В настоящото изследване данните за този редукционен потенциал са донякъде странни (фиг. 13). Дотолкова, доколкото високи стойности на окислително-редукционните потенциали, свързани с по-голяма пропорция на окислените форми се очакват при по-високи нива на стрес, данните за култури, третирани с 0.17 M NaCl в сравнение с контролите изглеждат нелогични. Ако разгледаме обаче общия окислително-редукционен потенциал на нискомолекулните тиолни съединения (фиг. 14), базиран на окислително-редукционните потенциали на двойките глутатион-глутатион дисулфид и цистеин-цистин и молните им концентрации (изчислен според (Birtić et al., 2011), изглежда че приноса на окислително-редукционния потенциал на цистеина не би следвало да се разглежда самостоятелно. Комбинираната окислително-редукционна среда обаче показва съществена корелация с данните за относителен и кумулативен растеж (фиг. 15) и изглежда, че приноса на двойката цистеин-цистин е по-скоро с важно регулаторно значение. В контроли и култури, третирани с ниска сол. $E_{thiol\text{-}disulfide}$ показва най-ниски стойности към десети ден, което съвпада с пика на натрупване на свежа маса (фиг. 7). С формирането на зрели соматични ембриоиди тези стойности се повишават значително, което пък отговаря на по-окислена среда по време на стадиите на диференциация. При култури, третирани с 0.17 M NaCl тези стойности са значително изместени към неблагоприятни области и това донякъде обяснява подтиснатият растеж и соматична ембриогенеза при тази солева концентрация. На база на сравнително високия принос на окислително-редукционния потенциал на двойката цистеин-цистин при солево третираните култури (фиг. 14) предполагаме, че тази двойка се явява като съществен регулатор на общия вътреклетъчен окислително-редукционен потенциал при стресов отговор.

5.2. Влияние на солевия стрес върху белтъците от клетъчна стена и хранителната среда на солево-третирани ембриогенни суспензионни клетъчни култури на *D. glomerata* L.

5.2.1.Общ белтъчен профил

Едновременно с различния ефект на ниската (0.085 M NaCl) и високата (0.17 M NaCl) солеви концентрации върху формирането на соматични ембриоиди, в суспензиите се наблюдава и различен ефект

върху белтъчните профили на 2D електрофореграмите. При култури, третирани с 0.17 M NaCl общото количество белтъчни петна както в хранителната среда, така и в клетъчната стена е значително намалено (фиг. 17). Подобно „изчезване" на белтъчни петна вероятно се дължи на екстремните условия на култивиране, определени от високата соленост на средата и следващия от това осмотичен шок. Подобни наблюдения са правени и преди (Dani, et al., 2005). Липсата на белтъци, които нормално се откриват при контроли и по-ниски солеви концентрации вероятно нарушава значително метаболизма на клетките и води до сериозно подтискане на растежа и блокира формирането на соматични ембриоиди (фиг. 7 и 8).

Концентрация от 0.085 M NaCl води до поява на нови белтъчни петна (фиг. 17). Това съвпада с наблюденията, че определени солеви концентрации могат да доведат до увеличение на относителното количество на редица белтъци от клетъчна стена (Zhang, et al., 2009). Трябва да се отбележи, че някои от белтъците, които не се наблюдават в клетъчна стена при култури, третирани с 0.17 M NaCl, се появяват в хранителната среда при тази солева концентрация. Именно белтъци с такова поведение представляват интерес като потенциално взимащи участие в отговора на солеви стрес и соматичната ембриогенеза.

От белтъците, които отсъстват от клетъчната стена в условия на солеви стрес при концентрации от 0.17 M NaCl могат да се отбележат три основни групи (фиг. 18). Групата на нискомолекулните и средномолекулните кисели белтъци е добре обособена. Редица белтъци, притежаващи подобни характеристики са разглеждани при *Dactylis glomerata* и ролята им в соматичната ембриогенеза е дискутирана в научната литература. Такива белтъци включват алфа-амилаза (48 kDa, pI 5,2) и цистеин протеинази (36 kDa, pI 4,0-5,0) (Rakleova et al., 2010), хитиназо-подобен белтък (32 kDa, кисела pI) (Tchorbadjieva & Pantchev, 2006), кисела естераза (36 kDa, pI 3,8) (Tchorbadjieva & Odjakova, 2001) и неспецифични липид-пренасящ подобни белтъци (11-12 kDa, pI 4,3-6,4) (Rakleova et al., 2008). До голяма степен ролята на белтъци с подобни характеристики в развитието на соматичните ембриоиди е широко дискутирана в цитираните публикации и резултатите ни потвърждават предходните

изследвания. Срещу част от тези белтъци са изработени моноклонални антитела посредством фагов дисплей, които могат да се използват като маркери за ембриогенен потенциал. Поради тази причина се насочихме към тези белтъци с pI в алкалната pH област.

Специфичното поведение на белтъка, условно означен като b21, средно-молекулен белтък с алкална изоелектрична точка – миграция от клетъчната стена към хранителната среда при високи солеви концентрации, когато соматичната ембриогенеза е подтисната предполага неговата роля в този процес. Възможно е преминаването на този белтък в хранителната среда да се дължи на нарушаване на йонните връзки, които подържат белтъка свързан с клетъчната стена в следствие на високата йонна сила на суспензионния разтвор. Здравината на йонните връзки, с която редица белтъци са свързани с клетъчната стена може да се влияе от различни фактори. Henzel и сътрд. показват, че един и същ белтък може да бъде изолиран от клетъчната стена при 0.05 M NaCl при култури без ауксин, но в хранителна среда с прибавен ауксин е необходима концентрация от минимум 0.25 M NaCl (Hensel et al., 2002). Макар и проведен *in vitro*, горепосоченият експеримент показва, че високата концентрация на сол в средата може да действа като "елуиращ" фактор за част от йоносвързаните с клетъчната стена белтъци в суспензионни култури. Преминаването на белтъка в хранителната среда при високите солеви концентрации вероятно има отношение към загубата на ембриогенен отговор при тези солеви концентрации.

