

ЭКСПРЕССИЯ PR-ГЕНОВ КАРТОФЕЛЯ ПРИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ

О.М. Третьякова, А.Н. Евтушенко

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

Введение

В последние годы во многих странах потери картофеля от бактериальных болезней постоянно растут. Это связано с широким внедрением механизации производственных процессов, при которой возрастают механические повреждения клубней и, как следствие заражение фитопатогенными бактериями. Бактериальные болезни картофеля вызывают фитопатогенные бактерии, относящиеся к родам *Pectobacterium*, *Pseudomonas*, *Bacillus* и др. Возрастающая вредоносность данных бактерий связана с высокой инфекционной способностью возбудителей, с отсутствием устойчивости к бактериозам у большинства культивируемых сортов и недостаточно высокой организацией хранения картофеля. В настоящее время ведутся интенсивные исследования механизмов активирующих защитные реакции растений и повышения естественного иммунитета растений, что позволит снизить использование экологически опасных химических средств защиты растений. Фитопатогенные бактерии для успешной колонизации растений секретируют за пределы клеток целый ряд белков, в том числе и деполимеризующие ферменты (пектолитические, целлюлолитические, протеолитические) [1]. Функции секретируемых фитопатогенами белков связаны в основном с разрушением компонентов клетки растения или с инактивацией ее защитных систем. Например, деполимеризующие ферменты, которые синтезируются бактериями рода *Pectobacterium*, вызывают неспецифическое разрушение тканей различных растений – клубней картофеля, корнеплодов моркови, свеклы и ряда других культур, что приводит к развитию бактериозов и значительной потере урожая [2]. Однако бактериальные белки могут распознаваться клеткой растения, в результате чего происходит запуск защитных механизмов, противодействующих распространению патогена. Специфическое распознавание белков патогена осуществляют мембранные или цитоплазматические рецепторные киназы клеток растения, активирующие соответствующие сигнальные каскады, что в конечном итоге приводит к развитию характерных реакций, препятствующих дальнейшему распространению патогена. К числу таких реакций можно отнести синтез различных антимикробных соединений, в том числе патоген-индуцируемых белков (pathogenesis related – PR), которые обеспечивают резистентность к инфекции [3].

PR-белки – это особый класс защитных белков, которые экспрессируются в ответ на стрессовые воздействия и инфекцию патогена [4]. Впервые они были обнаружены в сверхчувствительных растениях табака, пораженных вирусом табачной мозаики. PR-белки обнаружены у многих видов растений, входящих в состав 17 семейств [5]. Многочисленными исследованиями показано, что синтез PR-белков может быть индуцирован вирусами, вироидами, грибами и бактериями. Однако показано, что PR-белки могут синтезироваться и у здоровых растений. Например, в кислом соке здоровых растений огурцов обнаружена кислая хитиназа [6], а у растений томатов – белки, структурно похожие на липидтранспортные белки [7].

Связь между накоплением PR-белков и развитием приобретенной устойчивости к патогенам привела к предположению, что они являются маркерами этой устойчивости [8]. Но, например, ризобактерии, заселяющие корни растений *Arabidopsis thaliana* и не являющиеся патогенами, вызывали у этих растений системную приобретенную устойчивость, независимую от экспрессии PR-генов [9].

Также было показано, что уровень экспрессии в растениях картофеля PR-1, PR-3, PR-5 генов коррелирует с резистентностью к *Phytophthora infestans* [10].

Ранее нами показано, что бактерии *Pectobacterium carotovorum*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Dickeya dadantii* в различной степени поражают ткани клубней картофеля, в зависимости от температуры тестирования, вида бактерий и сорта картофеля [11].

Целью данной работы являлось изучение экспрессии PR-генов двух сортов картофеля с различной устойчивостью к бактериальной мокрой гнили для выявления возможной связи экспрессии PR-генов с резистентностью.

