

Российская академия наук

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
КАЗАНСКИЙ ИНСТИТУТ БИОХИМИИ И БИОФИЗИКИ
КАЗАНСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

УДК 581.143:577.175.1.05
№ госрегистрации 01201151948
Инв. № 0797-2

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель директора, профессор

_____ В.М. Чернов

“22” октября 2012 г.

ОТЧЕТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

В рамках федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры
инновационной России» на 2009-2013 годы

Шифр заявки «2010-1.1-000-152-033»
Государственный контракт от 30 ноября 2010 г. № 14.740.11.0797

по теме:

«МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ ФИТОИММУНИТЕТА:
СИГНАЛЬНЫЕ МЕДИАТОРЫ И РЕПРОГРАММИРОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ»

(заключительный, этап № 5)

«Экспериментально-теоретическое обоснование модели»

Руководитель НИР, д-р хим. наук, академик РАН

_____ Гречкин А.Н.
подпись, дата

Казань 2012

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель темы, д-р хим. наук	_____ А.Н. Гречкин (все разделы)
Ответственный исполнитель темы, д-р хим. наук	_____ Ю.Ф. Зуев (все разделы)
Исполнители темы: д-р. биол. наук	_____ И.А. Тарчевский (разделы 2.1.1, 2.1.3)
д-р. биол. наук	_____ Ф.В. Минибаева (разделы 2.1.3)
д-р. биол. наук	_____ Ф.К. Алимова (разделы 2.1.2, 2.1.8, 2.1.9)
д-р. физ.- мат. наук	_____ В.В. Клочков (раздел 2.1.4)
канд. биол. наук	_____ Ю.В. Гоголев (все разделы)
канд. хим. наук	_____ Ф.К. Мухитова (раздел 2.1.1)
канд. хим. наук	_____ Е.А. Ермакова (раздел 2.1.4., 2.1.5)
канд. биол. наук	_____ И.Р. Чечеткин (раздел 2.1.1, 2.1.3)
канд. биол. наук	_____ Н.Б. Тарасова (раздел 2.1.3)
канд. биол. наук	_____ О.Н. Макшакова (раздел 2.1.5)
канд. биол. наук	_____ Н.Е. Гоголева (раздел 2.1.2)

канд. ф.-м. наук	_____	Б.И. Хайрутдинов (раздел 2.1.4, 2.1.5)
канд. биол. наук	_____	Я.Ю. Топоркова (раздел 2.1.4)
канд. биол. наук	_____	В.Ю. Горшков (раздел 2.1.1)
канд. биол. наук	_____	Е.В. Осипова (разделы 2.1.5)
канд. биол. наук	_____	А.М. Егорова (раздел 2.1.1, 2.1.3)
канд. биол. наук	_____	Д.И. Тазетдинова (разделы 2.1.5, 2.1.6)
канд. биол. наук	_____	Г.Д. Кадырова (разделы 2.1.5, 2.1.6)
канд. биол. наук	_____	Р.И. Тухбатова (раздел 2.1.8, 2.1.9)
ст. лаборант	_____	А.В. Панкова (раздел 2.1.8)
канд. биол. наук	_____	А.С. Блуфард (раздел 2.1.3)
МНС	_____	Т.А. Коннова (раздел 2.1.2)
МНС	_____	В.В. Рябовол (раздел 2.1.3)
МНС	_____	Л.Р. Богданова (раздел 2.1.4)
асп.	_____	А.Г. Даминова (раздел 2.1.1)
асп.	_____	С.С. Горина (раздел 2.1.2)

асп.	_____	В.С. Ермилова (раздел 2.1.2)
асп.	_____	Л.Н. Мухамедова (раздел 2.1.4)
асп.	_____	А.В. Ишемгулова (раздел 2.1.3)
асп.	_____	Л.В. Шлыкова (раздел 2.1.2)
асп.	_____	А.Ф. Сафина (раздел 2.1.2)
студент	_____	Ю.А. Морозова (раздел 2.1.9)
студент	_____	И.И. Гильмутдинова (раздел 2.1.2)
студент	_____	Р.Р. Гарипова (раздел 2.1.2)
студент	_____	И.Э. Астудильо Склярова (раздел 2.1.2)
нормоконтролер канд. биол. наук	_____	Н.Л.Захарченко (все разделы)

СОДЕРЖАНИЕ

1. Введение	7
2. Основная часть	11
2.1. Экспериментальные и теоретические исследования 5 этапа	11
2.1.1. Получение профилей экспрессии защитных генов растений при формировании иммунитета и генов вирулентности фитопатогенных микроорганизмов при патогенезе и переходе к персистенции	11
2.1.2. Моделирование репрограммирования экспрессии генома растений, связанного с устойчивостью к патогенам с использованием новых физиологически активных веществ с защитными свойствами и сигнальных медиаторов	17
2.1.3. Моделирование репрограммирования экспрессии генов вирулентности фитопатогенов с использованием аналогов аутоиндукторов микроорганизмов	37
2.1.4. Исследование пространственной структуры низкомолекулярных PR-белков и комплексов этих белков с медиаторами сигнальных систем с применением метода ЯМР высокого разрешения и других взаимодополняющих физических методов	45
2.1.5. Компьютерное моделирование взаимодействия низкомолекулярных PR-белков с целевыми лигандами	56
2.1.6. Построение модели репрограммирования экспрессии генома растений при индукции устойчивости с включением новых компонентов – генов PR-белков, белков АТG-семейства, интерферирующих РНК, генов липоксигеназной сигнальной системы, новых медиаторов сигнальных систем, защитных метаболитов и пептидов	67
2.1.7. Практические испытания и масштабирование применения антагонистов фитопатогенов в качестве регуляторов фитоиммунитета условиях <i>in vivo</i> в цехах ООО «Тепличный Комбинат «Майский»»	72

2.1.8. Использование материалов и результатов НИР в образовательном процессе	83
2.1.9. Использования материалов и результатов НИР в целях профориентации молодежи при выборе профессии	83
3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	83
4. ВЫВОДЫ	89
5. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	91

1. ВВЕДЕНИЕ

Одной из важнейших проблем современной биологии является расшифровка механизмов реагирования прокариотических и эукариотических организмов на изменения условия их существования, особенно на действие экстремальных факторов (стрессовых факторов, стрессоров) вызывающих у клеток состояние стресса (Тарчевский, 2002). В силу прикрепленного образа жизни растения особенно подвержены влиянию внешних воздействий. В процессе эволюции у растений выработались особые приспособления, позволяющие воспринимать, преобразовывать и усиливать приходящие из окружающей среды сигналы и реагировать на них, не только адаптируясь к изменяющимся условиям, но и выделяя различные летучие и нелетучие соединения, вторичные метаболиты. Одни из них выполняют роль защитных веществ при действии патогенов, другие могут рассматриваться в качестве сигнальных молекул, вызывающих ответ других клеток и растений, расположенных на большом расстоянии от места действия первичного сигнала. В результате для противодействия угрозам могут быть мобилизованы не только все ткани и органы растения, но целые популяции и сообщества растений, а также организмы разных видов, являющиеся звеньями переплетающихся цепей сложных биоценозов. В качестве примера можно привести хищных насекомых и нематод, для которых выделения растений, подвергшихся атаке фитофагов, служат мощными аттрактантами. Таким образом, благодаря растительным сигнальным системам хищники легче находят потенциальную жертву и избавляют растения от паразитов.

На клеточном уровне адаптивные события также происходят в результате изменений в информационном поле клеток. Первичные сигналы с помощью различных сигнальных систем вызывают реакцию со стороны генома клеток, проявляющуюся в репрограммировании экспрессии генов. С другой стороны, сигнальные системы сами находятся под контролем генома.

В результате взаимодействия информационного поля и генома, опосредованного сигнальными системами, формируется физиологическая программа стрессового ответа. Показателями формирования новой устойчивой программы является изменение транскрипционного профиля и спектра синтезируемых клетками белков. Знание о закономерностях этих изменений, информация об их качественных и количественных характеристиках, включающих функциональную роль переменных компонент, позволяет глубже понять механизмы формирования устойчивости растений и разработать способы их рационального использования и совершенствования для соответствия современным условиям и требованиям агропромышленного производства и биотехнологии.

При формировании патосистемы адекватность ответов партнеров на происходящие изменения физиологических программ во многом определяет исход взаимодействия. В связи с этим, проблема борьбы с фитопатогенами не может быть решена без изучения сигнальных систем и адаптивных реакций не только растений, но и микроорганизмов. В первую очередь представляет интерес регуляция экспрессии факторов вирулентности патогенов. В ответ на антипатогенную реакцию растений патогены «включают» механизмы преодоления (подавления или обхода) врожденного иммунитета растений с помощью специализированных молекул – эффекторов вирулентности. Среди них имеются как белки так и небелковые токсины (например, коронатин – химический аналог жасмонатов), ослабляющие первичный защитный ответ клеток растения-хозяина (He, 2008). Сложность молекулярных взаимоотношений между патогенами и растениями, существование параллельных и пересекающихся сигнальных потоков заставляет искать такие модели, которые бы позволяли выяснять роль различных этапов и рычагов механизма выработки иммунитета. Для выбора таких более простых моделей используется знание последовательности событий в клетках растений после атаки патогенов: патоген → элиситор (эффектор) → рецептор → «включение» сигнальных

систем → медиаторы сигнальных систем → репрограммирование экспрессии генов → синтез защитных белков → иммунный ответ растений.

Конечным этапом передачи сигнала является увеличение или уменьшение уровня экспрессии генов. Эти процессы являются основой для дифференцировки клеток, морфогенеза и адаптации организмов. Хотя экспрессия генов — это многостадийный процесс, однако в большинстве исследований оценивается эффективность их транскрипции. Анализ уровня экспрессии генов, транскрипционный анализ, является важной составляющей многих фундаментальных и прикладных исследований. В то же время, принимая во внимание механизмы посттранскрипционной регуляции экспрессии, эти исследования должны быть подкреплены результатами современного протеомного анализа. На данном этапе исследований только совокупность метаболомного, транскриптомного и протеомного подходов может дать достаточно полную информацию о биологических системах.

Изучение сигнальных и защитных механизмов растений соответствует задачам данного Проекта и отвечает его цели, заключающейся в исследовании транскриптомных, протеомных и метаболомных изменений растений, индуцируемых патогенами и медиаторами, при формировании фитоиммунитета.

Следующим шагом, безусловно, служит расшифровка механизмов действия белков, ферментов и других соединений, обеспечивающих устойчивость растений. Эта задача в настоящее время решается с применением современных подходов биофизики, в первую очередь, различных видов спектроскопии и ЯМР. Критическим этапом этих исследований является выбор объекта и подготовка образцов для проведения экспериментов. Эти задачи могут быть решены в результате координированных усилий ученых, работающих в разных направлениях. В связи с этим при выполнении настоящего этапа Проекта был задействован богатый арсенал методов, представленный широким кругом специалистов. В результате некоторые направления удалось довести до практического

применения, заключающегося в разработке способов производства и применения биологических средств защиты растений и стимуляторов роста. Дальнейшие исследования позволят расширить область применения полученных результатов.

Приоритетной задачей, решаемой в ходе исследований, выполняемых в рамках Проекта, является содействие развитию научно-образовательной и приборной базы для подготовки студентов, аспирантов и молодых ученых в области физико-химической молекулярной и клеточной биологии.

2. ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Экспериментально-теоретическое обоснование модели

2.1. Экспериментальные и теоретические исследования 5 этапа

2.1.1. Получение профилей экспрессии защитных генов растений при формировании иммунитета и генов вирулентности фитопатогенных микроорганизмов при патогенезе и переходе к персистенции

Как отмечалось, в силу прикрепленного образа жизни растения особенно подвержены влиянию субоптимальных внешних воздействий как абиогенной так и биогенной природы. К биогенным относится поражение возбудителями болезней. Способность противостоять этим факторам определяется устойчивостью растений – способностью их сохранять относительное постоянство внутренней среды в определенном диапазоне внешних воздействий. В целом устойчивость организма обеспечивается совокупностью механизмов: специфических, зависящих от особенностей фактора, и общих, неспецифических, характерных для различных воздействий и отражающих свойства самой реагирующей системы. Активация этих механизмов индуцируется сигнальными системами, способными распознавать и передавать сигналы о воздействии стрессовых факторов (Тарчевский, 2001).