Селектираните моноклонални антитела след четвърти рунд на селекция с фаговата библиотека показват сходна специфичност на разпознаване, което ни даде основание да изберем за по-нататъшни изследвания един от тези клонове. Докато имуноблот анализите с антитела, свързани със „спасени" фагови частици не дават задоволителни резултати (фиг. 19) – разпознават се около 10 различни белтъчни петна, то имуноблот анализите с антитела в разтворим вид разпознават само една фракция – с електрофоретична подвижност, отговаряща на антигена b21 в клетъчна стена и още една, допълнителна, която отговаря на електрофоретичните характеристики на друг потенциално-свързан със соматичната ембриогенеза белтък, b5. Разпознаването на още една, ниско-молекулна фракция,

предполага сходни епитопи на двете фракции, което може да се дължи на сходни функции на двата белтъка и принадлежността им към един и същи клас белтъци. Друго възможно обяснение е мултимерния строеж на b21. В крайна сметка смятаме, че получените антитела имат висока специфичност и могат да бъдат използвани за мониторинг на култури за ембриогенен потенциал. Изследванията, насочени към изолиране на антигена за scFv6 в пречистен вид посредством имобилизирано антитяло също дават резултати (фиг. 20), които да позволят получаването на белтъчната фракция в достатъчно висока концентрация за провеждане на протеомни изследвания.

Приложението на фаговия дисплей в растителната молекулярна биология не е нов подход. Съществуват редица библиотеки с антитела срещу растителни антигени, които частично или изцяло са получени посредством фагов дисплей (Bernal & Willats, 2004; Willats, 2002). Освен основното предимство на този подход – избягва се необходимостта от имуногенност на антигена и това, че всички процедури по селекция се провеждат *in vitro*, методичния подход, използван в настоящата работа е допълнително подобрение на методиката. Използването на имобилизиран върху нитроцелулозна мембрана антиген, предварително разделен на двумерна електрофореза изключва необходимостта от пречистване на голямо количество от желания антиген, което не винаги е възможно. Подходът е разработен в лабораторията по растителна молекулярна биология към катедра Биохимия, СУ (Petkova et al., 2005) и е описан и от други автори (Nakamura et al., 2001).

Търсене по молекулна маса (72 000 Da +/- 20%) и изоелектрична точка (9-10) в TagIdent търсачката на ExPASy не даде резултати за *Dactylis glomerata*. Отрицателен резултат дава и търсенето за b5 при молекулна маса 33000 Da +/- 20% и pI 8-9. Повторени търсения при същите параметри в бази данни за пшеница и ориз дават съответно 2 и 69 резултата в Swiss-Prot. Като най-близък по характеристики до неизвестния белтък от *Dactylis glomerata* е резултата за матураза K, който освен това се повтаря и за двата вида, за които са намерени резултати. Ензимът е с молекулна маса около 62 kDa и изоелектрична точка 9.4 и има роля в сплайсинга на интрони в

хлоропластния и пластиден геном. Не считаме, че е целесъобразно да се правят заключения за природата на неизвестния белтък, обект на настоящото изследване на база единствено на електрофоретичните му характеристики. В базата данни UniProtKB към момента има публикувани 65 белтъка от *Dactylis glomerata* с пълна или частична информация, като по-голяма част касаят различни групи алергени и това не дава възможност за изчерпателна идентификация на белтъка, обект на настоящото изследване. По принцип опитите за идентификация на белтъци от видове, които нямат напълно секвениран геном е силно затруднено и не дава заключителни резултати.

Липсата на секвениран геном на *Dactylis glomerata* се оказва съществен проблем и при тълкуването на резултатите от масспектрометричния анализ (табл. 4). Приложението на протеомен анализ за идентифициране на белтъци от видове, повече или по-малко отдалечени филогенетично от такива със секвениран геном е широко-дискутирано в научните среди, но за момента развитието на масспектрометрията не дава задоволителни резултати в тази насока (обзор от Liska & Shevchenko, 2003). Досегашните изследвания върху филогенетичната близост на *Dactylis glomerata* с останалите, широко-изследвани представители на семейство Poaceae демонстрират сравнителната му отдалеченост от културните видове (Bouchenak-Khelladi, et al., 2008). Резултатите от масспектрометричния анализ и „мас-фингърпринт" анализа (фиг. 21, 22) не трябва да се считат за изчерпателни или окончателни. Намерените сходства с два белтъка все пак дават насоки за анализ. Изключихме MADS box транскипционния фактор поради допускането, че не можем да очакваме наличието му в клетъчната стена или в хранителната среда на суспензионните култури и се съсредоточихме върху сходствата със серин-треониновата протеин киназа SAPK6. За тази протеин киназа, чиито хомолог е установен и в царевица се счита, че се активира от хиперосмотичен стрес (International Rice Genome Sequencing Project, 2005). Предполагаме, че е възможно изследвания белтък b21 да има сходни домени с други серин-треонинови кинази и да изпълнява такава функция в клетъчната стена. Серин/треонинова протеин киназна активност е установена при различни, асоциирани с

клетъчната стена растителни рецепторени протеин кинази (Decreux & Messiaen, 2005). Въпреки, че протеин киназите са предимно мембранно-асоциирани и цитоплазмени белтъци (Dissmeyer & Schnittger, 2011), в последните години се появиха доста публикации, касаещи асоцииранитe с клетъчната стена протеин кинази (WAK). Това белтъчно семейство се разглежда като най-вероятните потенциални кандидати за потенциални сензори в клетъчната стена, които възприемат различни сигнали и отключват вътреклетъчни каскади, които са свързани с отговора на различни влияния (Decreux & Messiaen, 2005; Anderson et al., 2001). До момента са идентифицирани 26 WAK или WAK-подобни гени в *Arabidopsis* (Verica & He, 2002). Броят при едносемеделни е значително по-голям - 125OsWAKs гени са идентифицирани при ориз, значителна и една от малкото експанзии на генни фамилии в едносемеделни (Zhang et al., 2009). Ролята на WAKs в защитата срещу патогени в ориз е известна (Li et al., 2009), но е предложено и участието им в отговора на абиотичен стрес. Всички те имат цитоплазмен серин/треонин киназен домен, в това число и SAPK6 (Kobayashi et al., 2004). Затова предполагаме, че не е невъзможно белтъка b21 да има подобни структура и функция на вече известни WAKs в други растителни видове.

