

15. Кукурузный жук *Diabrotica* – неизбежная угроза / Л.И. Трепашко [и др.] // Белорусское сельское хозяйство. – 2015. – № 1 (153). – С. 56–59.
16. Rakauskas, R. Recent changes in aphid (Hemiptera, Sternorrhyncha: Aphididae) fauna of Lithuania: an effect of global warming? / R. Rakauskas // *Ekologija*. – 2004. – Nr. 1. – P. 1–4.
17. Ижевский, С.С. Угрожающие находки ясеневой изумрудной узкотелой златки *Agrilus planipennis* в Московском регионе: Жуки и колеоптерологи [Электронный ресурс] – 2007. – Режим доступа: <http://www.zin.ru/Animalia/Coleoptera/rus/agrplaiz.htm>. – Дата доступа: 19.11.2015.
18. Волкорвич, М.Г. Узкотелая златка *Agrilus planipennis* – новый опаснейший вредитель ясеней в европейской части России: Жуки и колеоптерологи [Электронный ресурс] – 2007. – Режим доступа: http://www.zin.ru/animalia/coleoptera/rus/eab_2007.htm. – Дата доступа: 11.11.2015.
19. Орлова-Беньковская, М.Я. Европейский ареал жука *Agrilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae) расширяется: зона массовой гибели ясеня охватила северо-западное Подмосковье и часть Тверской области / М.Я. Орлова-Беньковская // Российский журнал биологических инвазий. – 2013. – № 4. – С. 49–57.
20. Distribution, impact and rate of spread of emerald ash borer *Agrilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae) in the Moscow region of Russia / N.A. Straw [et al.] // *Forestry*. – 2013. – No. 86. – P. 515–522.
21. A high-resolution map of emerald ash borer invasion risk for Southern Central Europe / V. Valenta [et al.] // *Forests*. – 2015. – N. 6 (9). – P. 3075–3086.

УДК 623.6; 579.841.11

Индукция генов защитного ответа в листьях картофеля при бактериальной инфекции и обработке глифосатом

Х. Пасалари, аспирант, О.М. Третьякова, кандидат биологических наук,
А.Н. Евтушенко, доктор биологических наук
Белорусский государственный университет

(Дата поступления статьи в редакцию 20.04.2016 г.)

Определяли уровни экспрессии генов защитных белков в листьях картофеля при бактериальной инфекции и обработке глифосатом методом ПЦР в реальном времени. Показано, что обработка трансгенных растений глифосатом индуцирует в листьях экспрессию генов защитных белков. При заражении обработанных глифосатом растений фитопатогенными бактериями уровни индукции генов защитного ответа возрастают примерно в 2 раза. Предполагается, что обработка трансгенных растений глифосатом способствует повышению их резистентности к патогенам.

Введение

Создание и использование генно-инженерных организмов в селекции новых сортов растений ведет к увеличению продуктивности, повышению качества продукции, способствуя улучшению экологической обстановки [1]. Как известно, реакции растений на инфицирование или раневой стресс связаны с индукцией генов, кодирующих защитные белки. Эти гены принято называть генами защитного ответа (PR-гены). Характер экспрессии PR-генов как видо-, так и органоспецифичен. И хотя индукция генов, кодирующих защитные белки, описана для ряда растительных систем, до последнего времени мало было известно о подобных генах в клубнях и листьях картофеля. PR-белки – это особый класс защитных белков, которые экспрессируются в ответ на стрессовые воздействия и инфекцию патогена. PR-белки (pathogenesis-related proteins) обнаружены у многих видов растений, и в настоящее время описанные белки отнесены к 17 семействам [2]. В разных источниках упоминается, что PR-белки содержатся в межклетниках, плазмодесмах, цитоплазме и в вакуолях клетки, встречаются в ксилемном соке [3], гуттационной жидкости, не транспортируются по растению [4]. В инфицированных клетках растения идет синтез данных белков *de novo*. Как правило, PR-белки выделяются в апопласт и действуют кооперативно, разрушая клеточную стенку патогена [5]. PR-белки участвуют в формировании приобретенной системной устойчивости SAR (systemic acquired resistance). Показано, что многие PR-белки обладают фунгицидной и бактерицидной активностью *in vivo* и *in planta* [6]. Некоторые PR-белки обладают антифизической активностью [7]. Впервые эти белки были обнаружены у растений табака, проявляющих реакцию сверхчувствительности в ответ на инокуляцию вирусом табачной мозаики [4]. Позднее была показана индукция PR-белков в

The protective proteins genes expressive levels are determined in potato leaves at bacterial infection and glyphosate treatment by real time PCR method.