Конечным этапом передачи сигнала является увеличение или уменьшение уровня экспрессии генов. Эти процессы являются основой для дифференцировки клеток, морфогенеза и адаптации организмов. Хотя экспрессия генов — это многостадийный процесс, однако в большинстве исследований оценивается только эффективность их транскрипции.

Взаимодействие растений и фитопатогенов представляет собой сложный динамичный процесс, в результате которого одновременно

меняется физиологическое состояние, как макро-, так и микроорганизма. Эти изменения отражаются на совокупном транскриптоме и протеоме формирующейся патосистемы (Lovell *et al.*, 2011). В результате метагеномных, транскриптомных и протеомных исследований были выявлены характерные маркеры, специфичные для различных физиологических программ. Оценка экспрессии маркерных генов, интенсивности синтеза характерных белков и метаболитов позволяет судить об изменениях транскриптома, протеома и метаболома системы в целом (Cánovas *et al.*, 2004). Кроме того, описание динамического состояния некоторой совокупности маркеров представляет собой модель развития патосистем и стрессового ответа организма (Тарчевский, 2002).

На основе разработанной нами экспериментальной платформы для оценки уровня экспрессии генов кукурузы мы проанализировали изменение уровня экспрессии полной совокупности генов липоксигеназ и CYP74. На Рис. 1 представлены данные, описывающие экспрессию генов *ZmAOS1* и *ZmAOS2* при окислительном и раневом стрессах. При окислительном стрессе, вызванном экзогенным внесением салициловой кислоты в концентрации 50 мкМ, уровень экспрессии обоих генов не менялся. При увеличении концентрации салициловой кислоты до 200 мкМ, уровень экспрессии *ZmAOS1* увеличивался через 75 часов после начала воздействия, что указывает на изменения в экспрессии гена алленоксидсинтазы 1 лишь при воздействии высоких концентраций салицилатов в течение достаточно продолжительного времени (через 75 часов). В отличие от *ZmAOS1*, у гена *ZmAOS2* индукции экспрессии салициловой кислотой не происходило.

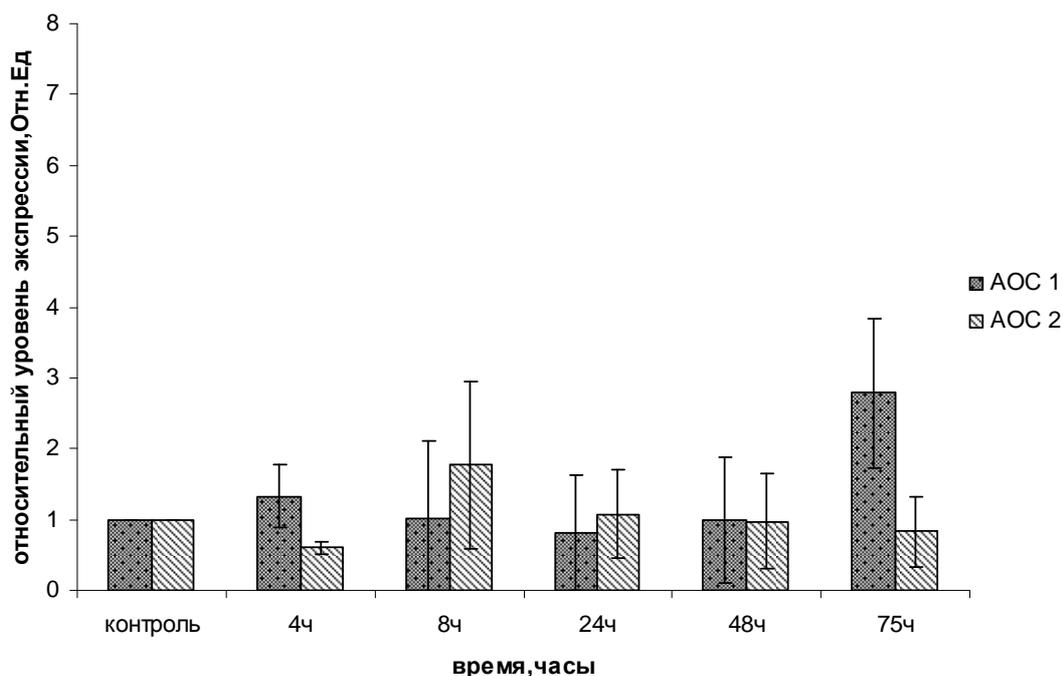


Рисунок 1. Относительный уровень экспрессии генов *ZmAOS1* и *ZmAOS2* при окислительном стрессе (200 мкМ салициловой кислоты).

При раневом стрессе происходила индукция экспрессии гена *ZmAOS1* уже через 4 часа после воздействия; затем уровень экспрессии снижался (Рис. 2). Возможно, резкая индукция экспрессии гена *ZmAOS1* происходила за счет «быстрого» ответа растения на механическое повреждение. При этом экспрессия гена алленоксидсинтазы 2 (*ZmAOS2*) не менялась. Это, вероятно, свидетельствует о том, что *ZmAOS2* не принимает участия в стрессовом ответе растения на повреждение и выполняет иную функцию.

Таким образом, нами продемонстрирована дифференцированная экспрессия генов алленоксидсинтаз (*ZmAOS1* и *ZmAOS2*) при окислительном и раневом стрессах, а также различная динамика экспрессии этих генов при различных типах стрессового воздействия. Динамика экспрессии зависела от типа стрессового воздействия. Так, при действии салициловой кислоты увеличение экспрессии *ZmAOS1* происходило лишь через продолжительное время после воздействия (75 часов), в то время как при раневом стрессе индукцию экспрессии этого гена наблюдали уже через 4 часа после механического повреждения. Обнаружение генов, обладающих подобной

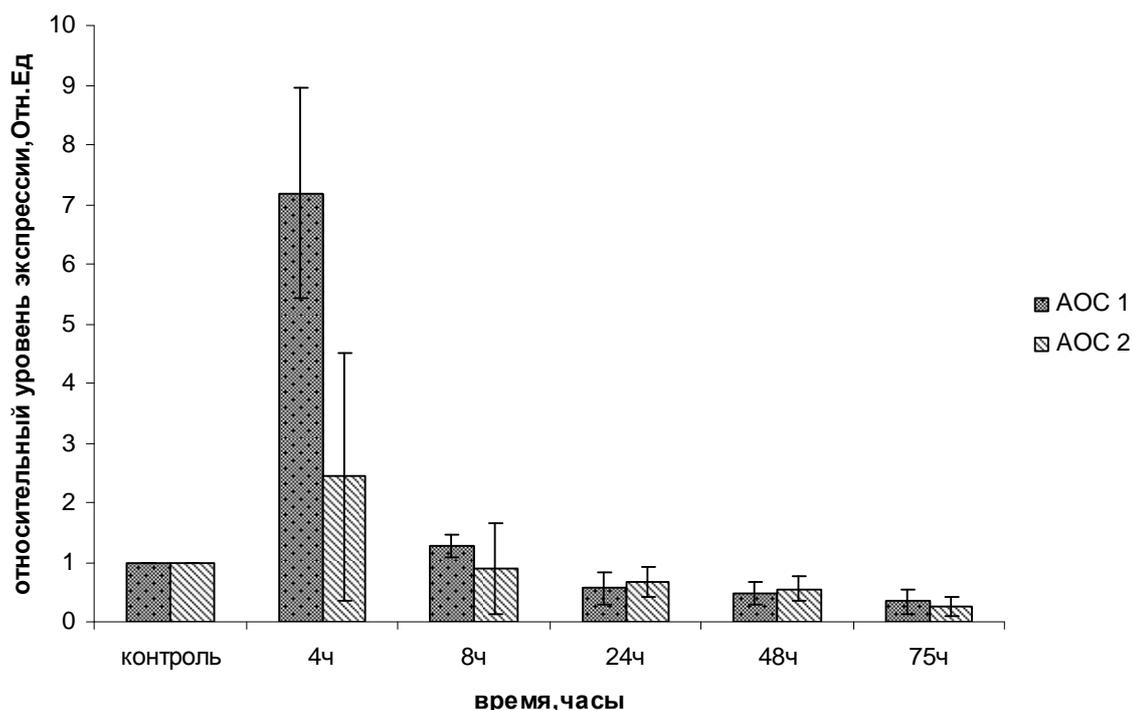


Рисунок 2. Относительный уровень экспрессии генов *ZmAOS1* и *ZmAOS2* при раневом стрессе.

дифференциальной экспрессией имеет не только теоретическое значение при выяснении механизмов стрессового ответа, но может так же открывать перспективы новых возможностей в биотехнологии при создании управляемых трансгенных платформ.

Важные защитные функции как у растений, так и других организмов принадлежат пероксидазам. Исследуемые нами гены пероксидаз пшеницы содержат, помимо транскрибируемого участка, информацию о регуляторной области. С использованием базы данных PlantCARE были найдены регуляторные мотивы, характерные для всех промоторов, такие как ТАТА-бокс и стресс-чувствительные мотивы: ABRE (ABA-response element) АБК-регулируемый комплекс; G-Box, регулируемый светом; MBS (MYB-binding site involved in drought-inducibility), MYB-связывающий мотив, активируемый при засухе.

В связи с обнаруженными стресс-чувствительными мотивами, наши дальнейшие исследования были направлены на оценку уровня экспрессии

исследуемых генов пероксидаз при воздействии на проростки абсцизовой кислоты (АБК) и засухи. Анализ экспрессии генов пероксидаз 37 кДа проводили с использованием метода ПЦР в реальном времени со специфичными праймерами на основе платформы, созданной по описанному выше алгоритму.

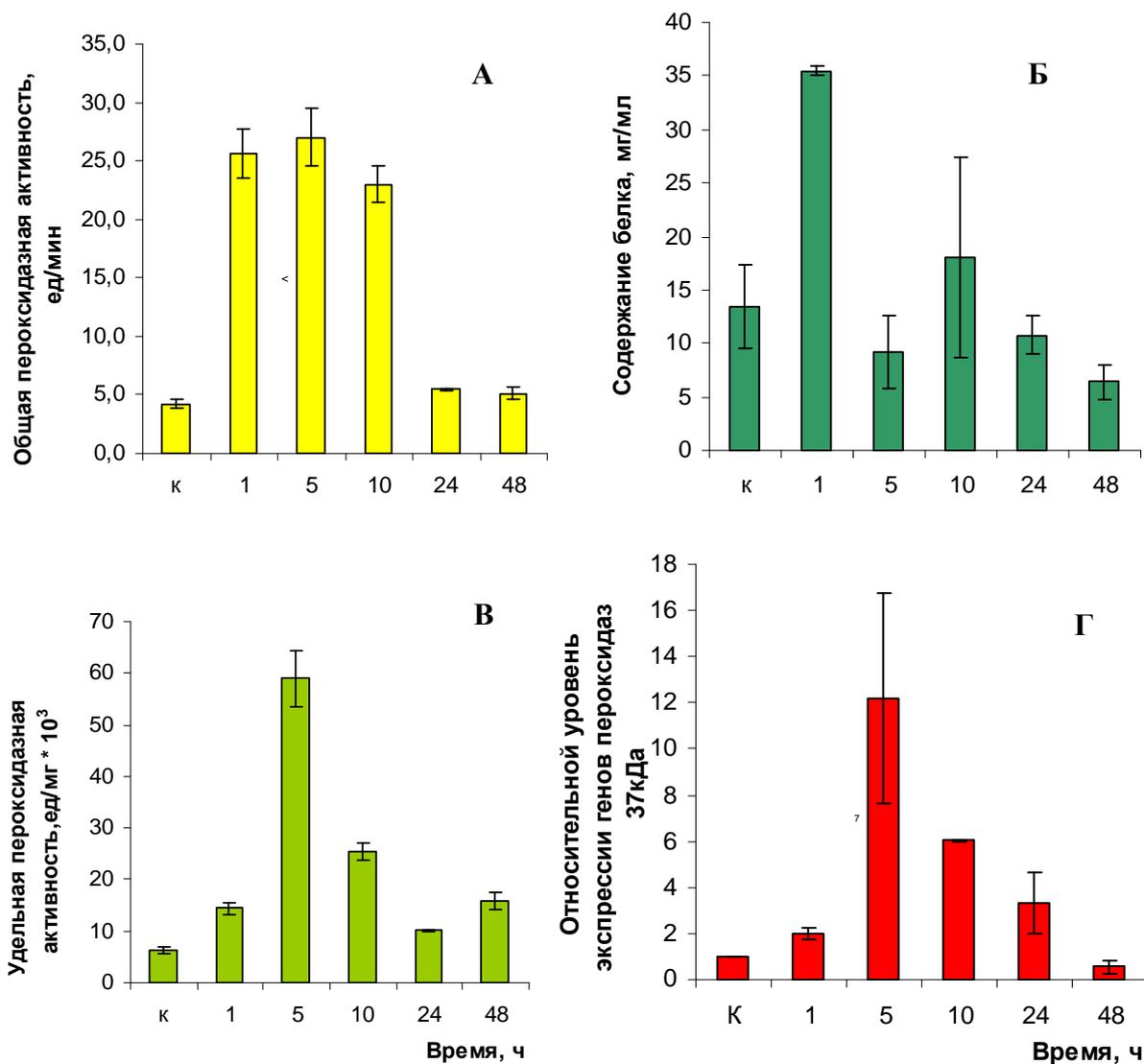


Рисунок 3. Активность белков пероксидаз и экспрессия генов пероксидаз 37 кДа при раневом стрессе.