Ако приемем, че белтъка b21 е WAK-подобен белтък, то предлагаме следната хипотеза. При 0.085 M NaCl b21 се активира в отговор на стреса и активира сигнални каскади, които също отговарят и за реализиране на ембриогенния потенциал. Това обяснява позитивния ефект на тази солева концентрация върху соматичната ембриогенеза. При 0.17 M NaCl връзките между b21 и клетъчната стена се нарушават и той мигрира в хранителната среда. Следователно активацията му не се осъществява правилно и това води до нарушаване на растежа, подтискане на соматичната ембриогенеза и неспособността на клетките да се адаптират успешно към високите солеви концентрации.

Друга възможна хипотеза за ролята на b21 касае възможността за наличие на извънклетъчна система на контрол чрез фосфорилиране и дефосфорилиране. Екстрацелуларната фосфорилизационна мрежа е предположена при *Arabidopsis*, където са идентифицирани сайтове на фосфорилиране в ксилоглюканаза,

лектин-подобна рецепторна киназа и хитиназа (Ndimba et al., 2003). Това корелира с данни за активността на кисели фосфатази (Zagorchev et al., 2008). За разлика от вътреклетъчните форми, апопластните кисели фосфатази показват широка субстратна специфичност и е възможно да дефосфорилират различни белтъци, което води до модификация както на структурата, така и на функцията на тези белтъци (Kaida, et al., 2010). В тази връзка повишената концентрация на AGP в солево-третирани култури (фиг. 23) може да се дължи на модифицираното действие на фосфолипази, режещи фосфатидил-инозитолната котва или на ендохитинази, режещи GlcNAc и Glc остатъци, а действието на тези ензими би могло да бъде модулирано от извънклетъчни кисели фосфатази и протеин кинази от типа на WAK. Тези процеси вероятно се индуцират от осмотичния стрес и имат пряко отношение към протичането на соматичната ембриогенеза.

5.2.2.Арабиногалактанови белтъци

Арабиногалактановите белтъци нееднократно са посочвани като основни регулатори на соматичната ембриогенеза, като с особена сила това се отнася за тези, които се освобождават в хранителната среда в суспензионни култури (Kreuger & Holst, 1993). Тази функция се отключва при специфично срязване на олигозахаридния остатък от ендохитинази (van Hengel et al., 2001). Количествените данни в настоящото изследване не потвърждават подобно схващане (фиг. 23). Увеличението на AGPs в хранителната среда се наблюдава при култури, третирани с висока сол, при които соматичната ембриогенеза е почти изцяло блокирана. При култури, третирани с 0.085 M NaCl се наблюдава дори леко намаляване на количеството, което може да се обясни с известна адаптация към дадената солева концентрация. Подобен ефект е наблюдаван при солево-адаптирани клетъчни култури на тютюн (Zhu et al., 1993). Рязкото увеличение на AGPs в хранителната среда при по-високи концентрации потвърждава данните на (Lamport et al., 2006; Lin et al., 2011). Слабото намаляване на количеството на AGPs в клетъчната стена с увеличаване на солевата концентрация донякъде може да се дължи на регулаторен механизъм, при който AGPs се освобождават в междуклетъчното пространство, в случая в хранителната среда. Подобен механизъм е

предложен за AGPs, намиращи се в клетъчната мембрана и свързани с гликозилфосфатидил инозитолна котва (Lamport et al., 2006). Намаляването на количеството на AGPs в клетъчната стена обаче не е достатъчно, за да обясни драстичното им увеличение в хранителната среда при култури, третирани с 0.17 M NaCl (фиг. 23). Следователно това увеличение би следвало да се дължи или на de novo синтеза или на AGPs, идващи от клетъчната мембрана. Предполагаме, че увеличението на AGPs в хранителната среда при по-високите солеви концентрации се дължи главно на солевия стрес и отговора към него. От своя страна подобни високи концентрации на AGPs имат по-скоро инхибиращ ефект върху соматичната ембриогенеза и растежа на културите. С това увеличение донякъде може да се обясни и наблюдаваното формиране на корени при тази солева концентрация (фиг. 6). Ролята на AGPs в кореновото нарастване е предложена и преди (Ding & Zhu, 1997).

Високите нива на AGP предполагат активен въглехидратен метаболизъм, който да осигури прекурсори за олигозахаридните остатъци, които формират голяма част от AGP молекулите. Има данни, че високи нива на захароза индуцират освобождаването на AGP в хранителната среда на суспензионни култури на *Beta vulgaris* (Capataz-Tafur et al., 2010). При настоящата експериментална система захарозата е основен, екзогенно добавен в хранителната среда, въглехидратен източник за развитие на културите. Способността на клетките да я усвояват, както и съотношението между хексозите и захарозата са от критично значение за развитието на ембриоидите (Iraqi & Tremblay, 2001). Предишни изследвания на лабораторията показаха, че докато при ниските концентрации на NaCl се наблюдава намаление в активността на киселите инвертази (ЕС 3.2.1.26), то при високите концентрации NaCl се увеличава общата инвертазна активност както в клетъчната стена, така и в хранителната среда (Zagorchev et al., 2007). Това увеличение, освен, че има пряко отношение към съотношението хексози:захароза и усвояването на захарозата от клетъчната стена, вероятно има значение и за увеличеното количество на AGPs в хранителната среда.