It is shown that transgenic plants treatment by glyphosate induces the expression in protective proteins genes leaves. At glyphosate treated plants contamination by phytopathogenic bacteria the protective answer genes induction levels are increased approximately two times. It is supposed that transgenic plants treatment by glyphosate facilitates their resistance increase to pathogens.

ответ на поражение растений грибами, вирусами и вирионами, а также в ответ на проникновение нематод и насекомых. Данные белки являются одним из звеньев в механизмах неспецифической устойчивости растений. Роль PR-белков при патогенезе значительна и разнообразна.

На картофеле (*Solanum tuberosum*) было показано, что устойчивость сорта картофеля к возбудителю мокрой гнили (*Pectobacterium carotovorum*) связана с интенсивностью синтеза PR-белков: у картофеля устойчивого сорта Скарб экспрессия гена PR-5 была значительно выше, чем у восприимчивого сорта Веснянка [8]. Связь между накоплением PR-белков и развитием приобретенной устойчивости привела к предположению, что они являются маркерами этой устойчивости. Было показано, что накопление этих белков коррелирует с развитием системной приобретенной устойчивости растений [9].

Ген *aroA* кодирует 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат синтазу (EPSPS). Данный фермент, локализованный в пластидах растений, катализирует предпоследнюю реакцию шикиматного пути и необходим для синтеза ароматических аминокислот в бактериях, грибах и растениях [10]. Создание растений, устойчивых к широко используемому во всем мире гербициду глифосату (N- (фосфометил) – глицин), позволит существенно повысить эффективность сельскохозяйственного производства, значительно увеличить урожайность культур. Так, со времени начала коммерциализации трансгенных растений (1996–2007 гг.) устойчивость к гербицидам была последовательно выделена как главный желаемый признак.

В 2008 г. 85 % площадей, отданных под трансгенные культуры, занимали гербицидоустойчивые растения, среди которых почти все были резистентны к глифосату [11]. За последние годы картофель стал одной из тех культур, на которых интенсивно применяются методы генной инже-

нерии. Ранее нами получены трансгенные растения картофеля, устойчивые к глифосату с бактериальным геном *aroA* [12]. Полученные трансгенные растения после обработки глифосатом могут приобретать устойчивость к грибным патогенам при накоплении гербицида в вегетирующих органах, который токсичен для микроорганизмов [13].

Цель данной работы состояла в определении экспрессии генов защитного ответа в листьях трансгенного картофеля при бактериальной инфекции и после обработки глифосатом и влияния обработки на фитопатогенные бактерии.

Материалы и методы исследований

Трансгенные растения картофеля сорта Одиссей выращивали в горшках в условиях климатической камеры при температуре 23 °C и длиной светового дня 16 часов. Для заражения листьев картофеля использовали бактерии *Pectobacterium atrosepticum* 21A и *Dickeya dadantii* ENA49. Бактерии выращивали при 28 °C на среде LB в течение 20 часов на качалке. Клетки бактерий осаждали центрифугированием и ресуспендировали в стерильном физиологическом растворе. На поврежденную стерильным скальпелем поверхность листа наносили 10 мкл бактериальной суспензии (примерно 2×10^7 клеток). Листья помещали в чашки Петри на увлажненную фильтровальную бумагу и инкубировали в климатической камере. Для подсчета количества клеток в зараженной ткани листа помещали в пробирку с физиологическим раствором, растирали до однородного состояния и из полученной суспензии после разведения физиологическим раствором делали высевы на чашки с питательным агаром. Подсчет колоний проводили через 48 часов инкубирования посевов при 28 °C. ПЦР в реальном времени (RT-PCR) 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 1 (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 уровней экспрессии генов проводили по следующей схеме. Определяли разницу значений (ΔCt), вычитая из конститутивно экспрессирующегося гена *EF-1a* пороговое значение (Ct) *PR*-генов. В качестве минимального значения – $\min(\Delta Ct)$ – было выбрано наименьшее значение из генов. Относительное количество копий мРНК – $N(mPНК)$ – определяли по формуле: $N(mPНК) = 2^{(\Delta Ct - \min(\Delta Ct))}$ [14].

Результаты исследований и их обсуждение

При заражении листьев трансгенного картофеля фитопатогенными бактериями зоны поражения появлялись на 3 сутки на необработанных глифосатом листьях в виде темных мокнувших пятен и формировались в течение 5–7 суток. Причем более четкие зоны формировались при заражении *Pectobacterium atrosepticum* 21A, чем *Dickeya dadantii* ENA49. На листьях, обработанных глифосатом (1,8 г/л) и зараженных фитопатогенными бактериями, не наблюдали развития инфекции и через 7 суток после заражения, что свидетельствовало об устойчивости растений к патогенам.