Методы исследования

В работе использовали бактерии *Pectobacterium carotovorum* 2A, *Pectobacterium atrosepticum* 36A, *Dickeya dadantii* ENA 49. Бактерии выращивали при 28°C на среде LB в течение 20 часов на качалке. Культуры бактерий разводили примерно в 10 раз физиологическим раствором и доводили до одинаковой оптической плотности 0,2 при 600 нм. Для заражения бактериями использовали сорта картофеля «Скарб» и «Веснянка», культивируемые в Беларуси (сорта картофеля получены из РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству»). Из клубней картофеля, простерилизованных посредством обработки спиртом и прожигания, с помощью стерильного скальпеля и пробочного сверла нарезали пластины толщиной 1 см и диаметром 18 мм. Картофельные пластины раскладывались по 10 штук на увлажненные фильтры в чашки Петри. На срезы наносили 10 мкл культуры и ломтики инкубировали в чашках Петри при 18°C, 28°C и 33°C в течение 24 часов.

Тотальную РНК из клеток клубня картофеля выделяли с помощью набора Macherey-Nagel AG (Швейцария). РНК использовали для синтеза кДНК с использованием обратной транскриптазы М-MLV (Promega) согласно методике производителей. Для количественной ПЦР (кПЦР) использовали 1 мкл кДНК.

кПЦР проводили на амплификаторе ДТ-96 (ДНК-технология) с модулем детекции продуктов в режиме реального времени. Для определения уровней экспрессии генов растений использовали прямой и обратный праймеры (таблица 1), Taq буфер «АМ» и Taq полимеразу (2,5 ед). Реакционная смесь объемом 100 мкл содержала каждый праймер в концентрации 0,2 мкМ, дНТФ – по 0,1 мМ, а также интеркалирующий краситель SYBR Green I (Sigma) и референсный краситель ROX (Праймтех) в рекомендованных производителем концентрациях. Продукты реакции детектировались в ходе 50 циклов чередующихся температур 94°C (10 сек) и 60°C (1 мин). Расчеты уровня экспрессии генов проводили по следующей схеме. Определяли разницу значений (ΔCt), вычитая из конститутивно экспрессирующегося гена EF-1 α пороговое значение (Ct) PR-генов. В качестве минимального значения ($\min(\Delta Ct)$) было выбрано наименьшее значение из генов при определенной температуре не зараженного картофеля. Относительное количество копий мРНК ($N(\text{мРНК})$) определяли по формуле: $N(\text{мРНК})=2^{(\Delta Ct - \min(\Delta Ct))}$ [12].

Таблица 1 – Праймеры, используемые в работе

Праймеры	Последовательность праймеров	
PR-3 – Potato	StPR3f	ATAAGCCATCATGCCACAACG
	StPR3r	GCAGTATTCGGACCCATCCC
PR-5 – Potato (Thaumatin)	StPR5tf	ATCTCCCGTCTCGCATTTGC
	StPR5tr	GGGCCAAACTTGGAACCTTAATG
PR-10	LePR10f2	TATGAGTCAACAACCACAATTTCCC
	LePR10r	TGGACCACCTTCAACAAAGTTC
EF-1 α	StEF1 α f	TTGATGCTCTTGACCAGATTAACG
	StEF1 α 2r	ACGGGCACAGTTCCAATACC

Результаты и обсуждение

Ранее нами было показано, что клубни картофеля сорта «Скарб» отличаются более высокой устойчивостью к бактериальной мокрой гнили, чем сорта «Веснянка» при экспериментальном заражении бактериями-возбудителями [11].

Мы предположили, что различная устойчивость картофеля к мокрой гнили может быть связана с уровнем экспрессии PR-генов, как это было показана в случае с *Phytophthora infestans* [6].