Оцветяването на AGPs с Ярив реагент след проведена белтъчна електрофореза (фиг. 24) не показва достатъчно ясен сигнал и чувствителността е сравнително ниска, но все пак е видно, че по-голямата част от AGPs са високомолекулни протеогликани – с молекулна маса над 200 kDa. Това се отнася както за AGPs в клетъчната стена, така и за такива в хранителната среда. Данните до голяма степен потвърждават количествения анализ. Известно е, че AGPs са хетерогенна група от протеогликани, като белтъчната съставка често представлява по-малко от 10% от цялата молекула, докато останалата част е съставена от силно разклонени и хетерогенни олигозахаридни остатъци (Ellis et al., 2010). Подобна електрофоретична подвижност е дискутирана и преди (Lee K. , et al., 2005), където AGPs се разполагат като неясна фракция на границата между разделящия и концентриращия гел при оцветяване с Ярив реагент, но също така и при проведени имуноблот експерименти. Според други данни AGPs представляват дифузна фракция с широк диапазон на молекулната маса – от 37 до 250 kDa (Qin & Zhao, 2006; Yang et al., 2011). В настоящите експерименти установяваме дори по-големи молекулни маси на AGPs от хранителната среда, което е видно от проведените нископроценти акриламидни електрофорези на вече пречистена фракция AGPs (фиг. 25). Дифузността на фракцията и затрудената електрофоретична мобилност вероятно се дължат на микрохетерогенността на въглехидратните остатъци (Tryfona, et al., 2010; Hijazi et al., 2012).

Секрецията на AGPs, разпознавани от JIM8 и JIM13 в хранителната среда се индуцира от солевия стрес (фиг. 26, 27 и табл. 5). Независимо, че AGPs участват в почти всички аспекти на растежа и развитието на растенията, молекулните механизми на тяхното действие не са изяснени. Експерименти, проведени върху клетъчни култури на морков (*Daucus carrota*) демонстрират наличието на AGPs в ембриогенни линии и липсата им в слабо-ембриогенни или неембриогенни (McCabe et al., 1997). Предварителни изследвания на лабораторията показват, че ниските солеви концентрации блокират апоптозата в суспензионни култури на *Dactylis glomerata* (Atanasov & Odjakova, 2005). Понеже подобна роля е показана и за AGP (Chaves et al., 2011), то можем да предположим, че ролята на AGP в процеса на

соматична ембриогенеза е свързан с предотвратяване на програмираната клетъчна смърт при ниски солеви концентрации.

Антитялото JIM8 разпознава епитопи, съдържащи голямо количество галактозилни, арабинозилни и рамногалактуронанови остатъци. За антитялото JIM13 епитопа е β-D-GlcpA-(1→3)-α-D-GalpA -(1→2)-L-Rha мотиф и вероятно още един, засега неизвестен (Yates, et al., 1996). Наличието на различни разпознавани епитопи може да доведе до наблюдаваните различни белтъчни ивици след електрофореза (фиг. 26 и 27). JIM12 антитялото е селектирано срещу екстензин от морков и разпознава белтъчен епитоп или нетерминална олигозахаридна структура (Smallwood, et al., 1994). Макар екстензините да се разглеждат основно като структурни компоненти на клетъчната стена при растения (Cannon, et al., 2008), откриването на разтворими екстензини в хранителната среда не е изолиран случай. Подобни данни са показани за клетки от тютюн, гледани в суспензионна култура, като молекулната маса на белтъчната съставка е определена на 42 kDa (Kawasaki, 1989). Предполагаме, че наличието на ниско-молекулна фракция, разпознавана от JIM12 в хранителната среда (фиг. 26) се дължи на специфично срязване на екстензини от екстензин-специфична протеаза, която се секретира в междуклетъчното пространство. Този процес може би се индуцира от солевия стрес и има отношение към соматичната ембриогенеза. Освен че са белтъци, участващи в повечето основни процеси от растежа и развитието на растенията (Zhang et al., 2008), екстензините също така е показано, че се индуцират от редица биотични и абиотични стресови фактори (Ribeiro et al. 2006; Jothi et al., 2010). В настоящото изследване смятаме, че разпознаваната от JIM12 фракция с молекулна маса от 43 kDa може да се смята за маркер за стресов отговор и стресова адаптация в суспензионни култури на *D. glomerata*.

Подобната картина на имуноблот след електрофореза в редуциращи условия (фиг. 27) за всички три антитела предполага еднакви епитопи на разпознаваните молекули. Понеже антителата са селектирани срещу въглехидратни епитопи предполагаме, че е възможно при разпознаване да не се забелязва разлика между отделни AGP. Това е често цитиран проблем при всички експерименти, включващи моноклонални антитела срещу въглехидратни епитопи на

протеогликани, но повечето антитела са насочени именно срещу такива. Съществуват твърде малко антитела, разработени срещу белтъчната сърцевина (Yang et al., 2011). Допълнителен проблем е вероятността да се наблюдава различно гликозилиране на един и същи генен продукт в различните тъкани в рамките на един растителен вид – например при *Arabidopsis* AtAGP17 и AtAGP19 показват подобни различия (Yang et al., 2011). Има данни и за разпознаване на различни фракции от антитела, насочени срещу един и същ въглехидратен епитоп – например JIM4 и JIM13.

Докато JIM8 и JIM13 са насочени срещу AGP с подобни характеристики, JIM12 разпознава екстензини. Това, че трите антитела разпознават подобни фракции донякъде противоречи на очакванията. Това може да се обясни с факта, че при едносемеделни растения екстензин-подобните гликопротеини фактически се разглеждат като молекулни химери, притежаващи характеристики на екстензини и на AGP. Тези данни се потвърждават и от биоинформатични изследвания (Showalter, et al., 2010). Следователно е възможно да очакваме, че трите използвани антитела ще покажат подобна или еднаква картина на разпознавани фракции.

Разликите в картината след денатуриращa електрофореза в редуциращи и нередуциращи условия предполагат наличието на дисулфидни мостове в изследваните белтъци. До момента е известно наличието на некласически AGP, които са богати на цистеинови остатъци. Те се включват в суперсемейството на AGP, но много малко от тях са изолирани и характеризирани (Showalter, 2001). До момента не можем да сме категорични, дали разпознатите нискомолекулни фракции в редуциращи условия са получени след редуцирани на дисулфидни мостове в некласически цистеин-богати AGP, или става дума за друг тип взаимодействие, при което се откриват епитопи по повърхността на молекулата.

По-голямата част от нискомолекулните фракции, разпознавани от антителата се откриват в солево-третираните култури, докато в контролите те или липсват, или са едва забележими (фиг. 27). Следователно можем да смятаме, че експресията или отделянето в хранителната среда на тези молекули е солево-индуциран процес. Тези данни съвпадат с данните от количествения анализ на AGP в хранителната среда (фиг. 23).