Для выяснения возможных механизмов развития устойчивости трансгенных растений картофеля к бактериальной инфекции после обработки глифосатом были проведены эксперименты по изучению экспрессии генов защитного ответа в тканях листьев картофеля и по подсчету численности фитопатогенных бактерий в ткани листа.

Для определения экспрессии *PR*-генов из листьев картофеля выделяли фракцию мРНК методом экстракции горячим фенолом и синтезировали кДНК. Индукцию системного ответа растений детектировали методом количественной ПЦР (кПЦР) по уровню экспрессии известных *PR*-генов *S. tuberosum*. Количество полученной кДНК определяли методом кПЦР с интеркалирующим красителем SYBR Green. В качестве референсного гена использовали *EF-1a*.

Использованные олигонуклеотидные праймеры представлены в таблице 1. В первой серии экспериментов было определено относительное количество копий мРНК генов защитного ответа в ткани листьев картофеля, обработанных и необработанных глифосатом при бактериальной инфекции (таблица 2, 3).

При заражении необработанных глифосатом листьев картофеля фитопатогенными бактериями наблюдается высокий уровень экспрессии генов защитного ответа,

Таблица 1 – Праймеры, используемые в работе

Праймеры	Последовательность праймеров
<i>aroAseq2</i> <i>aroAr_ch</i>	CAGGAAACAGCTATGACGCATTAAAGGCGATCTGGTTTC TCAGAGCTCAGCCGTGCTGACTCAGA
<i>nt CTP-f</i> <i>nt CTP-r</i>	GTTTCTAGAAAAATGGCACAGATTAGCAGCATG CAATGAGCTCCATGGTCTGTGCAGTGACCACTGAT
<i>St PR2f</i> <i>St PR2r</i>	CTAATGCGGTGGTACAAGATGG TGACACAACAATTCTACAGATCC
<i>St PR3f</i> <i>St PR3r</i>	ATAAGCCATCATGCCACAACG GCAGTATTCGGACCCATCC
<i>St PR5f</i> <i>St PR5r</i>	ATCTCCCGTCTCGCATTTCG GGGCCAACTTGAACCTTAATG
<i>St HSR-203j-f</i> <i>St HSR-203j-r</i>	GTAATGATAGTTCGGTTGATAAGC AGAGGTAGGAAGACGGAAC
<i>St HIN-1f</i> <i>St HIN-1r</i>	GCAACTGCATTTTCCAAATCATC CACGTAGAAATTGACCTTGTTAGG
<i>St EF1A f</i> <i>St EF1A 2r</i>	TTGATGCTCTTGACCAGATTAACG ACGGGCACAGTTCCAATACC

особенно гена *PR2*. Но при заражении обработанных глифосатом листьев трансгенного картофеля уровень экспрессии генов защитного ответа значительно возрастает, особенно для генов *PR2*, *PR5*, *HSR-203J* и это коррелирует с устойчивостью обработанных глифосатом листьев к бактериальной инфекции.

Во второй серии экспериментов было определено количество клеток бактерий при заражении листьев картофеля обработанных и необработанных глифосатом (таблица 4). На необработанных глифосатом листьях количество клеток бактерий на вторые сутки возрастало в 30–40 раз (начальное количество – 2×10^7) и сохранялось на этом же уровне и на 7 сутки. На листьях, обработанных глифосатом, количество бактерий на 2 сутки возрастало в 15–25 раз и уменьшалось на 7 сутки, что коррелировало с отсутствием симптомов бактериального поражения. Таким образом, в листьях трансгенного картофеля при обработке глифосатом наблюдается повышенный уровень экспрессии генов защитного ответа и подавление развития фитопатогенных бактерий, что, в конечном итоге, обеспечивает их устойчивость к бактериозам.

Выводы

Обработка растений картофеля глифосатом индуцирует гены защитного ответа, что повышает уровень устойчивости растений к фитопатогенным бактериям. Накопление глифосата в тканях листьев 2×10^7 ингибирует размножение патогенов. Таким образом, обработка посадок трансгенного картофеля глифосатом будет приводить не только к гибели сорняков, но и повышать уровень устойчивости растений к патогенам.

Литература

1. Генетические трансформанты картофеля как модель изучения гормональной и углеводной регуляции клубнеобразования / Н.П. Аксенова [и др.] // Физиология растений. – 2000. – 47, 3: С. 420–430.
2. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins / L.C. Van Loon [et al.] // Physiol. Mol. Plant Pathol. 1999. – V. 55. – P. 85–97.

