

ВЫЯВЛЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ НЕКОТОРЫХ ГЕНОВ *CRN*-СЕМЕЙСТВА ФИТОПАТОГЕНА *PHYTOPHTHORA INFESTANS*, СПОСОБНЫХ ВЫЗВАТЬ ЗАЩИТНУЮ РЕАКЦИЮ У РАСТЕНИЙ ТОМАТОВ

А.М.Ходосовкая, И.А.Рабец, Е.В.Кулик, А.Л.Лагоненко, А.Н.Евтушенков
Белорусский государственный университет
220000, г. Минск, пр. Ф.Скорины, 4, E-mail: alinahds@gmail.com

Одним из перспективных способов получения новых устойчивых к заболеваниям хозяйственно-ценных растений является их целенаправленное конструирование путем внедрения в растительный геном дополнительные генов устойчивости к фитопатогенам (*R*-генов) [1]. Продукты *R*-генов растения взаимодействуют с продуктами генов авирулентности патогенна (*Avr*-гены), секретлируемыми в цитоплазму растительной клетки, в результате чего происходит активация защитных реакций в растении, и развитие заболевания блокируется [2]. Однако идентификация, функциональная характеристика и клонирование *R*-генов представляет довольно сложную задачу. Новым подходом в поиске генов устойчивости является сочетание методов функциональной геномики для выявления внеклеточных эффекторных белков фитопатогена с последующим анализом биологических эффектов, вызываемых введением данных генов в устойчивые и чувствительные к нему растения [3].

С помощью данных методов были выявлены эффекторные гены *crn*-семейства фитопатогена *Phytophthora infestans*, которые экспрессируются при заражении томатов и вызывают развитие некрозов, т.е. активацию иммунных реакций растения [4].

P. infestans – эукариотический микроорганизм, относящийся к классу Оомицетов, ранее считавшихся представителями царства Грибов. Однако ввиду значительных биохимических отличий оомицеты в настоящее время относятся к золотисто-бурым водорослям (хризофитам) и входят в царство Протистов [5]. *P. infestans* вызывает фитофтороз картофеля и томатов – заболевание, распространяющееся с высокой скоростью и наносящее наибольший экономический урон данным сельскохозяйственным культурам [5, 6, 7].

Цель работы состояла в выявлении экспрессии генов *crn1* и *crn2* у *P. infestans*, представленной несколькими штаммами, выделенными на территории Белоруссии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе были использованы штаммы *P. infestans* 071/234, 071/281 и 071/562, собранные с картофеля на территории Брестской области Республики Беларусь в 2007 г. Штаммы любезно предоставлены ГНУ РНПЦ картофелеводства НАН Беларуси.

P. infestans культивировали на ржаной агаризованной питательной среде Rye A для поддержания культуры, для выделения мицелия *P. infestans*

культивировали в жидкой среде, полученной на основе зеленого горошка. Препарат тотальной РНК выделяли согласно Judelson H.S. (Judelson, 1987) [8]. Препарат мРНК выделяли с помощью коммерческого набора PolyA Tract mRNA Isolation System (Promega, США), синтез первой цепи кДНК для последующей амплификации осуществляли с помощью коммерческого набора RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit Fermentas (США) и праймера XhoT18 (Primetech, Беларусь). Препараты нуклеиновых кислот и продукты полимеразной цепной реакции (ПЦР) анализировали в 1% агарозном геле в ТАЕ-буфере, рН=8,0 (напряжение электрического поля 100 V, время разделения 1 час) и визуализировали с помощью установки для документации гелей ImageMaster VDS-CL (Amershm Bioscience). Праймеры для выявления генов были синтезированы в ГНУ Институт физико-органической химии НАН Беларуси (Primetech, Беларусь).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Белки CRN1 CRN2 *P. infestans* относятся к недавно открытому семейству эффекторных белков представителей рода *Phytophthora* [9]. При выявлении потенциальных кандидатов на роль эффекторных белков, т.е. секретируемых белков, участвующих во взаимодействии патогенна с растением (так называемых Pex – белков), T.A. Torto et al (Torto et al, 2003) использовали метод EST – анализа [4]. Затем с помощью бинарного PVS вектора на основе X-вируса картофеля проводили функциональный скрининг *in planta* продуктов этих генов. Экспрессия двух полученных таким образом последовательностей в растениях томатов приводила к реакции скручивания листьев (**crinkling**) и фенотипу клеточной гибели (**necrosis**), что сопровождалось индукцией некоторых защитных генов растения. Эти гены получили название *crn1* и *crn2*. Протеомный анализ показал, что входящие в состав CRN-семейства белки у представителей рода *Phytophthora* являются относительно крупными молекулами (400 – 850 аминокислот) и, по-видимому, функционируют как эффекторы, изменяя клеточные процессы в растении – хозяине. Размер белков CRN1 и CRN2 составляет 450 аминокислот.

На основании последовательности кДНК (ДНК, комплементарной матричной РНК) этих генов, представленной в GenBank, нами были сконструированы праймеры для их выявления в препаратах кДНК *P. infestans* с помощью ПЦР – анализа. Следующим этапом работы явилось выделение препарата тотальной РНК, затем мРНК и последующий синтез кДНК, поскольку мы имели информацию только о последовательности кДНК, которая благодаря возможному сплайсингу первичных транскриптов ДНК могла отличаться от последовательности нуклеотидов в данных генах.