Важността на AGP за процеса на соматична ембриогенеза е дискутиран широко в достъпната литература. При *Daucus carrota* е установено, че соматичната ембриогенеза в суспензионни култури се регулира строго от характеристична група AGP, освобождавани в хранителната среда (Quiroz-Figueroa et al., 2006). Предположена е сигнална роля на AGP, която се отключва или допълнително се индуцира от специфично срязване на GlcNAc и Glc остатъци от ендохитинази (van Hengel et al., 2001). Също така е демонстрирано и че добавянето на AGP към културалната среда увеличава соматичната ембриогенеза (Letarte et al., 2006) и регенерационния потенциал (Coskun et al., 2010) при *in vitro* култури на пшеница. Специфичното блокиране на действието на AGP от клетъчна стена и секретираните такива с Ярив реагент води до инхибиране на формирането на соматични ембриоиди (van Hengel et al., 2001) и програмирана клетъчна смърт (Gao & Showalter, 1999; Chaves et al., 2002; Guan & Nothnagel, 2004). Предполагаме, че появата на ниско молекулни AGP в хранителната среда на култури, третирани с 0.085 M NaCl (фиг. 26) има отношение към стимулирането на соматичната ембриогенеза, което се наблюдава при тези култури, но допълнителното увеличаване на количеството на AGP при по-високи солеви концентрации е по-скоро стресов отговор. Вероятно подтискането на ембриогенезата при по-високите солеви концентрации се дължи на други фактори, които не могат да бъдат преодолени.

5.2.3.Имунолокализация на хидроксипролин богати белтъци

Липсата на флуоресцентен сигнал в клетки при имунофлуоресцентен анализ (фиг. 28) с JIM12 и сравнително ниския сигнал, който се получава с JIM8 антителата корелира с резултатите от имуноблотовете (фиг. 26 и 27). Увеличения сигнал с JIM13 при солево-третирани култури може да се дължи на фракциите с молекулни маси от 70 и 73 kDa, които се разпознават в клетъчна стена на имуноблот (фиг. 26). Увеличения сигнал с JIM8 е в съгласие със скорошните изследвания на Boughanmi и сътрд., за разлика от резултатите за JIM13. Докато нашите резултати показват значитено увеличение на сигнала при солево третиране за това антитяло, в цитираните изследвания се наблюдава силно инхибиране на JIM13 епитопите (Boughanmi, et al., 2010). Функцията на JIM8 епитопите при

стресов отговор е известна (van Hengel et al., 2001), но също така те се считат и за маркери за ембриогенен потенциал (Toonen & De Vries, 1996). Тези данни подкрепят увеличената експресия на JIM8 епитопите в култури, третирани с 0.085 M NaCl. Наличието на сигнал с JIM8 в областите на междуклетъчните контакти пък показват възможната им роля в клетъчната агрегация, друга функция, докладвана за AGP като цяло (Capataz-Tafur et al., 2011).

Ролята на JIM13 епитопите в отговора на солеви стрес и адаптация се потвърждава от увеличената им експресия при култури, третирани с 0.085 M NaCl (фиг. 28). Особеното разпространение на тези епитопи може също да се отнесе към индуцираната соматична ембриогенеза при тази солева концентрация (фиг. 8). По принцип ембриогенните клетъчни култури на *D. glomerata* съдържат клетки с различна морфология като малки изодиаметрични, удължаващи се и удължени (саламести или банановидни). С експресионен анализ по SERK гена като маркер за ембриогенен потенциал е установено, че такъв притежават основно изодиаметричните клетки с плътна цитоплазма, макар че иРНК на SERK е установена и при останалите типове клетки (Somleva et al., 2000). Особеното и плътно разпределени на JIM13 епитопите по повърхността на тези клетки може да бъде отнесено към способността им да бъдат насочени към соматична ембриогенеза. JIM13 епитопите обикновено се свързват с про-ембриогенните клетки, но не се откриват при зрелите ембриоиди, или при такива в по-късни стадии на развитие (Namasivayam, et al., 2010). За JIM8 епитопите същите автори не откриват подобна зависимост. За тях се смята, че характеризират ембриогенния потенциал на културата като цяло, но не са характеристични за определен тип клетки (Toonen & De Vries, 1996). Получените данни за *D. glomerata* до голяма степен са в съгласие с тези разбирания. Различното им разпределени в различни клетъчни типове потвърждават данните, че различните AGP епитопи се експресират в различни клетъчни популации и на различни етапи от развитието. Макар данните да не са в пълно съгласие с досегашните данни за всяко отделно антитяло, тези различия могат да се обяснят със схващането, че дадени AGP епитопи не се срещат задължително в едни и същи клетъчни типове при различните растителни видове (Knox, 2006).

Прави впечатление пълната липса на разпознавани JIM12 епитопи във всички изследвани клетъчни популации (фиг. 28), което противоречи на разпространеното схващане, че екстензините са предимно структурни протеогликани от клетъчната стена (Cannon, et al., 2008). Нашите изследвания показаха, че JIM12 антитялото разпознава изключително фракции, които се секретират в хранителната среда. Данни за разтворими екстензини съществуват в литературата (Kawasaki, 1989), макар да са малко и не напълно изяснени. При изследваните култури екстензините в клетъчна стена следва да са или с различни епитопи от тези, разпознавани от JIM12, или пък са маскирани от други структурни компоненти и недостъпни за антитялото при имунолокализационните анализи.