Таблица 4 – Количество клеток бактерий *P. atrosepticum* 21A и *D. dadantii* ENA49 на листьях трансгенных растений картофеля сорта Одиссей, обработанных и необработанных глифосатом

Вариант	Количество клеток бактерий ($\times 10^8$)			
	штаммы			
	21A	ENA49	21A	ENA49
	через 2 суток после заражения		через 7 дней после заражения	
Необработанные листья	9,24	7,34	8,18	7,32
Листья, обработанные глифосатом	3,41	4,98	2,55	3,19

Таблица 2 – Уровни экспрессии генов защитного ответа в клетках ткани листьев картофеля сорта Одиссей, зараженного бактериями *Pectobacterium atrosepticum* 21A и *Dickeya dadantii* ENA49

Гены	Относительное количество копий мРНК	
	21A	ENA49
<i>PR2</i>	14,9 $\pm$ 0,15	13,25 $\pm$ 0,138
<i>PR3</i>	7,3 $\pm$ 25,01	7,07 $\pm$ 8,384
<i>PR5</i>	6,5 $\pm$ 2,01	7,06 $\pm$ 0,80
<i>HIN1</i>	7,2 $\pm$ 0,23	6,91 $\pm$ 0,28
<i>HSR-203J</i>	12,06 $\pm$ 2,1	10,85 $\pm$ 0,82
<i>aroA</i>	7,9 $\pm$ 6,01	9,1 $\pm$ 2,32

Таблица 3 – Уровни экспрессии генов защитного ответа в клетках ткани листьев картофеля сорта Одиссей, обработанного глифосатом (1,8 г/л) и зараженного бактериями *P. atrosepticum* 21A и *D. dadantii* ENA49

Гены	Относительное количество копий мРНК при обработке глифосатом и бактериальной инфекции	
	21A	ENA 49
<i>PR2</i>	42,7 $\pm$ 2,31	19,7 $\pm$ 7,265
<i>PR3</i>	13,65 $\pm$ 0,12	12,78 $\pm$ 12,33
<i>PR5</i>	10,4 $\pm$ 3,21	9,4 $\pm$ 5,26
<i>HIN1</i>	13,05 $\pm$ 6,14	12,5 $\pm$ 1,805
<i>HSR-203J</i>	29,12 $\pm$ 2,14	27,37 $\pm$ 2,735
<i>aroA</i>	14,9 $\pm$ 12,1	14,165 $\pm$ 5,67

3. Пастухова, Н.Л. Детоксикация тяжелых металлов у растений / Н.Л. Пастухова // Available: www.nbuv.gov.ua/portal/Chem_Biol/reor/2008/218-226.pdf. [Accessed Okt. 05, 2010].
4. Малиновский, В.И. Механизмы устойчивости растений к вирусам / В.И. Малиновский // Владивосток: Дальнаука. – 2010. – С. 324.
5. Роль экстраклеточных рибонуклеаз в физиологических процессах высших растений / С.С. Сангаев [и др.] // Вестник ВОГиС. – 2010. – Т.14, – №2. – С. 232–242.
6. Роль нуклеаз в физиологических процессах высших растений / Е.А. Трифонова [и др.] // Усп. соврем. биологии. – 2000. – Т. 120. – С. 395–405.
7. Основные свойства и особенности эволюции антифризных белков / Л.Л. Бильданова [и др.] // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2012. – Т.16, №1. – С.250–270.
8. Экспрессия PR-генов при бактериальной инфекции / О.М. Третьякова [и др.] // Труды БГУ. – 2011. – Т. 6, №1. – С. 163–167.
9. Activation of *hsr203*, a plant gene expressed during incompatible plant-pathogen interactions, is correlated with programmed cell death / D. Pon-

- tier [et al.] // Mol. Plant-Microbe Interact. – 1998. – Vol. 11, № 6 – P. 544–554.
10. Discovery and directed evolution of a glyphosate tolerance gene / A. Linda [et al.] // Science. – 2004. – Vol. 304. – P. 1151–1154.
11. Glyphosate inhibits rust diseases in glyphosate-resistant wheat and soybean / P. Feng [et al.] // PNAS. – 2005. – Vol. 102. – P. 17290–17295.
12. Устойчивость к глифосату трансгенного картофеля с геном *aroA* / Х.М. Пасалари [и др.] // Труды БГУ. – 2015. – Т. 10, ч. 1. – С.123–126.
13. Tolerance and accumulation of shikimic acid in response to glyphosate applications in glyphosate resistant and non glyphosate resistant cotton (*Gossypium hirsutum* L.) / W.A. Pline [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 2002. – Vol. 50. – P. 506–512.
14. 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. – P. 402–408.