В первой серии экспериментов было определено относительное количество копий мРНК генов PR-3, PR-5t, PR-10 в клетках ткани клубней картофеля, при инкубации при разных температурах (18°C, 28°C, 33°C). Температуры были использованы оптимальные для развития патогенов (28°C), а также отклоняющиеся от оптимальной в обе стороны, но при которых патогены способны развиваться (рисунки 1, 2). Проведенные эксперименты выявили разную экспрессию генов в зависимости от температуры и сорта картофеля. Наибольший уровень экспрессии отмечался для гена PR-3 у сорта «Скарб» и PR-10 у сорта «Веснянка». Экспрессия гена PR-3 у сорта «Скарб» повышалась с увеличением температуры. Экспрессия гена PR-5t у сорта «Скарб» также повышалась с увеличением температуры и была выше, чем у сорта «Веснянка».

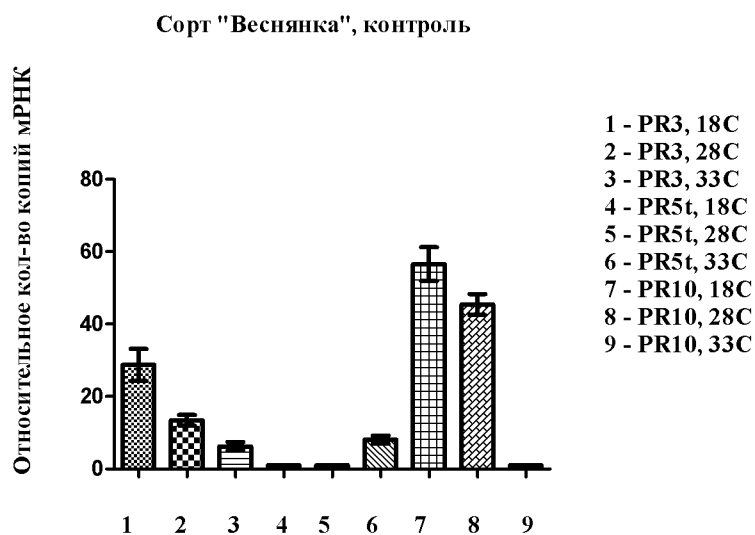


Рисунок 1 – Уровни экспрессии генов PR-3, PR-5t и PR-10 в клетках тканей клубней картофеля сорта «Веснянка» при 18°C, 28°C и 33°C

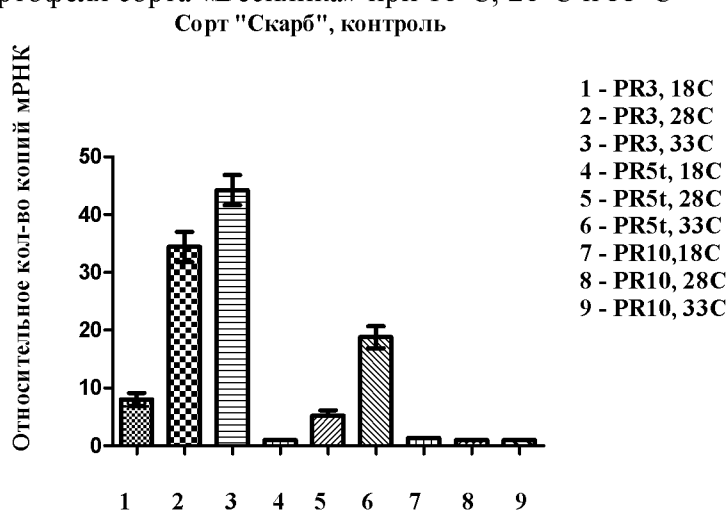


Рисунок 2 – Уровни экспрессии генов PR-3, PR-5t и PR-10 в клетках тканей клубней картофеля сорта «Скарб» при 18°C, 28°C и 33°C