5.2.4.Експанзини

Макар да е дискусионно дали да се разглеждат като ензими или като друг тип реструктуриращи клетъчната стена белтъци, експанзините се считат за основен модулиращ растежа и развитието клас белтъци (Cosgrove, 2000). Взаимодействието с целулозните микрофибрили и отговора, който се очаква, са изключително бързи, в рамките на секунди (Durachko & Cosgrove, 2009). Тези очаквания се потвърждават от получените данни (фиг. 29), макар кривите на взаимодействие да не следват идеална експоненциална линия. Този факт може да се обясни с обстоятелството, че при проведените изследвания са използвани тотални екстракти от йоносвързани с клетъчната стена белтъци, а не пречистени експанзини, което предполага наличието на други, модулиращи клетъчната стена компоненти. С повишаване на солевата концентрация намалява и отговора на фрагментите от клетъчна стена (фиг. 29), което съвпада с данните за кумулативен растеж (фиг. 7) и предполага, че солевият стрес инхибира растежа. Ефекта се различава както по абсолютна стойност, така и по времевия интервал, в който възниква. От изследванията, проведени върху клетъчни стени на различни експериментални обекти е видно, че най-високи стойности на ефекта са характерни за филогенетично близката до *Dactylis glomerata* пшеница (фиг. 29B), като този ефект постепенно намалява през царевица до двусемеделния слънчоглед, макар все още да се запазва. Допълнително свидетелство за филогенетичното влияние върху

активността на експанзини е формата на кривата, която е най-изчистена при пшеница.

От изследванията, проведени върху аналози на клетъчна стена – чиста целулоза и комплекс целулоза/пектин/ксилоглюкан (фиг. 29Г и Д) съдим, че макар експанзините да се свързват и да модифицират структурата на целулозните микрофибрили, чистата целулоза не е достатъчен субстрат за проява на това действие. По литературни данни експанзините се разделят на два основни класа – α и β, като за едносемеделни са характерни β експанзините (Lee et al., 2001). Филогенетичната разлика дава малки, но все пак съществени разлики в активността им. Тези данни допълнително се потвърждават от експериментите, включващи прилагане на α-експанзини от домат върху клетъчна стена на *Dactylis glomerata* (фиг. 30), при което активността е относително по-ниска, отколкото при предходните експерименти. Интересно е да се отбележи, че макар солевият стрес да инхибира значително активността на експанзините, клетъчната стена остава достъпна за това действие и дори се наблюдава по-голяма склонност при култури, третирани с 0,17 M NaCl (фиг. 30). Намаляване на експресията на β-експанзини е установено при солево-третирана царевица, но само при чувствителни генотипове, докато солево-толерантните запазват нивата на експресия на експанзини (Geilfus et al., 2010; Geilfus et al., 2011). Различна чувствителност на клетъчни стени към действието на експанзини също са документирани и преди при едносемеделни растения (Sasayama et al., 2011).

Разликите, установени в настоящия експеримент вероятно се дължат поне отчасти на различната ацетилестеразна и пектинметилестеразна активност в солево-третираните култури (фиг. 33 и 34). Това, което предполагаме на база на получените данни е, че при високите солеви концентрации намаленият растеж (фиг. 7) се дължи на ниската експресия на експанзини, или на експресията на различен, по-малко активен клас експанзини. Същевременно обаче се увеличава чувствителността на клетъчната стена чрез реструктуриране на въглехидратните компоненти, което дава възможност при благоприятни условия клетките да отговорят бързо и да започне клетъчна експанзия.

Намалената активност на експанзини в тотален белтъчен екстракт се потвърждава от експеримента, при който се получават пречистени експанзини. Количеството експанзини при различните солеви концентрации намалява с увеличаване на концентрацията NaCl, но от друга страна при изравнено количество на пречистени експанзини се наблюдава точно обратния ефект (фиг. 32). Експанзините в солево-третираните култури показват по-висока активност от контролите. В литературата има данни, че солевият стрес може да предизвиква експресия на различни изоформи на експанзините, които се различават по своята активност (Geilfus et al., 2010).

Действието на експанзините по дни потвърждава схващането (фиг. 31), че към пети и десети ден на култивиране се наблюдава усилен растеж и клетъчно делене, докато между десети и петнайсети ден диференциация и формиране на зрели соматични ембриоиди. Пиковете на активност на експанзините съвпадат с периода, когато се наблюдава най-висок относителен растеж при контроли и култури, третирани с 0.085 M NaCl (фиг. 7), докато в периода на формиране на ембриоидите ниската активност на експанзините осигурява по-ригидна клетъчна стена. Културите, третирани с 0.17 M NaCl не показват съществени разлики в активността на експанзини, както и в относителния растеж по дни. Това потвърждава схващането, че високите солеви концентрации блокират растежа и развитието и клетъчната стена е сравнително ригидна структура, което е необходим и често срещан стресов отговор (Sella Kapu & Cosgrove, 2010). Съвкупността от сравнително по-активни изоформи на експанзините и по-високата чувствителност на клетъчната стена към добавени екзогенни експанзини обаче ни дава право да предположим, че част от адаптационния отговор на културите е запазването на възможността за бърза реакция при премахване на стресовия фактор и запазената им способност да растат и да се делят при по-благоприятни условия.

5.2.5.Ацетилестерази и пектинметилестерази

Зимограмният анализ (фиг. 33 и 34) на тези два ензима показва ясна връзка между солевия стрес и активността на отделните изоформи. Прави впечатление пълната липса на пектинметилестерази

в хранителната среда при всички третирания, както и в клетъчната стена на контролните култури, което предполага, че тези ензими имат съществена роля в реструктурирането на клетъчната стена в процеса на отговор на солевия стрес. Според литературните данни повишената активност на пектинметилестеразите има роля в стабилизирането на пектиновата мрежа, с което пък се инхибира клетъчната експанзия (Wolf & Greiner, 2012). Появата на тези ензими в солево-третираните култури корелира с намаления растеж (фиг. 7), особено при култури, третирани с 0.17 M NaCl. Прави впечатление също така, че се открива една единствена изоформа, докато в по-голяма част от достъпните публикации изоформите са значително повече (Saher et al., 2005; Thonar et al., 2006; Paynel et al., 2009). Според последни данни, получени при проекти по секвениране на геноми в *Arabidopsis* са установени 66 гена, потенциално кодиращи пектинметилестерази. При едносемеделните, например при *Oryza sativa* този брой е значително по-малък – 35 (International Rice Genome Sequencing Project , 2005). Тези данни не следва да се считат за заключителни, понеже голяма част от тези гени може би не се експресират до краен продукт, а и експресията вероятно е клетъчно и тъканно специфична, както и зависима от етапа на развитие. Наличието на една единствена изоформа в настоящото изследване може да се обясни и с факта, че повечето изоформи на белтъчно ниво са доказани след изоелектрично фокусиране в горепосочените публикации. Видно е обаче, че тези ензими са много по-слабо застъпени при едносемеделни, в това число *Dactylis glomerata,* което се обяснява със сравнително по-ниското съдържание на пектин в клетъчната стена на едносемеделни (Caffall & Mohnen, 2009).