Нами было показано, что при раневом стрессе происходит увеличение активности пероксидаз в апопласте, но механизмы изменения активности этих ферментов на разных этапах раневого стресса пока не ясны. В связи с этим, нами было проведено измерение активности пероксидаз и уровня экспрессии их генов во временной динамике. При однократном раневом

стрессовом воздействии в апопласте корней происходило резкое возрастание общей активности пероксидаз (рис. 3А). Однако ввиду наблюдающегося резкого увеличения содержания белков, в том числе пероксидаз, (рис. 3Б), удельная пероксидазная активность увеличивалась незначительно (рис. 3В). Экспрессия генов пероксидаз через 1 ч после отсечения корней практически не возрастала (рис. 3Г). Можно полагать, что увеличение активности пероксидаз на ранних этапах раневого стресса опосредовано активацией уже существующих белков.

С развитием раневого стресса (5 ч) общая пероксидазная активность оставалась высокой, кроме того, возросла удельная активность из-за падения секреции белка. Эта высокая активность обусловлена синтезом пероксидаз *de novo*, что подтвердилось резким возрастанием уровня экспрессии генов пероксидаз через 5 ч после отсечения корней (рис. 3Г). При 10-часовом стрессе общая активность оставалась высокой, однако уровень экспрессии генов начал снижаться. На более поздних этапах стресса (24 и 48 ч) наблюдалось постепенное угасание как активности пероксидазных белков, так и генов пероксидаз. Можно заключить, что высокая активность апопластных пероксидаз в течение первых 10 ч раневого стресса обеспечивается разными механизмами: активацией предсуществующих изоформ пероксидаз на ранних этапах (1 ч) и синтезом белков *de novo* на более поздних этапах стресса (5 и 10 ч).

Метаболизм АФК, контролируемый пероксидазами, играет ключевую роль в ответе растений на поранение. Их активность зависит от изменений окружающей среды и различных эндогенных стимулов. АФК, образованные пероксидазами, могут использоваться при полимеризации лигнина и образовании суберина, что необходимо для заживления ран. Известно, что АФК в апопласте растения могут быть очень токсичны для атакующих патогенов, в том числе грызущих насекомых, и играть роль в передаче сигналов внутри клетки.

Нами было показано, что в ответ на действие патогенов в растениях происходит интенсификация липоксигеназного метаболизма (Chechetkin et al., 2009). В растениях, инфицированных *Pba*, количество образуемых оксилипинов было значительно выше, чем у неинфицированных растений. Значительные изменения были зафиксированы в транскрипционной активности генов, кодирующих белки метаболизма оксилипинов. Кроме того, изменения были выявлены в экспрессионной активности генов пероксидаз, аутофагических генов и продуктов окислительного метаболизма. В транскриптоме растений были обнаружены изменения, вызванные специфичными сигналами биогенного и абиогенного стресса, в том числе увеличение синтеза PR-белков.

2.1.2. Моделирование репрограммирования экспрессии генома растений, связанного с устойчивостью к патогенам с использованием новых физиологически активных веществ с защитными свойствами и сигнальных медиаторов.

Анализ уровня экспрессии генов является важной составляющей многих фундаментальных и прикладных исследований. В то же время, принимая во внимание механизмы посттранскрипционной регуляции экспрессии, эти исследования должны быть подкреплены результатами современного протеомного анализа (Jorriñ-Novo et al., 2009). На данном этапе научных исследований только совокупность транскриптомного протеомного и метаболомного подходов может дать достаточно полную информацию о биологических системах (Curto et al., 2006).

В ходе эволюции растения выработали механизмы защиты от патогенов с помощью синтеза эффективных природных антипатогенных соединений различной химической природы. Их синтез «включается» с помощью двух основных типов стрессовых фитогормонов – салициловой и жасмоновой кислотами (Catinot et al, 2008). Образование первой в тканях

растений повышается в десятки раз при атаке биотрофных патогенов, а второй - при инфицировании некротрофными патогенами. Это является сигналом тревоги и запускает каскад еще в значительной степени невыясненных биохимических реакций, завершающихся перепрограммированием экспрессии генов и, в результате, синтезом защитных белков, в той или иной степени обеспечивающих иммунитет растений (Тарчевский, 2002). Несмотря на то, что общая стратегия самозащиты растений от патогенов в настоящее время выяснена, конкретные молекулярные механизмы, лежащие в основе формирования у растений иммунитета с помощью указанных выше стрессовых фитогормонов, остаются в значительной степени невыясненными. В то же время, их расшифровка позволила бы предложить рекомендации для разработки эффективных средств противодействия поражению растений различными видами патогенов с помощью природных антипатогенных соединений. Большой вклад в понимание молекулярных механизмов формирования иммунитета вносят исследования влияния стрессовых фитогормонов на протеомы (набор и содержание белков) растений (Jorjin-Novo et al., 2009).

В настоящее время в рамках проекта нами был получен ряд результатов приоритетного характера об изменениях протеомов растений под влиянием их обработки салициловой кислотой (рис 4).

Было обнаружено увеличение синтеза гликозидгидролаз семейства 18, которые относятся к классическим хитиназам классов III и V, гидролизующие бета-1,4-N-ацетил-D-глюкоза-миновые связи в молекулах хитина клеточных стенок патогенных грибов, так называемые «инактивированные хитиназы», представляющие собой ингибиторы ксиланаз - ферментов, продуцируемых патогенными грибами (Durand et al., 2005) и хитиназы, обладающие лизоцимной активностью, способные гидролизовать бета-1,4-связи между N-ацетилглюкозаминами остатками и остатками N-ацетилмурамовой кислоты в муреине – пептидогликане, входящем в состав клеточных стенок бактерий (Brunner et al., 1998).

Показано, что экспрессия генов хитиназ индуцируется различными патогенами. Разнообразие представителей этих ферментов говорит об их специфических ролях в растениях. Известно, что они обладают прямым антипатогенным действием, разрушая хитин клеточных стенок многих патогенов (Regalado et al., 2000). При нормальном развитии растения хитиназы могут влиять на процессы роста и развития растений (Cullimore et al., 2001).

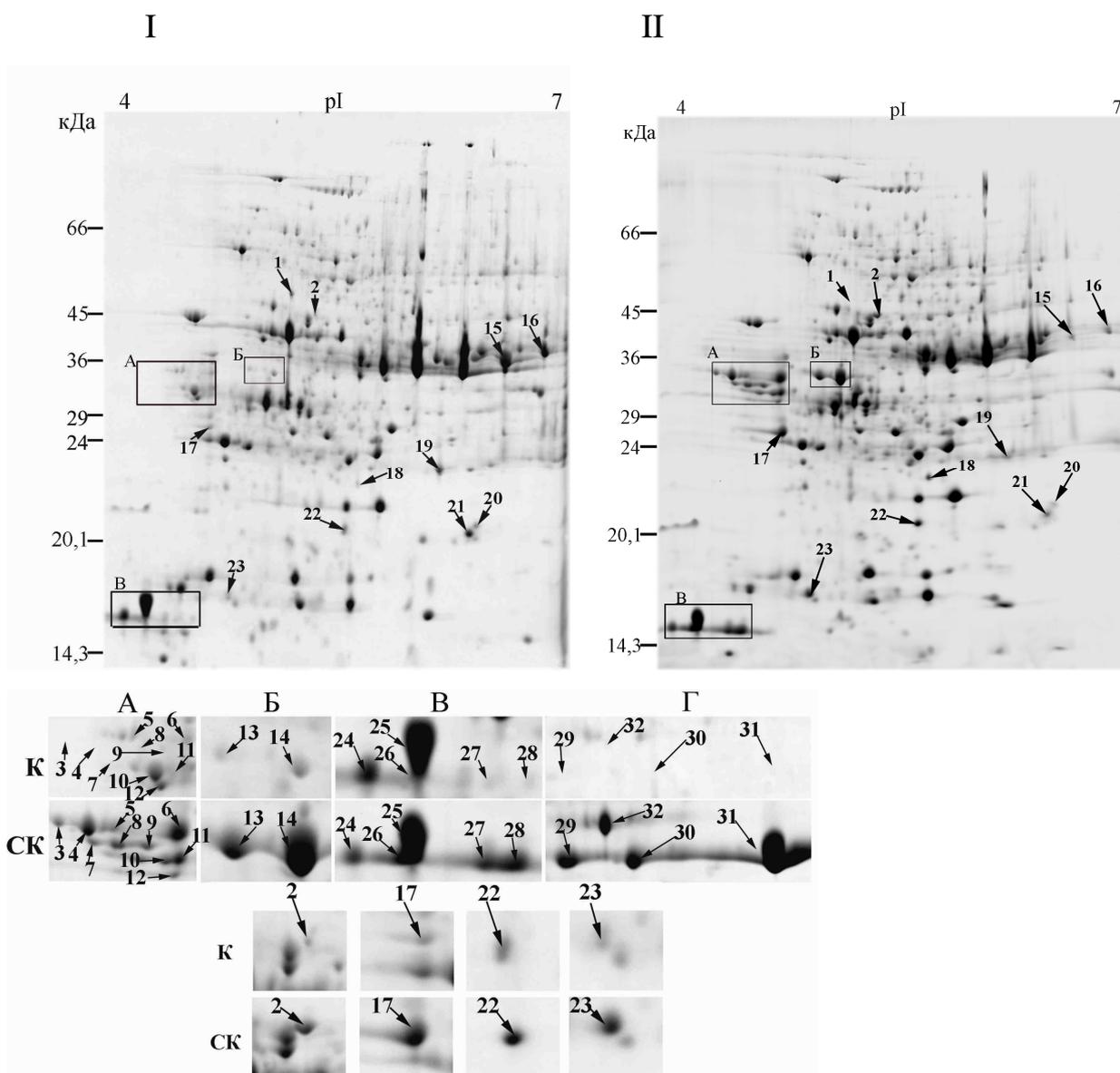


Рисунок 4. 2Д-электрофореграмма растворимых белков листьев проростков гороха контрольного варианта (I) и растений, обработанных 50 мкМ салициловой кислотой (II).

Выявлена индукция бета-1,3-глюканаз – ферментов, гидролизующих бета-1,3-связи в полисахаридах клеточных стенок патогенов, относящихся к группе PR-2 белков (Van Loon, 2006). Образующиеся в результате реакции фрагменты полисахаридов обладают иммунорегулирующими свойствами. Эти ферменты, так же, как хитиназы, можно считать маркерами защитного ответа растений на действие различных патогенов. Одновременное СК-индуцированное повышение содержания хитиназ и бета-1,3-глюканаз может быть весьма целесообразным потому, что они вызывают синергическое подавление развития патогенных грибов (Minic, 2008).

Впервые показано СК-индуцированное повышение содержания в листьях глутаминамидотрансферазы (пятно 29, рис. 4) и трех белков пластид – липид-десатуразоподобного белка, альфа - амилазы и белка 33 кДа фотосистемы II.

Глутаминамидотрансфераза (glutamine amidotransferase class-I domain-containing protein) - это фермент, потенциально усиливающий возможность использования амидогруппы глутамина на синтез пуриновых и цитозинового нуклеозидов с последующим образованием нуклеозидтрифосфатов и синтеза из них ДНК и РНК.