В следующей серии экспериментов были изучена экспрессия генов PR-3, PR-5t и PR-10 при заражении двух сортов картофеля «Веснянка» и «Скарб», штаммами *Pectobacterium*

carotovorum 2A, *Pectobacterium atrosepticum* 36A и *Dickeya dadantii* ENA49 и инкубации при 18°C, 28°C и 33°C (таблицы 2, 3). В таблицах 2 и 3 представлены средние значения трех измерений со стандартной ошибкой. В зараженной ткани клубней картофеля наблюдалась индукция практически всех генов, причем степень индукции зависела от температуры, сорта картофеля и штамма бактерий. Наибольший уровень индукции отмечался для гена PR-3 в тканях клубней сорта «Скарб» при заражении штаммами *Pectobacterium carotovorum* 2A, *Pectobacterium atrosepticum* 36A. Высокая степень индукции этого гена отмечена и для сорта «Веснянка». Ген PR-10 в большей степени индуцировался в тканях клубней картофеля сорта «Веснянка» при 18°C. При более высоких температурах экспрессия этого гена резко снижалась.

Таблица 2 – Уровни экспрессии генов PR-3, PR-5t и PR-10 в клетках тканей клубней картофеля сорта «Веснянка» при 18°C, 28°C и 33°C, зараженного бактериями *Pectobacterium carotovorum*(Pc) 2A, *Pectobacterium atrosepticum*(Pa) 36A и *Dickeya dadantii* (Dd) ENA49

Гены	Относительное кол-во копий мРНК, при заражении бактериями Pc 2A			Относительное кол-во копий мРНК при заражении бактериями Pa 36A			Относительное кол-во копий мРНК при заражении бактериями Dd ENA49		
	18°C	28°C	33°C	18°C	28°C	33°C	18°C	28°C	33°C
PR-3	52±5	49,5±6,4	10,6±1,1	104±12,1	99±12,3	78,8±12,4	27,9±2,2	10,8±2,2	11,3±2,5
PR-5t	0,5±0,01	0,3±0,01	9,8±1,0	1,6±0,3	0,4±0,02	2,6±0,3	0,04±0,01	0,2±0,01	3,7±1,0
PR-10	168,9±14,5	2,7±0,3	1±0,4	256±15,6	0,5±0,01	4,6±1,2	84,4±13,5	0,8±0,1	4±0,7

Примечание. Значения меньше 1 – это экспрессия генов, которые ниже контроля. За контроль брали картофель без заражения при инкубации при разной температуре.

Таблица 3 – Уровни экспрессии генов PR-3, PR-5t и PR-10 в клетках тканей клубней картофеля сорта «Скарб» при 18°C, 28°C и 33°C, зараженного бактериями *Pectobacterium carotovorum*(Pc) 2A, *Pectobacterium atrosepticum*(Pa) 36A и *Dickeya dadantii*(Dd) ENA49

Гены	Относительное кол-во копий мРНК при заражении бактериями Pc 2A			Относительное кол-во копий мРНК при заражении бактериями Pa 36A			Относительное кол-во копий мРНК при заражении бактериями Dd ENA49		
	18°C	28°C	33°C	18°C	28°C	33°C	18°C	28°C	33°C
PR-3	168,9±15,1	5,3±1,0	4,8±1,1	29,9±2,5	388±12	21,9±2,1	3,2±0,2	36,8±4,3	32,4±4,3
PR-5t	3,7±0,2	1,4±0,1	2,9±0,9	3,7±1,0	2,5±0,2	35,5±3,9	1±0,02	29,9±2,1	132,5±15,9
PR-10	2,8±0,7	0,03±0,02	0,1±0,01	10,6±2,3	0,3±0,01	0,2±0,01	2±0,3	0,03±0,01	11,7±1,2

Примечание. Значения меньше 1 – это экспрессия генов, которые ниже контроля. За контроль брали картофель без заражения при инкубации при разной температуре.