Для выделения тотальной РНК мицелий *P. infestans* выращивали в течение нескольких недель в жидкой питательной среде, а затем выделяли РНК с использованием гуанидинхлорида и последующей очистки смесью фенол/хлороформ [8]. Из 1 г мицелия было получено около 250 мкг

препарата РНК (рис.1). После этого препарат мРНК обрабатывали олиго-dТ нуклеотидами, связанными с биотином, в результате чего происходило комплементарное связывание полиА – последовательности мРНК. К данной смеси добавляли парамагнитные частицы, связанные со стрептавидином, который, в свою очередь, связывался с биотинилированной пробой. Осаждение парамагнитных частиц от раствора осуществляли с помощью специальной магнитной подставки. При добавлении к смеси дистиллированной воды происходило отделение мРНК. В результате указанной обработки из 5 мкг препарата РНК выделено 140 нг мРНК. Несмотря на невысокий выход препарата, этого количества оказалось достаточно для синтеза первой цепи кДНК и проведения ПЦР – анализа с синтезированными праймерами

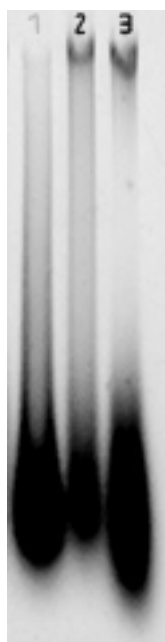


Рис. 1. Результаты электрофоретического разделения препаратов РНК, выделенных из различных штаммов *P. infestans*.
(1 – штамм 071/234, 2 – штамм 071/281, 3 - штамм 071/562)

В результате амплификации первой цепи кДНК, синтезированной с мРНК, выделенной из штаммов *P. infestans* 071/234, 071/281 и 071/562, с парой праймеров для гена *crn1* были получены продукты размером примерно 700 пар нуклеотидов (п.н), что соответствует ожидаемому размеру фрагмента гена *crn1* 682 п.н. (рис.2, дорожки 1 - 4). Использование пары праймеров для гена *crn2* позволило в случае кДНК *P. infestans*, полученной из штаммов 071/281 и 071/562, выявить амплифицированные фрагменты размером около 650 п.н., что совпадает с рассчитанной величиной образующегося фрагмента гена *crn2* *P. infestans* (рис.2, дорожки 5,7). В случае мРНК *P. infestans*, выделенной из штамма 071/234 размер фрагмента оказался несколько выше ожидаемого.

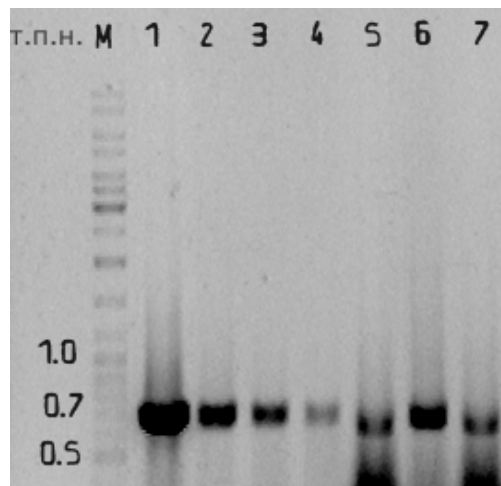


Рис.2. Электрофореграмма продуктов амплификации кДНК, полученной из различных штаммов *P. infestans*, с праймерами к генам *crn1* (дорожки 1 – 4) и *crn2* (дорожки 5 – 7).
 М - маркер молекулярной массы (Fermentas, Латвия),
 1 – 7: препараты кДНК из штамма 071/281 (дорожки 2, 5), из штамма 071/234 (дорожки 3, 6), из штамма 071/562 (дорожки 1, 4, 7)

Таким образом полученные результаты свидетельствуют о том, что выбранные нами праймеры могут быть довольно успешно использованы для выявления генов *crn1* и *crn2* у *P. infestans*. Экспрессия этих генов наблюдается у *P. infestans* нескольких исследованных штаммов при ее культивировании на искусственных средах. В дальнейшем предполагается провести рестрикционный анализ для подтверждения принадлежности выявленных продуктов амплификации указанным гена, а также сконструировать праймеры для последующего клонирования данных генов и функциональной характеристики белков CRN1 CRN2.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бурьянов Я.И. Успехи и перспективы генно-инженерной биотехнологии растений.// Физиология растений. 1999. Т.40, №6. С. 930 – 944.
2. Toyoda K, Collins N.C., Takahashi A., Shirasu K. Resistance and susceptibility of plants to fungal pathogens // Transgenic Res. 2002. V. 11, N6. P.567 – 582.
3. Vleeshouwers V.G., Rietman H., Krenec P. et al. Effector genomics accelerates discovery and functional profiling of potato disease resistance and *Phytophthora infestans* avirulence genes // PloS ONE. 2008. V. 3(8), N.6. e2875.
4. Torto T.A., Li Sh., Styer A. et al. EST mining and functional expression assays identify extracellular effector proteins from the plant pathogen *Phytophthora* // Genome Res. 2003.V. 13.P.1675 – 1685.
5. Kamoun S. Molecular Genetics of Pathogenic Oomycetes // Eucariotic cell.- 2003.-V.2, №2.-P.191-199.
6. Дьяков Ю. Т., Еланский С. Н. Популяционная генетика *Phytophthora infestans* // Микология сегодня. – 2007. – Том 1. – С. 107 – 139.

7. Иванюк В.Г., Банадысев С.А., Журомский Г.К. Фитофтороз картофеля и меры борьбы с ним: Аналитический обзор.- Минск: Белорусский научный институт внедрения новых форм хозяйствования в АПК, 2003.- 56 с.
8. Judesson H.S. Preparation of RNA from *P. infestans* // http://www.iheworld.com/_protocols/lab_protocols/judelson-lab-protocols.htm.
9. Kamon S. A catalog of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes // Annu. Res. Phytopatol. 2006. V. 44. P. 41 – 60.