СК-индуцированное повышение содержания липиддесатуразоподобного белка (пятно 9, рис. 4), который в листьях локализован, главным образом, в хлоропластах, привлекает особое внимание в связи с тем, что десатурация жирных кислот необходима для синтеза полиеновых жирных кислот, из которых в ходе липоксигеназных реакций синтезируются гидроперокси-производные, участвующие в липоксигеназном сигнальном каскаде. Многие из образующихся при этом оксипинонов являются стрессовыми фитогормонами, сигнальными соединениями, летучими и нелетучими антибиотиками (Grechkin, 1998).

Альфа-амилаза (пятно 2, рис. 4) катализирует первую реакцию в метаболической цепи деградации крахмала, и повышение ее содержания

может обеспечить снабжение глюкозой процессов биосинтеза различных углеводов и процессов дыхания.

Белок 33 кДа фотосистемы II (пятно 22 рис. 4) представляет собой магний-стабилизирующий белок, играющий важную роль в функционировании O_2 -выделяющего хлорофилл-белкового комплекса (Wyman et al., 2005). Повышение содержания белка 33 кДа фотосистемы II может обеспечить большую устойчивость этого структурного компонента фотосинтеза - «горячего цеха» хлоропластов, в котором образуются промежуточные активные формы кислорода.

В наших экспериментах была подтверждена обнаруженная ранее другими авторами СК - индукция белка, отвечающего за устойчивость к болезням (disease resistance response protein) (пятно 23), синтез которого значительно усиливался также при действии различных патогенов (Curto et al., 2006), что говорит о его роли в повышении устойчивости растений.

СК вызывала уменьшение содержания 9 растворимых белков из них нами был идентифицирован белок 15 - предшественник малатдегидрогеназы. Изоформы малатдегидрогеназ участвуют в челночном переносе восстановительных эквивалентов между хлоропластами, цитозолем и митохондриями, в цикле лимонной кислоты в митохондриях в других окислительно-восстановительных реакциях.

Можно отметить, что большинство из идентифицированных нами СК-индуцируемых белков листьев могут принимать участие в защитных функциях растений. Часть из них может разрушать клеточные стенки патогенных микроорганизмов (хитиназа, гликозидгидролаза семейства 18, бета-1,3-глюканазы), другие – повышать устойчивость клеток (белок устойчивости к болезням) и способствовать активации липоксигеназного сигнального каскада (липиддесатураза).

На 2Д-электрофореграммах обнаруживалось более 900 пятен растворимых белков корней проростков гороха (рис. 5). Выдерживание растений гороха в течение 5 дней на растворе СК (50 мкМ) приводила к

изменению набора белков и содержания ряда индивидуальных белков. Эти изменения оказались характерными для 27 белков. Обнаруживалось вызванное СК не только повышение, но и снижение содержания некоторых белков (например, 13, 22, 23 и 24 рис. 5).

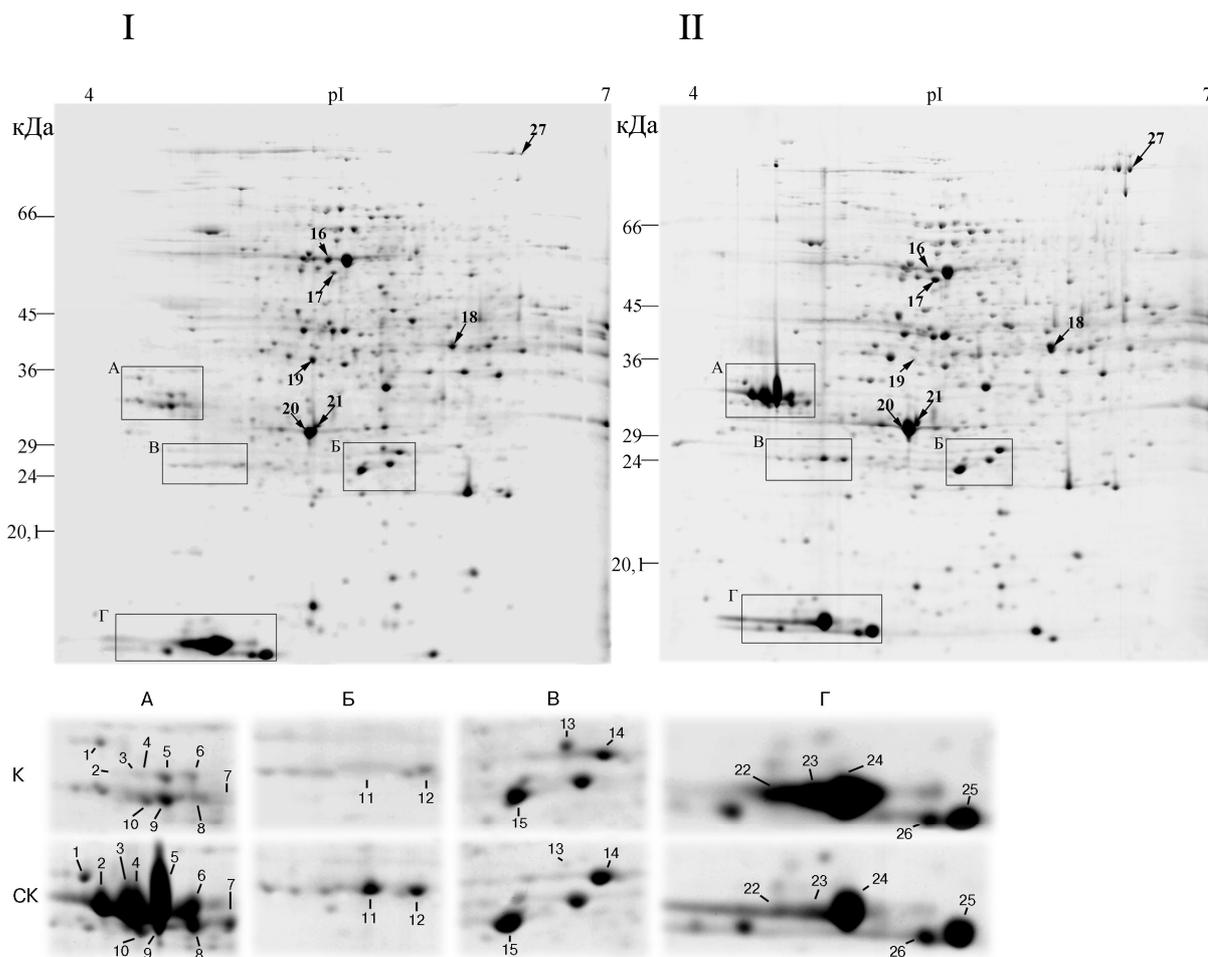


Рисунок 5. 2Д-электрофореграмма растворимых белков корней гороха контрольного варианта (I) и обработанных 50 мкМ салициловой кислотой (II).

Значительная часть белков, содержание которых существенно изменилось под влиянием СК, были идентифицированы, с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии.

Нами впервые были идентифицированы в качестве СК-индуцируемых следующие белки: бета-субъединица В трансляционного фактора I элонгации (пятна 1, 9), 10,11-редуктаза 12-оксофитодиеновой кислоты (пятно 13), малатдегидрогеназа цитоплазматическая (пятно 18), нуклеотидсвязывающий обогащенный лейциновыми повторами белок (NBS-LRR type RGA) (пятно 21), липоксигеназа (пятно 27), АБК - зависимый белок (пятно 26).

Трансляционный фактор элонгации 1 (фактор элонгации трансляции) является одним из двух трансляционных факторов, участвующих в синтезе белка у эукариот. На стадии элонгации происходит перенос последовательности мРНК в последовательность аминокислот. Трансляционный фактор элонгации 1 отвечает за доставку молекул аминоацильных-тРНК на рибосомы, а бета субъединица - это гуанин-нуклеотидобменный домен, она обладает нуклеотид - обменной активностью (Proud, 1994). Повышение его содержания может отражать тенденцию к усилению синтеза ряда белков под влиянием СК.

Глутатион-S-трансферазы участвуют в детоксикации продуктов, образующихся при инфицировании растений и действии элиситоров. Они катализируют реакции присоединения трипептида глутатиона (γ -глутамил-цистеил-глицин) к цитотоксичным соединениям, к природным или синтетическим ксенобиотикам через реакции нуклеофильного замещения, в результате которых образуются нетоксичные для клетки глутатион-S-конъюгаты (Coleman et al., 1997).

АБК-зависимый белок. Биологические функции этого белка остаются не до конца понятными. Этот белок является представителем семейства PR-10 белков, для которых показана рибонуклеазная активность (Srivastava et al., 2006). По этой причине предполагается, что он важен в защите растений от вирусных патогенов.

NBS-LRR белок – впервые обнаружен нами в качестве СК-индуцируемого. NBS-LRR белки относятся к числу комплексообразующих, принимающих участие в функционировании многих сигнальных путей. Одна

из функций – участие в узнавании экскретируемых патогенами эффекторных белков, что приводит в действие сигнальные пути, завершающиеся синтезом защитных белков и индукцией фитоиммунитета (De Yaung, Innes, 2006).

Малатдегидрогеназа катализирует превращение малата в оксалоацетат. В эукариотических клетках существует, по крайней мере, две изоформы этого фермента – митохондриальная и цитоплазматическая. Митохондриальная малатдегидрогеназа является ферментом цикла трикарбоновых кислот. Цитоплазматическая - участвует в малат/аспартатном челночном пути переноса восстанавливающих эквивалентов через мембрану митохондрий. СК-индуцируемое повышение содержания этого фермента может быть связано с обнаруженной ранее СК-активацией энергетики клеток, в частности, с активацией дыхания (Гордон и др., 2002).

Липоксигеназы являются ключевыми ферментами липоксигеназного сигнального каскада, катализирующими реакцию оксигенирования полиеновых жирных кислот, в результате чего образуются их гидропероксидные формы, а из них - различные биологически активные циклические и нециклические производные ненасыщенных жирных кислот, называемые оксилипинами (Гречкин, Тарчевский, 1999), принимающие участие в защите растений от патогенов.

10,11-редуктаза 12-оксофитодиеновой кислоты является одним из ферментов липоксигеназного каскада. Мы впервые обнаружили салицилат-индуцированное исчезновение (рис. 13, 14, зона В, белок 13) этого важного фермента, катализирующего одну из последних реакций в метаболической цепи синтеза жасмоновой кислоты (ЖК). Таким образом, мы показали одно из возможных объяснений механизма обнаруженного ранее подавления экзогенным салицилатом образования жасмоновой кислоты.

Жасмоновая кислота является важной сигнальной молекулой, участвующей в активации защитных ответов при механическом повреждении (раневом стрессе) тканей растений и при атаке патогенов (Smith et al., 2009). Она синтезируется из α -линоленовой кислоты ферментами липоксигеназного

сигнального пути (Гречкин, Тарчевский, 1999; Feussner et al., 2002). Линоленовая кислота образуется из липидов мембран хлоропластов и фосфолипидов плазмалеммы при участии ферментов фосфогалактолипаз и фосфолипаз А₂.

Подводя итог полученным в этой серии опытов результатам можно заключить, что СК вызывала усиление синтеза белков, повышающих устойчивость, как самих растительных клеток, так и белков прямого антипатогенного действия. Особенно важным можно считать обнаружение СК-индуцируемого исчезновения 10,11-редуктазы 12-оксофитодиеновой кислоты. Это может не только затормозить синтез жасмонатов, но и привести к накоплению их предшественника – ОФДК, являющегося важнейшим фактором локального иммунитета растений.

Интересно, что в корнях гороха мы не обнаружили СК-индуцированного повышения содержания хитиназ и бета-1,3-глюканаз. У растений люцерны конститутивные хитиназы были обнаружены в корнях, но не в листьях (Watson et al., 2003). Возможно, что в корнях бобовых растений хитиназы присутствуют в основном за счет конститутивного синтеза, а в листьях – за счет индуктивного (в нашем случае - СК-индуцируемого). С этим выводом согласуются данные, свидетельствующие о том, что в корнях растений имеется почти в два раза большее, по сравнению с листьями, число конститутивных белков, отвечающих за иммунитет и устойчивость (Nozu et al., 2006).