По-голям интерес будят резултатите, получени за ацетилестеразните изоформи (фиг. 33). Активността им в клетъчна стена също е в пряка зависимост от приложения солеви стрес и вероятно също има отношение към стресовия отговор и реструктурирането на клетъчната стена при този отговор. Според литературните данни ацетилестеразите могат да проявяват активност и към други олиго и полизахаридни субстрати освен пектин (Orfila et al., 2012), което обяснява по-голямото им представяне в суспензионни култури на *Dactylis glomerata* в сравнение с пектинметилестеразите

(фиг. 34), както и наличието им в хранителната среда, докато другия клас ензими изглежда са локализирани единствено в клетъчната стена. Тази широка субстратна специфичност може да има отношение както към въглехидратния метаболизъм като цяло, така и да оказва влияние върху редица сигнални процеси, свързани с олигозахаридни компоненти. Увеличената относителна активност на изоформата с молекулна маса 37 kDa както в клетъчна стена, така и в хранителната среда при култури, третирани с 0.085 M NaCl (фиг. 33) може да има отношение към стимулираната соматичната ембриогенеза при тази солева концентрация (фиг. 8) Различни кисели естерази нееднократно са цитирани като маркери за соматична ембриогенеза, които отличават ембриогенните от неембриогенните линии при различни растителни видове, в това число и *Dactylis glomerata* (Tchorbadjieva & Odjakova, 2001).

Заключение

Солевият стрес, предизвикан от различни концентрации на NaCl има различен ефект върху суспензионните култури на *Dactylis glomerata*. Ниските солеви концентрации имат стимулиращ ефект върху соматичната ембриогенеза, като не променят съществено съдържанието на нискомолекулни антиоксиданти и осмопротектанти. Високите солеви концентрации значително инхибират натрупването на свежа растителна маса и формирането на ембриоиди, като същевременно водят до увеличение в концентрациите на свободните аминокиселини—цистеин и пролин, както и в процентното съдържание на глутатион-дисулфид спрямо общото съдържание на глутатион. Инхибирането на соматичната ембриогенеза при 0.17 M NaCl вероятно се дължи на отклоненията в окислително-редукционния потенциал на нискомолекулните тиолни съединения, който съществено се различава от този, установен при контролите и културите, третирани с 0.085 M NaCl. При тях е установено, че през фазите на интензивно натрупване на растителна маса окиселително-редукционния потенциал на вътрешната среда има по-ниски стойности (по-редуциращи условия), докато в етапите на формиране на зрели соматични ембриоиди има по-високи стойности (по-окислителна среда).

Солевият стрес води и до значителни различия в белтъчните профили на културите, което има отношение към реализирането на ембриогенния потенциал. На база на електрофоретичната им подвижност и поведението при различни солеви концентрации са предположени няколко белтъка с изоелектрична точка в алкалната област, които имат роля в процеса на соматична ембриогенеза. Срещу един от тях е получено моноклонално антитяло и е идентифициран като вероятно серин/треонинова протеин киназа. Влиянието на солевия стрес върху основните класове белтъци от клетъчната стена е съществено и вероятно има отношение към етапите на развитие и соматичната ембриогенеза. С прилагане на различни концентрации NaCl се повишава количеството и се откриват нови изоформи на арабиногалактановите белтъци, за които се предполага съществена роля в соматичната ембриогенеза. Същевременно се увеличава активността на различни естерази и намалява общата активност на експанзини, което има пряко отношение към структурата на клетъчната стена. Промените при 0.17 M NaCl вероятно водят до по-ригидно състояние на клетъчната стена, което нарушава процесите на клетъчна експанзия и последващо формиране на соматични ембриоиди.

6. Изводи

Въз основа на получените резултати са направени следните по-важни изводи:

1. Ниските солеви концентрации (0.085 M NaCl) действат стимулиращо на соматичната ембриогенеза. Високите солеви концентрации (0.17 M NaCl) имат инхибиращ ефект.

2. Първоначалното натрупване на свежа растителна маса се характеризира с по-ниски стойности на общия окислително-редукционен потенциал на нискомолекулните тиолни съединения (-0.25 до –0.3 mV M) в сравнение с периода на формиране на соматични ембриоиди (-0.1 до –0.15 mV M).

3. Високите солеви концентрации водят до увеличение на вътреклетъчни свободни аминокиселини—пролин и цистеин, като последната има съществена регулаторна роля върху общия окислително-редукционен потенциал на тиолните съединения в условия на солеви стрес.

4. Полученото чрез фагов дисплей моноклонално антитяло разпознава белтък от клетъчна стена с Mw 72 kDa и pI 9.2, вероятно свързан със соматичната ембриогенеза и идентифициран като вероятна серин/ треонин протеин киназа.

5. Високите солеви концентрации увеличават концентрацията и водят до появата на различни ниско и високомолекулни арабиногалактанови белтъци в хранителната среда, като част от тях са некласически, цистеин-съдържащи AGP.

6. Солевият стрес повишава количеството на повърхностните арабиногалактанови белтъци, разпознавани от антителата JIM 8 и JIM 13.

7. Експанзините от суспензионни клетъчни култури на *Dactylis glomerata* L. показват различна активност върху клетъчни стени на различни растителни видове, което е в пряка зависимост от филогенетичната близост на съответния вид и зависи от наличието на пектин и хемицелулози в състава на клетъчната стена.

8. Екзогенно добавени експанзини показват най-висока активност към клетъчни стени на култури, третирани с високи солеви концентрации (0.17 M NaCl).

9. Активността на пектинметилестерази и ацетилестерази в клетъчна стена и хранителна среда се увеличава в резултат на приложения стрес.