У сорта «Скарб» уровень индукции PR-5t оказался несколько более высоким (в 2–30 раз) при заражении штаммами при 28°C и 33°C по сравнению с картофелем сорта «Веснянка». Причем уровень экспрессии данного гена в тканях клубней картофеля сорта «Скарб» будет значительно более высоким в сравнении с сортом «Веснянка», если учесть, что уровень индукции рассчитывался по отношению к экспрессии в незараженном

картофеле, которая была выше у сорта «Скарб». Таким образом, у картофеля сорта «Скарб» резистентность к бактериальной мокрой гнили коррелирует с повышенной экспрессией гена PR-5t.

Выводы

Проведенные эксперименты выявили индукцию генов резистентности PR-3, PR-5t и PR-10 в тканях клубней картофеля в ответ на заражения штаммами бактерий. Степень индукции генов резистентности зависела от температуры и сорта картофеля. Наблюдается корреляция между степенью индукции PR-5t гена с устойчивостью клубней к мокрой гнили.

Список литературы

1. Barras, F. Extra cellular enzymes and pathogenesis of soft-rot *Erwinia* / F. Barras // Annu. Rev. Phytopathol. – 1994. – Vol. 32. – P. 201–234.
2. Pérombelon, M.C. Bacterial soft rots Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases / M.C. Pérombelon // Oxford, UK: Pergamon. – 1995. – Vol. 1, № 11. – P. 1–20.
3. Liu, J. The superfamily of thaumatin-like proteins: its origin, evolution, and expression towards biological function / J. Liu, R. Sturrock // Plant Cell. – 2010. – P. 419–436.
4. Edreva, A. A pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years / A. Edreva, D. Kostoff // Plant physiology. – 2005. – P. 105–124.
5. Loon, Van L.C. Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants / L.C. van Loon, M. Rep, C.M.J. Pieterse // Annual Review of Phytopathology. – 2006. – P. 135–162.
6. Masuda, S. Chitinase in cucumber xylem sap. / S. Masuda, H. Kamada, S. Satoh // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2001. – Vol. 65, № 8. – P. 1883–1885.
7. A tomato xylem sap protein represents a new family of small cysteine-rich proteins with structural similarity to lipid transfer proteins / M. Rep [et al.] // FEBS Letters. – 2003. – Vol. 534, № 1–3. – P. 82.
8. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance / E.R. Ward [et al.] // Plant Cell. – 1991. – Vol. 3, № 10. – P. 1085–1094.
9. Systemic Resistance in Arabidopsis Induced by Biocontrol Bacteria Is Independent of Salicylic Acid Accumulation and Pathogenesis-Related Gene Expression / C.M. Pieterse [et al.] // Plant Cell. – 1996. – Vol. 8, № 8. – P. 1225–1237.
10. Does basal PR gene expression in Solanum species contribute to non-specific resistance to *Phytophthora infestans*? / G. Vivianne [et al.] // Physiological and Molecular Plant Pathology. – 2000. – P. 35–42.
11. Третьякова, О.М. Пектолитическая и мацерирующая активность штаммов *Pectobacterium carotovorum*, *Pectobacterium atrosepticum* и *Dickeya dadantii* на тканях клубней картофеля / О.М. Третьякова, А.Н. Евтушенко // Картофелеводство: сб. науч. тр. – Минск, 2010. – С. 186–190.
12. Livak, K.J. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$: Method Methods 25 / K.J. Livak. – Department of Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy, Washington State University. – 2001. – P. 402–408.

POTATO PR-GENE EXPRESSION IN RESPONSE TO BACTERIAL INFECTION

O.M. Tretyakova, A.N. Evtushenkov
Belarusian State University, Minsk, Belarus

The variations in the resistance of the potato to soft rot may be related to the PR-genes expression.

The experiments revealed the induction of genes PR-3, PR-5t and PR-10 resistant in tissues of potato tubers in response to infection by strains of bacteria. The degree of induction of resistant genes depended on temperature and potato cultivar. We can observe a correlation between degree of induction of PR-5t gene and the cultivars resistance to soft rot.