Нами было так же исследовано влияние на протеомы растений другого стрессового фитогормона – жасмоновой кислоты и ее производного метилжасмоната (МеЖ), причем основное внимание было уделено протеомам корней, поскольку ранее другими исследователями изучались в основном протеомы надземных органов. В то же время корни постоянно подвергаются опасности инфицирования почвенными биотрофными и некротрофными микроорганизмами и исследование опосредованного

стрессовыми фитогормонами ответа на их воздействие представляется чрезвычайно важным. Ниже приводятся основные результаты этой работы.

Было обнаружено, что обработка растений МеЖ приводит к повышению или снижению содержания около 20 белков (рис. 6) из обнаруживаемых на электрофореграммах около 600 белков. Белки, содержание которых изменялось сильнее всего, были нами идентифицированы методом MALDI-TOF масс-спектрометрии. Под влиянием МеЖ происходило повышение содержания двух изоформ ингибиторов протеиназ (белковые пятна 10, 11). Известно, что некротрофные патогены при инфицировании растений выделяют ферменты протеиназы для разрушения белков растений. Повышение содержания ингибиторов этих протеиназ, опосредованное МеЖ, является важным защитным ответом корней растений. Обнаружено появление другого ранее обнаруженного в надземных органах антипатогенного белка прямого действия дефензина.

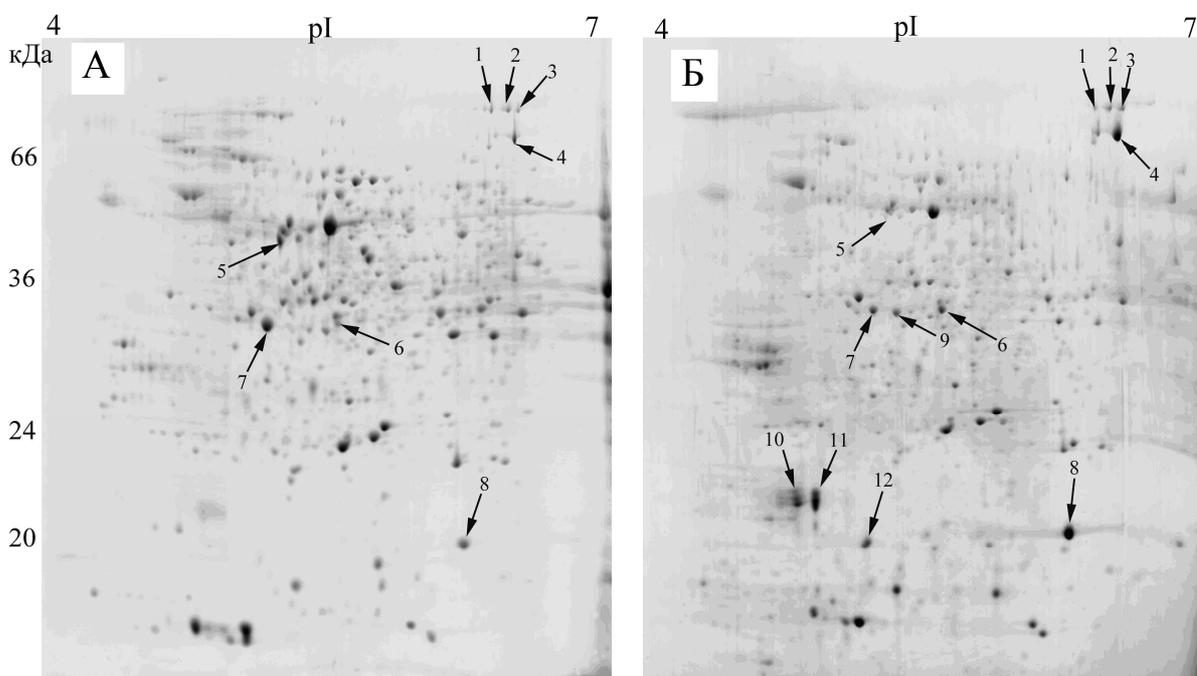


Рисунок 6. 2Д-электрофореграммы растворимых белков корней гороха, разделенных с иммобилизованным градиентом рН 4-7. А – растворимые белки контрольных растений, Б – белки корней проростков гороха, обработанных 20мкМ метилжасмоната в течение 3 суток.

(белковое пятно 6), нарушающего функционирование клеточной мембраны патогенов и, вследствие этого, подавляющего развитие патогенов. Наблюдалось также повышение содержания белка ABR17 (белковое пятно 12), относящегося к классу PR10 защитных белков растений и фермента профукозидазы (белковое пятно 8), принимающего участие в реорганизации полисахаридов клеточных стенок, что может быть связано с торможением роста корней. Ингибирование роста может объясняться и обнаруженным нами МеЖ-зависимым полным исчезновением тубулина А (белковое пятно 5). Тубулин является компонентом микротрубочек, которые играют важную роль в делении и удлинении клеток, от которых зависит рост корней. Известно, что микротрубочки участвуют в синтезе и ориентации микрофибрилл целлюлозы, формирующей структуру клеточных стенок.

Повышалось содержание фруктокиназы (белковое пятно 6), принимающей участие в энергетическом метаболизме. Обращает на себя внимание повышение содержания трех изоформ липоксигеназ (белковые пятна 1-3) – ферментов, обеспечивающих окисление линоленовой кислоты, входящей в состав клеточных мембран растений и дающих начало известному каскаду образования многих биологически активных оксипинов, часть из которых обладает антипатогенным действием. Повышалось содержание белкового пятна 4 идентифицированного как 5-метилтетрагидроптероилтриглутаматгомоцистеин-S-метилтрансфераза, которая катализирует важную для аминокислотного метаболизма реакцию переноса метильной группы на серу гомоцистеина с образованием метионина.

При совместном действии салициловой кислоты и МеЖ в протеомах корней гороха происходит сохранение изменений, характерных для действия каждого фитогормона по отдельности, включая образование защитных белков. Так как салициловая кислота является ключевым фактором иммунитета против биотрофных патогенов, а МеЖ – против некротрофных, то полученные результаты могут использоваться для рекомендаций по

составу антипатогенных препаратов одновременно и против биотрофных и некротрофных патогенов.

Актуальной проблемой фитопатологии является изучение мембранной регуляции стрессовых ответов растения и патогена. Биологическая мембрана является важным многофункциональным компонентом живой клетки, выполняющим защитную, структурную, транспортную, сигнальную функции. Одним из основных свойств мембраны является ее избирательная проницаемость для различных молекул и ионов, благодаря чему обеспечивается поддержание внутриклеточного ионного гомеостаза. Липидная составляющая биологических мембран является неоднородной, динамичной и обуславливает нормальное функционирование клеток. Основными мембранными липидами являются фосфолипиды, сфинголипиды и стерины. Стерины являются важными компонентами биологических мембран, оказывающими упорядочивающее воздействие на их структуру. Интересной особенностью растений является сложный стериновый состав.

В настоящее время исследование функций растительных стеринов вышло на новый уровень. Стеринам отводится не только структурная, но и регуляторная роль. Известно, что стерины являются предшественниками растительных гормонов brassinosterоидов, регулирующих рост и развитие (Wang, 2006). Кроме того, стерины принимают непосредственное участие в трансмембранной трансдукции сигналов внутрь клетки посредством формирования специфических липидных микродоменов, обогащенных стеринами и сфинголипидами. Такие микродомены, так называемые липидные рафты, могут служить платформами для заякоренных на них сигнальных ферментных комплексов (Laloi et al., 2007). Таким образом, фитостерины, посредством изменения состава и соотношения молекулярных видов, оказывают существенное влияние на процессы роста, развития и ранние стрессовые ответы растений.

Известно, что модуляция стеринового компонента мембран приводит к изменениям в структуре мембранных липидов и, как следствие, влияет на

проницаемость и функционирование мембран (Валитова и др., 2010). Искусственная модификация стеринового компонента мембран может быть осуществлена с помощью полиенового антибиотика нистатина. Нистатин специфически связывается с эндогенными стеринами и образует в мембранах каналы размером 4-7Å, вызывая вытекание из клетки ионов, воды, аминокислот и белков. В медицине нистатин находит широкое применение с целью подавления роста патогенных грибов (Semis et al., 2010). В микроорганизмах нистатин индуцирует потерю ионов калия, фосфатов, сахаров и других соединений, приводя к гибели клеток (Sharma et al., 2010). В животных мембранах нистатин связывается с холестерином. Однако механизмы влияния нистатина на мембраны растительного происхождения изучены крайне ограниченно.

Ранее нами было показано, что в клетках корней пшеницы в присутствии нистатина уменьшается содержание стеринов, в частности, β -ситостерина и кампестерина (Valitova et al., 2011). Кроме того, при действии нистатина на отсеченные корни пшеницы происходила деполяризация мембран, значительное увеличение проводимости для воды, K^+ , а также усиление потребления клетками кислорода и увеличение скорости тепловыделения (Гордон и др., 2005). Можно полагать, что нистатин вызывает разнообразные физиолого-биохимические и молекулярно-генетические эффекты в растительных клетках. Для выяснения специфичности эффектов, индуцируемых истощением стеринов, в настоящей работе был также использован полипептидный антибиотик грамицидин S – каналоформер, который неспецифически увеличивает проницаемость клеточных мембран, но не приводит к истощению стеринов. Как известно, мембраноактивное соединение грамицидин S нарушает белок-липидные взаимодействия внутри мембраны и образует каналы утечки ионов и других метаболитов (Katsu et al., 1986). В рамках настоящего этапа проекта нами были исследованы эффекты нистатина и грамицидина S на проницаемость мембран для калия в корневых клетках, образование перекиси водорода и

уровень жизнеспособности клеток. Важным критерием явился анализ уровня относительной экспрессии пероксидазных и аутофагических генов.

Было установлено, что 12 ч воздействие на интактные проростки пшеницы 1 мкМ нистатина и 1 мкМ грамицидина S вызывает трехкратное увеличение проницаемости плазмалеммы корней для ионов калия. При действии нистатина в бóльших концентрациях (10 и 20 мкМ) выход ионов калия из клеток корней усиливался еще более значительно (табл. 1).

Таблица 1. Изменение содержания ионов калия в среде выращивания при 12 ч воздействии нистатина и грамицидина S

Воздействие	K ⁺
Контроль	0,45 ± 0,03
Нистатин (1 мкМ)	1,43 ± 0,05
Нистатин (10 мкМ)	2,25 ± 0,12
Нистатин (20 мкМ)	4,86 ± 0,11
Грамицидин S (1 мкМ)	1,35 ± 0,07

Как известно, увеличение ионной проницаемости плазмалеммы с помощью различных агентов, в том числе антибиотиков различной природы, сопровождается развитием окислительного стресса. Увеличение содержания АФК является признаком активизации окислительных процессов в клетке. В наших экспериментах было показано, что увеличение проницаемости мембран, вызванное 12 ч действием на корни проростков 1 мкМ нистатина, приводило к усилению образования H₂O₂ в три раза. Воздействие на корни 1 мкМ грамицидина S также вызывало увеличение содержания H₂O₂, но в меньшей степени – в два раза (табл. 2).

В метаболизме H₂O₂ принимает участие целый ряд редокс-ферментов, в том числе пероксидазы, локализованные в клеточной стенке. В растениях

Таблица 2. Содержание H_2O_2 в корнях пшеницы при 12 ч воздействии нистатина и грамицидина S

Воздействие	Содержание H_2O_2 , мкмоль/г сыр.м.
Контроль	$6,30 \pm 0,04$
Нистатин (1 мкМ)	$19,77 \pm 0,03$
Гр S (1 мкМ)	$11,21 \pm 0,03$

пероксидазы способны не только детоксицировать перекись водорода, но и образовывать H_2O_2 при стресс-индуцированном окислительном взрыве, что говорит о многообразной регуляторной роли этих ферментов в поддержании клеточного гомеостаза (Minibayeva et al., 2009). Пероксидазы представлены в клетке множеством изоформ и большим количеством генов, их кодирующих. До настоящего времени проблема вклада различных изоформ пероксидаз в регуляцию уровня АФК остается актуальной. Активация пероксидаз может наблюдаться в стрессовых условиях как за счет имеющихся пероксидаз, так и за счет синтеза ферментов *de novo*.