7. Приноси на дисертационния труд

С фундаментален характер:

1. За първи път при растения е установена връзка между общия окислително-редукционен потенциал на ниско-молекулните тиоли и фазите на развитие на соматичните ембриоиди, както и значението на окислително-редукционния потенциал на двойката цистеин-цистеин дисулфид като регулатор на общия окислително-редукционен потенциал в условия на солеви стрес.

2. Получено е едноверижно моноклонално антитяло, специфично срещу белтък от клетъчна стена, който е потенциално свързан със соматичната ембриогенеза и отговора на солеви стрес.

3. Идентифициран е белтък от клетъчна стена, вероятно свързан със соматичната ембриогенеза—серин/треонинова протеин киназа, асоциирана с клетъчната стена. Той е потенциален молекулен маркер за реализиране на ембриогенния потенциал.

4. Установена е връзка между солевия стрес, соматичната ембриогенеза и количественото и качествено съдържание на некласически арабиногалактанови белтъци в клетъчната стена и хранителната среда.

5. Установена е връзка между солевия стрес, соматичната ембриогенеза, активността на експанзини и чувствителността на клетъчната стена към активността на експанзини, както и необходимостта от наличие на пектин и хемицелулози за проява на тази активност.

С научно-приложен характер:

1. Оптимизирана е методология за получаване на антиген от хранителна среда на *in vitro* растителни култури в пречистен вид чрез имобилизирано на нитроцелулозна мембрана едноверижно моноклонално антитяло, получено чрез фагов дисплей.

2. Оптимизиран е метод за разделяне на високо-молекулни протеогликани чрез нископроцентна полиакриламидна електрофореза в присъствие на агароза.

3. Оптимизиран е спектрофотометричен метод за изследване на активност на експанзини върху широк диапазон от моделни и естествени растителни клетъчни стени.

4. Разработен е модел за изследване на растителна клетъчна стена, базиран на продуцирани от *Acetobacter xylinum* полизахаридни комплекси от целулоза, хемицелулоза и пектин.

Публикации, свързани с дисертацията:

Zagorchev L., Seal Ch., Kranner I., Odjakova M. (2012) Redox state of low-molecular-weight thiols and disulphides during somatic embryogenesis of salt-treated suspension cultures of *Dactylis glomerata* L. Free Radical Research 46 (5) 656-664 **(IF=2.805)** DOI:10.3109/10715762.2012.667565

Zagorchev L. and Odjakova M. (2011) Hydroxyproline rich proteins in salt adapted embryogenic suspension cultures of *Dactylis glomerata* L. Biotechnology and Biotechnological Equipment. 25 (2) 2321-2328. **(IF = 0.503)** DOI: 10.5504/bbeq.2011.0050

Zagorchev, L., S. Petrova, M. Odjakova (2008) Arabinogalactan proteins in salt adapted suspension cultures of *Dactylis glomerata* L., General and Applied Plant Physiology Special Issue 34 (3-4), 159-168

Zagorchev L., K. Kalchev, M. Odjakova (2007) Generation of mono-clonal antibodies against stress-related extracellular proteins from *Dactylis glomerata* L. embryogenic suspension cultures using phage display. Annual of Konstatin Preslavsky University, Shumen Vol. XVII B 3, p. 166-181

Участия в международни и национални конференции, свързани с дисертацията:

1. **Zagorchev L.** and Odjakova M., Hydroxiproline-rich glycoproteins (HRGPs) in salt-treated suspension cultures of Orchardgrass, 6th SPPS PhD Student Conference, 2- 5 September, 2010, Espoo, Finland. Book of Abstracts p. 65
2. **Zagorchev L.**, Popova E., Velinov V., Petrova S., Bakalova N., Odjakova M. Salt stress and somatic embryogenesis in suspension cultures from *Dactylis glomerata* L. First meeting COST ACTION FA0901 Putting halophytes to work – from genes to ecosystems March 12-13, 2010, Naples, Italy Book of Abstracts p. 50
3. **Zagorchev L.**, Seal Ch., Kranner I., Odjakova M. Antioxidants content in salt-treated suspension cultures of *Dactylis glomerata* L. Youth scientific conference "Klimentovi dni", Sofia, 22nd-23rd November, 2010, Book of Abstracts p. 33
4. **Zagorchev L.**, Djaleva S., Odjakova M. Acetylesterase and pectinmethylesterase isoforms in salt-treated tissue cultures of *Dactylis glomerata* L. Anniversary international scientific conference, Stara Zagora 3rd -4th June 2010
5. **Zagorchev L.**, Odjakova M. Arabinogalactan proteins in cell suspension cultures of *Dactylis glomerata* L., XI Anniversary Scientific Conference With International Attenddance, May 27-29, 2009, Faculty of Biology, Sofia University, Sofia

6. Zagorchev L., Odjakova M., Application of phage display technology for isolation of pure protein fractions, Bulgarian – Japanese Symposium "Genomics and Proteomics in Personalized Medicine", March 19-20, 2009, Sofia, Bulgaria

7. Zagorchev L., Petrova S., Odjakova M. (2008) Arabinogalactan proteins in salt adapted suspension cultures of *Dactylis glomerata* L., 'Responses of Plants to Environmental Stresses' May 12-18, 2008, Elena

8. Zagorchev L., Tzacheva I., Odjakova M. Protein markers for regeneration capacity from salt stressed embryogenic suspension cultures of *Dactylis glomerata* L., World Conference of Stress, 23-26 August 2007, Budapest, Hungary; Cell Stress & Chaperones Volume 12, Issue 2 (June 2007)

Забелязани цитати

Zagorchev, L., S. Petrova, M. Odjakova (2008) Arabinogalactan proteins in salt adapted suspension cultures of *Dactylis glomerata* L., General and Applied Plant Physiology 34 (3-4), 159-168

1. Lin S.E., Huang L., Cao J.-S. (2011) The Functions of Arabinogalactan-Proteins in Angiosperms. Chinese Journal of Cell Biology, 33(3): 306−312

2. Capataz Tafur, J. (2010) Factores que afectan la secrecion de AGPs y su relacion con el cre cimiento y la formacion de agregados en cultivos de Beta vulgaris L., дисертация

http://itzamna.bnct.ipn.mx:8080/dspace/bitstream/123456789/9249/1/59.pdf