В нашей лаборатории была выделена и охарактеризована пероксидаза 37 кДа, которая, как было показано, активизируется при стрессе (Minibayeva et al., 2009). Анализ экспрессии генов пероксидаз 37 кДа, проведенный с использованием метода ПЦР в реальном времени со специфичными праймерами, выявил, что при действии нистатина в концентрации 1 мкМ в течение 12 ч уровень продукта экспрессии повышался в 6 раз по сравнению с контролем что, однако, не происходило в присутствии нистатина в бóльшей концентрации (рис. 7). При 12 ч воздействии грамицидина S экспрессия пероксидазных генов увеличивалась в 2 раза, в то время как к 36 ч воздействия происходило подавление уровня экспрессии по сравнению

с контролем. Можно предположить, что в образование АФК при действии нистатина могут вносить вклад ферменты пероксидазы. Возможно, что при длительном (36 ч) воздействии антибиотика оказывают значительную токсичность на клетки корня, вследствие чего повышенной экспрессии этих генов не наблюдается.

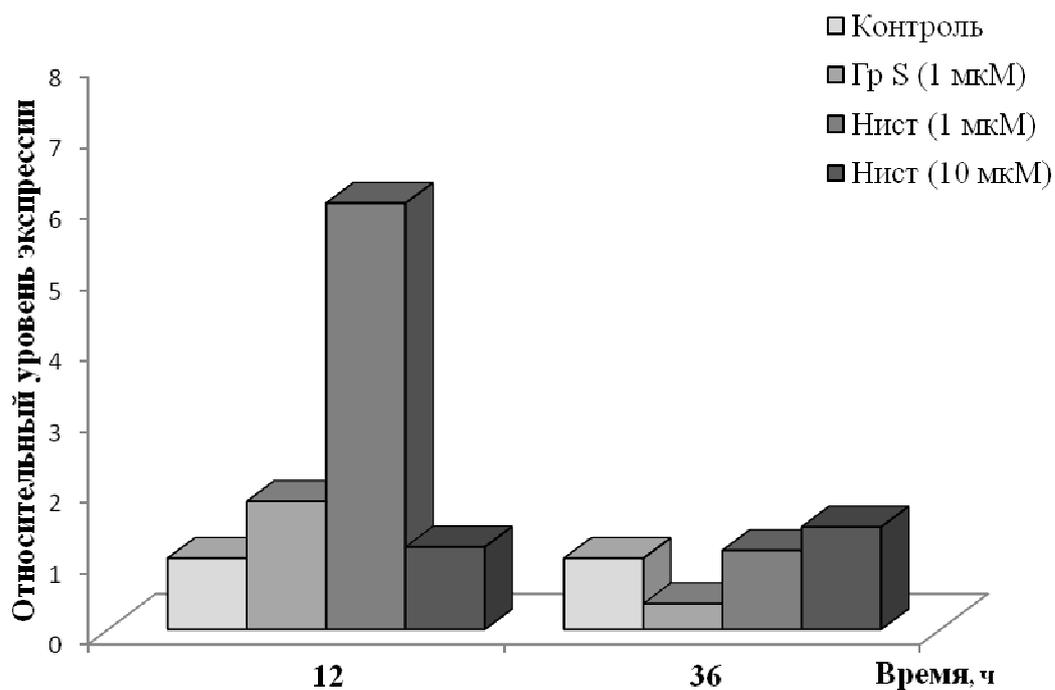


Рисунок 7. Относительный уровень экспрессии генов пероксидазы *Tarox37*.

Таким образом, данные по увеличению содержания в клетках H_2O_2 и изменению экспрессии генов пероксидаз свидетельствуют о том, что воздействие на корни проростков пшеницы антибиотиков, увеличивающих проницаемость для ионов, вызывает в клетках окислительный стресс.

Важным механизмом, способствующих удалению окисленных белков, липидов и поврежденных органелл, является процесс аутофагии. Исследованиями, проведенными нами ранее, было показано, что окислительный стресс в клетках корней пшеницы приводит к интенсивному образованию аутолитических вакуолей (аутофагосом) (Дмитриева и др., 2009; Дмитриева с др., 2012). Среди молекулярных механизмов,

регулирующих процесс аутофагии и образования аутофагосом, определяющую роль играет активность многочисленных аутофагических генов и белков. В пшенице *Triticum aestivum* L. на данный момент обнаружено и идентифицировано 5 *atg* генов (*atg3*, *atg4*, *atg6*, *atg8*, *atg9*). Одними из ключевых *atg* генов, участвующих в формировании аутофагосом, являются *atg4* и *atg6*. Аутофагический белок АТG6 является главным активатором аутофагии, регулирующим процесс мембранной секвестрации (изолирования) подлежащих удалению органелл. Он связывается с мембранным комплексом PI3K (Patel, Dinesh-Kumar, 2008). Аутофагический белок АТG4 является цистеиновой протеиназой, имеющей ряд конститутивных остатков цистеина, благодаря чему, является редокс-сенсором в клетке. АТG4 участвует в липидизации АТG8, расщепляя его в области С-конца и экспонируя глицин на С-конце. Это расщепление активирует АТG8 и позволяет этому белку связываться с фосфатидилэтаноламином для дальнейшего формирования аутофагической мембраны (Levine, Klionsky, 2004). Белки, участвующие в формировании аутофагосом, являются конститутивными и синтезируются в клетках в нормальных физиологических условиях. При стрессе, однако, их активность значительно возрастает.

Нами был проведен анализ экспрессии этих генов в корнях пшеницы, подвергнутых воздействию нистатина и грамицидина S. Методом анализа ПЦР в реальном времени было показано, что при действии нистатина в концентрациях 1 мкМ и 10 мкМ в течение 12 ч увеличения экспрессии аутофагического гена *atg4* не происходит, однако длительное (36 ч) воздействие нистатина индуцирует повышение уровня экспрессии *atg4* в 8-9 раз (рис. 8). При действии на корни грамицидина S экспрессия *atg4* повышалась в 3 раза при 12-часовом воздействии и оставалась неизменной через 36 ч (рис. 8).

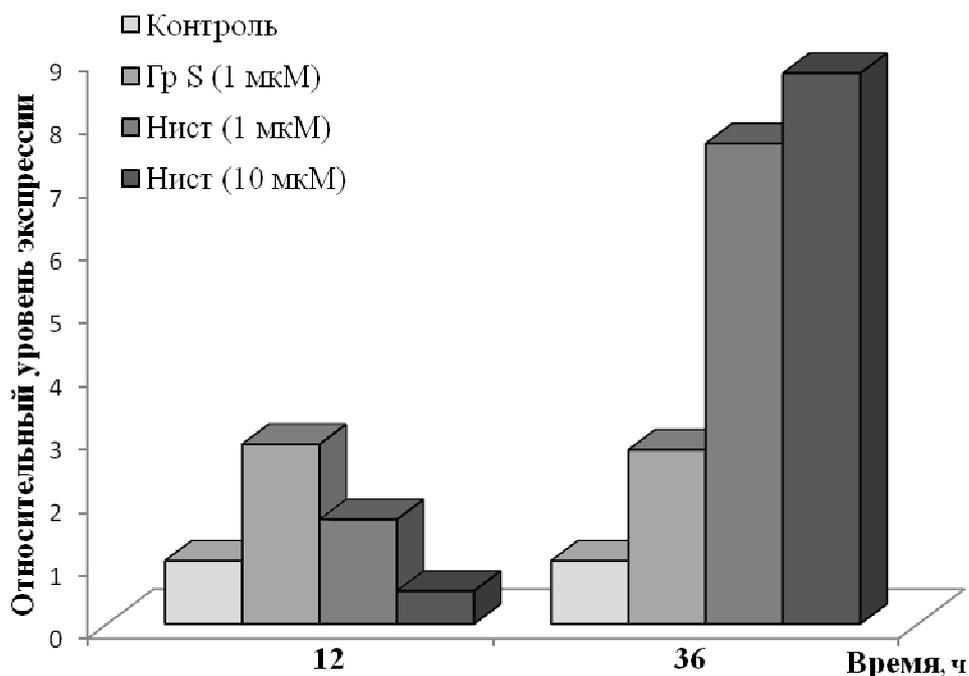


Рисунок 8. Относительный уровень экспрессии гена *Taatg4*.

Изменения экспрессии аутофагического гена *atg6*, индуцированные как обработкой растений нистатина, так и грамицидина S, были незначительными. Так, при 12-часовом действии грамицидина S и 10 мкМ нистатина экспрессии стимулировалась примерно в 2 раза, а при действии 1 мкМ нистатина - в 1,5 раза (рис. 9). Увеличение времени воздействия грамицидина S до 36 ч не привело к изменению уровня экспрессии данного гена, а при действии нистатина наблюдалось значительное подавление экспрессии по сравнению с таковым при 12-часовой обработке (рис. 7).

Таким образом, анализ экспрессии аутофагических белков при действии нистатина и грамицидина S выявил различия эффектов этих каналоформеров на интенсивность и динамику индукции генов. Незначительная стимуляция экспрессии *atg4* и *atg6*, вызванная неспецифическим каналоформером грамицидином S, не изменялась с течением времени. Напротив, стерин-специфичный агент нистатин с увеличением времени воздействия драматически стимулировал экспрессию

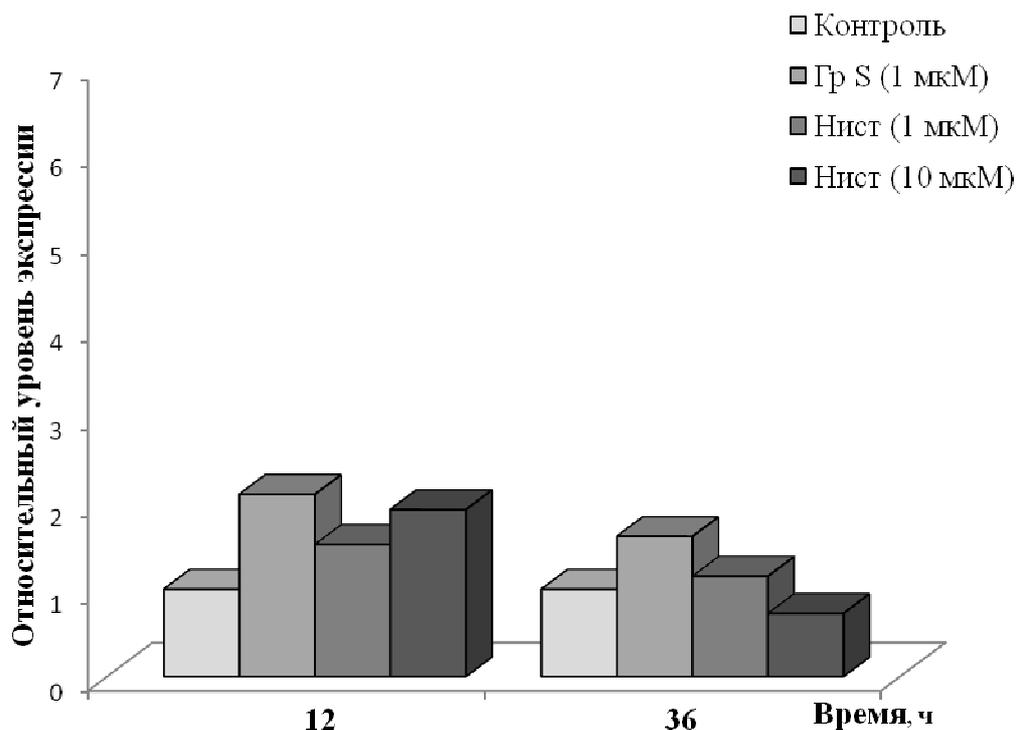


Рис. 9. Относительный уровень экспрессии гена *Taatg6*.

гена *atg4*, кодирующего редокс-регулируемый аутофагический белок ATG4. Уровень экспрессии *atg6* при действии нистатина со временем понижался. Возможно, это связано с различиями в функциях данных белков в процессе аутофагии.

Многочисленные исследования свидетельствуют о том, что аутофагия играет двойственную роль и может способствовать как выживанию, так и гибели клеток. В наших экспериментах было проведено изучение уровня жизнеспособности клеток с помощью Эванса синего, накапливающегося в мертвых клетках. Анализ жизнеспособности клеток корней при действии 1 мкМ нистатина и 1 мкМ грамицидина S показал, что процент гибели клеток был невысоким по сравнению с контролем (Рис. 10). С ростом концентрации нистатина происходило падение жизнеспособности корневых клеток, связанное с нарушением целостности мембран и развитием окислительного стресса.

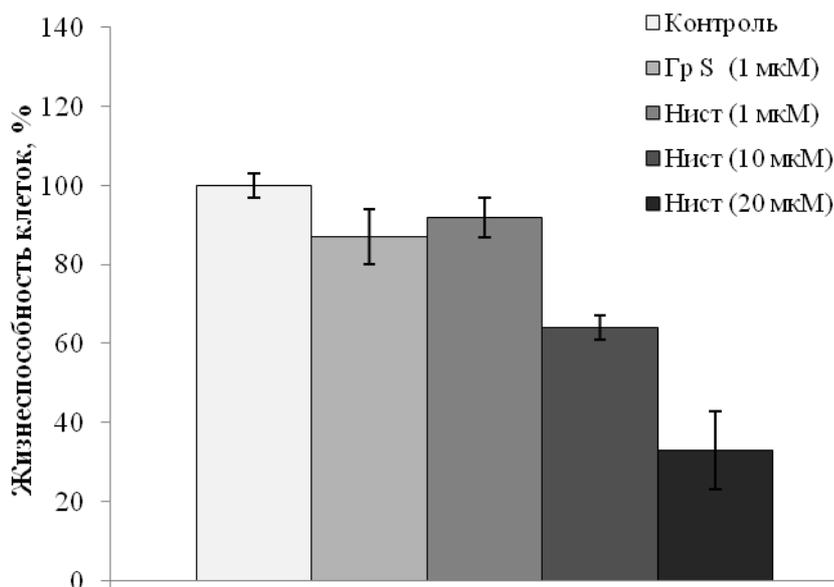


Рис. 10. Жизнеспособность клеток корней пшеницы при 12 ч действии грамицидина S и нистатина.

Большое значение в регуляции аутофагии в растительных клетках имеет тонкий баланс между функционированием АФК в качестве сигнальных молекул и токсическим эффектом их избыточного накопления. В то же время в условиях жесткого стресса, в том числе при значительном увеличении проницаемости мембран, усиленная аутофагия является формой программируемой клеточной смерти. В наших экспериментах нистатин и грамицидин S индуцировали интенсивное образование аутофагосом и стимулировали экспрессию аутофагических генов в корнях пшеницы, что свидетельствует об активации процессов аутофагии. Результаты уровня жизнеспособности клеток свидетельствуют о том, что количество погибших по пути аутофагии клеток увеличивается при действии 20 мкМ нистатина. При действии нистатина в меньших концентрациях и грамицидина S аутофагия, вероятно, направлена на выживание.

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о том, что нарушение мембранной проницаемости клеток каналоформерами различной природы приводит к развитию в клетках растений окислительного стресса и индукции аутофагии. Анализ молекулярно-генетических эффектов стерин-истощающего агента нистатина и неспецифического каналоформера

грамицидина S свидетельствует о том, что токсичное действие этих антибиотиков на клетки сопровождается изменением интенсивности экспрессии ключевых антиоксидантных и аутофагических генов.

2.1.3. Моделирование репрограммирования генов вирулентности фитопатогенов с использованием аналогов аутоиндукторов микроорганизмов

Как правило, активация вирулентных свойств зависит от наличия потенциальной (специфичной) жертвы, подходящих условий и готовности самих патогенов. Эти параметры оцениваются глобальными и специализированными сигнальными системами. Влияние на эти системы является эффективным способом сдвига направления развития патосистем.

Одним из основных факторов вирулентности фитопатогенных бактерий являются ферменты деградации клеточной стенки растений. Фитопатоген *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 (*Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*, *Pba*) обладает арсеналом таких ферментов. Ключевая роль среди них принадлежит пектат-лиазам (Desender, et al., 2006) Регуляция их синтеза и секреции контролируется сигнальными системами бактерий, реагирующих на изменения условий внешней среды, таких как температура, pH, ионная сила, доступность ионов железа, азота и другие параметры, характеризующие переход от сапрофитного образа жизни бактерий к паразитическому при взаимодействии с растениями (Den Besten, et al, 2007). Среди этих параметров эффект экстрагируемых растительных сигналов представляет наибольший интерес.

Было выявлено изменение в транскрипционной активности генов бактерий, отвечающих за регуляцию факторов вирулентности и зафиксировано усиление активности гидролитических ферментов при взаимодействии бактерий с растениями и регулируемые сигнальными соединениями растительного происхождения.

В результате проведенных экспериментов было установлено, что

супернатанты бульонных культур *P. atrosepticum* не обладают пектат-лиазной активностью. Незначительная активность проявляется супернатантами культур, выращиваемых на минеральной среде М63. Добавление экстрактов листьев картофеля значительно увеличивало пектат-лиазную активность (рис. 11). Добавление рифампицина, блокирующего синтез белка, снимало данный эффект. Увеличение ферментативной активности коррелировало с активацией транскрипции генов *pel* (рис. 12).

Таким образом, нами установлено, что регуляция основных генов вирулентности *Pba* осуществляется с обязательным участием метаболитов растения-хозяина. Максимальная активность генов, отвечающих за синтез гидролитических ферментов, наблюдается при достижении популяцией бактерий пороговой величины плотности клеток. При переходе на стационарную фазу роста активность этих генов значительно снижается.

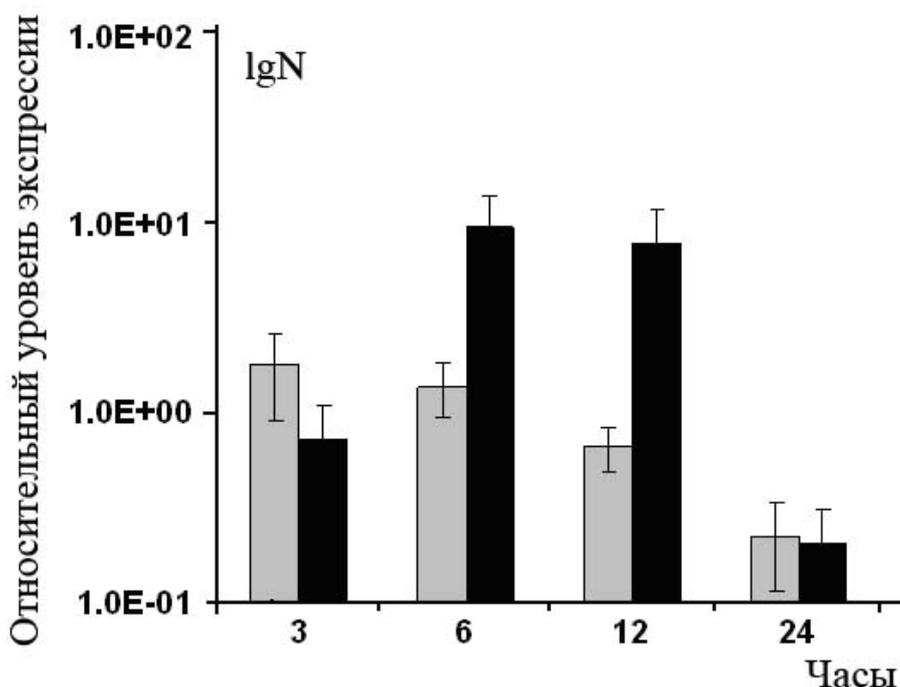


Рисунок 11. Экспрессия *pelB* гена в клетках *P. atrosepticum* SCRI1043, растущей на минимальной среде М63 (серые столбцы) и М63 с растительным экстрактом (черные столбцы).

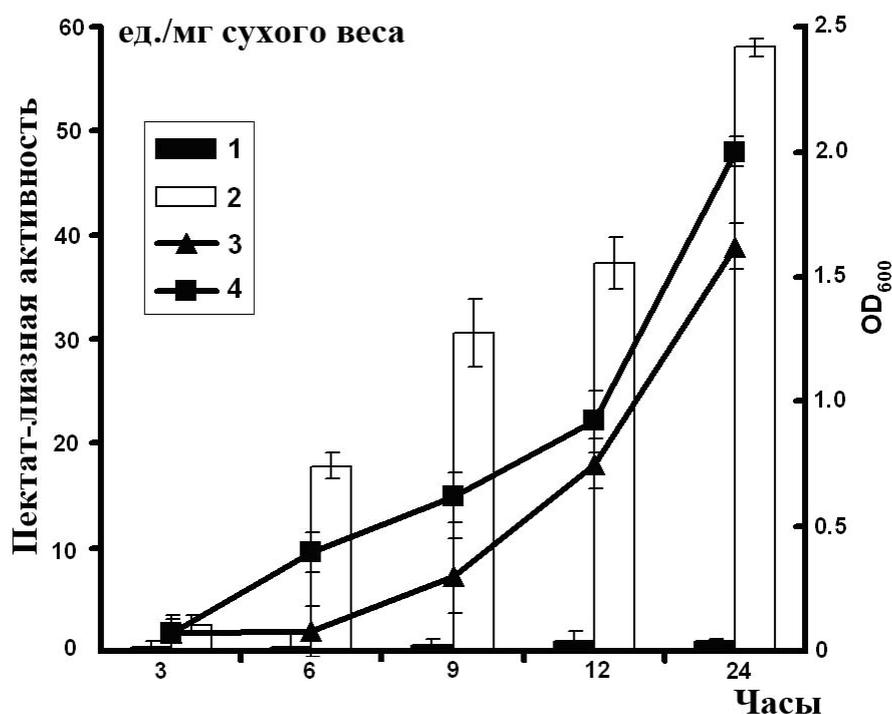


Рисунок 12. Пектат-лиазная активность в клетках *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 (столбцы) и оптическая плотность культуры клеток *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 (линии), инкубированных на минимальной среде М63 без растительного экстракта (1 и 3), и на М63 в присутствии растительного экстракта (2 и 4).

Глобальная регуляция, затрагивающая до 10% бактериального генома осуществляется системой кворум-сенсинга *Pba*. Функционирование этой системы регулируется диффундирующими сигнальными соединениями ацилгомосерин лактонами (АГЛ). Нами было выявлено, что регуляция генов кворум-сенсинга этого фитопатогена имеет сложный характер. После достижения клетками пороговой плотности кворума происходит репрессия генов регуляторами аутоиндукторной природы (рис. 13). В соответствии с ранее предложенной моделью кворум-сенсинга, накопление АГЛ и активация гена АГЛ-синтазы происходит в логарифмической прогрессии. При этом репрессия генов моделью не предусмотрена, поскольку возможный механизм репрессии остается не выявленным.

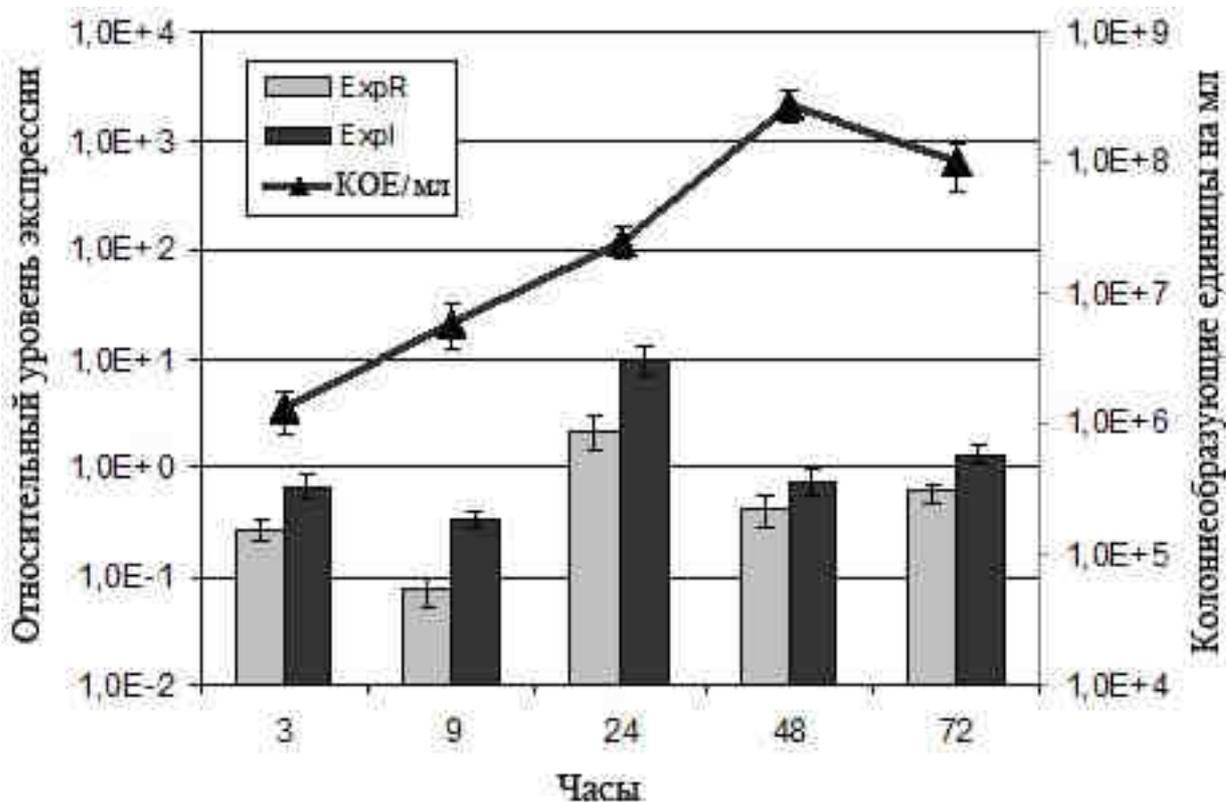


Рисунок 13. Динамика экспрессии генов кворум-сенсинга *expI* и *expR* в процессе роста культуры *Pba*.

Предложенная нами альтернативная модель регуляции генов *Pba* АГЛ-синтазы (*luxI*-гомолог *expI*) и регулятора кворум-сенсинга (*luxR*-гомолог *expR*) основана на использовании механизма РНК-интерференции. В соответствии с этой моделью, экспрессия гена *expR* связана с образованием протяженной антисмысловой РНК, комплементарной мРНК гена *expI*, вследствие конвергентного расположения генов с перекрыванием открытых рамок считывания (ОРС) (рис. 14). При этом ОРС гена *expI* ограничена двумя ро-независимыми терминаторами транскрипции, в то время как транскрипция гена *expR*, согласно рассчитанным положениям терминаторов на кодирующей цепи, терминируется за пределами гена *expI*. Это обеспечивает образование полноразмерных гетеродуплексов мРНК АГЛ-синтазы при транскрипции регуляторного гена (*expR*). В то же время, мРНК *expR* может образовывать лишь короткие гетеродуплексы в 3'-концевой области. Известно, что двунитевые РНК являются субстратом для особого класса РНК-аз, распознающих гетеродуплексы и некоторые шпилечные структуры.

К этим ферментам относятся РНК-аза III и РНК-за E. Таким образом, предполагаемый механизм регуляции гена АГЛ-синтазы *Pba* реализуется на посттранскрипционном уровне и заключается в деградации мРНК, индуцируемой продуктами транскрипции регуляторного гена. Ранее было показано, что регуляторный белок *ExpR* не имеет сродства к промотору гена *expI* и не участвует в регуляции его активности.

Предложенная модель была подтверждена в экспериментах по определению уровня транскрипции участков прямой и обратной цепей локуса *expI-expR* в клетках *Pba* на разных стадиях роста бактериальной культуры. Для этого нами был разработан и применен метод количественного ПЦР-анализа цепь-специфичных обратных транскриптов. В обычной реакции в качестве праймеров используются короткие неспецифичные «рэндом-нуклеотиды» с температурой плавления до 42 °С. Использование неспецифичных праймеров позволяет проводить тотальную обратную транскрипцию РНК. При этом низкая температура реакции необходима для предотвращения денатурации ферментов ревертаз и сохранения праймирующей способности коротких олигонуклеотидов. Недостатком тотальной амплификации является отсутствие возможности избирательного анализа смысловых и комплементарных им антисмысловых цепей.

Особенность разработанного нами метода заключается в использовании в реакции обратной транскрипции специфичных протяженных праймеров. Специфичность реакции обеспечивается высокой температурой реакционной смеси, которая не опускается ниже температуры плавления праймеров (60 – 65°С). Применение такого подхода возможно с использованием ревертазной активности термостабильной ДНК-полимеразы *Tth*. Недостатком метода является удаление ионов марганца и замена их магнием после реакции обратной транскрипции. Этот недостаток может быть устранен с появлением двух термостабильных ревертаз, выпускаемых с недавнего времени (*Thermoscript*, *Invitrogen*, США; *RevertAid Premium*, *Fermentas*, Литва).

A

```

*  AIGTTAGAGA TATTTGATGT AAATCACACC TTGTTGTCAG AAACGAAATC AGAAGAGCTA TTTACCCTCA GAAAAGAGAC GTTTAAAGAT CGACTGAATT
  TACAATCTCT ATAACTACA TTTAGTGTGG AACACAGCTC TTTGCTTTAG TCTTCTCGAT AAATGGGAGT CTTTTCCTCG CAAATTTCTA GCTGACTTAA
501  GGGCCGTSCA ATGTAAGTGC GGAATGGAGT TTGATCAGTA TGATAATAAT AACACGACTT ATCTTTTGG CATAAAAGAT AACACCCTTA TCTGTAGTTT
  CCCGGCACGT TACATGACTG CCTTACCTCA AACTAGTCACT ACTATTATTA TTGTGCTGAA TAGAAAAACC GTATTTTCTA TTGTGGCAAT AGACATCAAA
701  AAGTTTTATC GAAACAAAAT ACCCTAACAT GATTACTGGA ACATTTTTC CTTACTTCAA GGAGATAAAT ATTCCTGACG GGAATTATCT AGAATCTAGT
  TTCCAAATAG CTTTGTTTTA TGGGATTGTA CTAATGACCT TGTAAAAGG GAATGAAGTT CCTCTATTTA TAAGGACTGC CCTTAATAGA TCTTAGATCA
301  CGGTTCTTTG TGGATAAATC ACGGGCGAAA GATATTCTCG GCAATGAATA TCCAATTAGT TCGATGTTGT TTCTTTCGAT GATTAECTAT TCRAGAGATA
  GCCAAGAANC ACCTATTTAG TGCCCGCTTT CTATAAGAGC CGTACTTAT AGGTTAATCA AGCTACAACA AAGAAAGCTA CTAATTGATA AGTTCTCTAT
302  AAGGCTATGA TGGAAATAT ACGATAGTGA GTCATCCTAT GCTAACGATA TTA AACGTT CTGGCTGGGG AATTAGCGTA GTTGAACAAG GTCGTGTCAGA
  TTCCGATACT ACCTTATATA TGCTATCACT CAGTAGGATA CGATTGCTAT AATTTTGCAA GACCGACCCC TTAATCGCAT CAACTTGTTC CAGACAGTCT
501  AAAGGAAGAA AAGGTCTATT TAGTTTTTCT TCCCGTTGAT GATGAGAATC AAGAAGCTTT GGCTCGTCGT ATTAACCCGA GTGGACATT TATGAGCAAT
  TTTCTTCTT TTCCAGATAA ATCAAAAAGA AGGGCAACTA CTACTCTTAG TTCTTCGAAA CCGAGCAGCA TAATTGGCGT CACCCTGTAA ATACTCGTTA
502  GAATTGAAGC AGTGGCCTCT ACGGTTACCT GCGGCTATTC CACAGGCTTG ATGAGCTGTA ACTCAACGCC GAGCCTTATG GCATGCTTGG CATTACGGAC
  CTTAACTTCG TCACCAGGAG TGCCAAATGA CCGCGATATC GTGTCCGAC TACTCGACAT TGAGTTCCGG CTCGGAATAC CGTACGAACC GTAAGTCCTG
702  SCCAAGTTT TTGACAGCGT TGCCGATATG AAATTTTACC GTTGTGTTT TTATACGAG AATAATAGCC ACTTCCAGAT AGTTTTTACC CATGCTGGCC
  CGGTTCAAAA ABGTGTTGCA ACGGCTATAC TTTAAAATGG CAGGACCAA AATATGGCTC TTATTATCGG TGAAGGCTA TCCBAATGG GTACGACCGG
501  CAGTAAAGAA TTTCATTTTC TCGTTGAGAG AATATTCTT TATTATTAA TTGTTTCTTA TTCCCAATCA TCTCCTTSCA ABGGGASATG ATTTTTCAT
  GTCATTTCTT AAAGTAAAG AGCAACTCTC TTATAAAGAA ATAATAAAT AACAAAGAT AAAGTTAGT AGAGGAACGT TTCCTCTAC TAAAAAGTA
501  ATGCCTCGAT TAATAGCATT TGAAAGATGT CTTTTCTCTC TTCAATGAAT GTTTCAACGT CATCTGGATA CGAGTTATCC ACGATAATAG ATAACATGGC
  TACGGAGCTA ATTATCGTAA ACTTTCTACA GAAAAGAGAG AAGTTACTTA CAAAGTTGCA GTAGACCTAT GCTCAATAGG TGCTATTATC TATTTACCG
2001  CAGTTTCTCG CCATGATCGT GAAGCACAAA AGTATACCGG TTGATATGT CATATTTTTT AGAGAGGTCG AATATCTTGG CAAGCTGTAG TCGAGTATTA
  STCCAACAGC GSTACTAGCA CTTCGTGTTT TCATATGGGC AACTATTACA GTATAAABA TCTCTCCAGC TTATAGAACC GTTCGACATC AGTCATAAT
3001  ATAAC TAGAC TTTTCTCCA AGAGAAAGT GATATCTTAT TAAATGAAGC AAGAACACA GGATCAATAT GTTGATACTT ATTTTCTTTA TAGAGATTCA
  TATTTGATCTG AAAAGAGGGT TCTCTTCCA CTATAGAATA ATTACTTTCG TTCTTGTGT CCTAGTTATA CAACTATGAA TAAAAGAAAT ATCTCTAAGT
7001  CCCATTCATC AGGATAGCTG GAAATGATGA TCATTTGAGA AGGGTCTTTC TTATTGAGAA CCATAAATGA GAAATTTTAC CCCTGCTAGT GATCCAGGTT
  GGSTAAAGTAC TCCTATCGAC CTTTACTACT AGTAAACTCT TCCCAAGAAG AATAACTCTT GGTATTTACT CTTAAAATGC GGCACATCA CTAGGTCCAA
1301  TTTATTGAAG TGCTCTTTTA TTACCCTCT TATTATTCA CTGTTGGTGA AATATGCGA CAT
  AAATAACTTC ACGAGAAACT AATGGGACGA ATAATAAAGT GACAACCACT TATTACCCTG GTA *
  
```

B

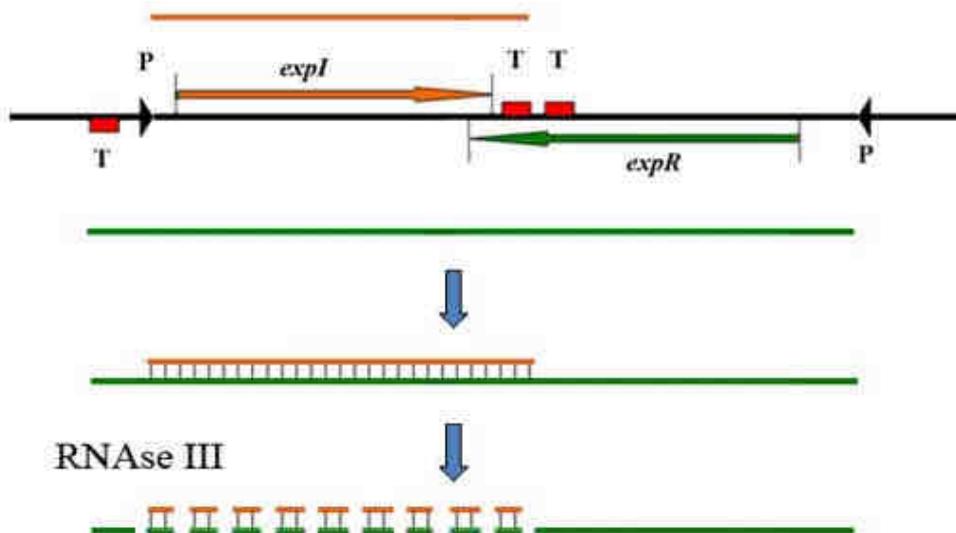


Рисунок 14. А – Структура кодирующей области генов *expI-expR*. ОРС гена *expR* (зеленый фон) и *expI* (желтый фон) частично перекрываются (сине-зеленый шрифт, курсив). Первые кодоны обозначены звездочками. Сигналы терминции транскрипции могут быть выявлены только в случае транскрипции с промотора гена *expI* (красный шрифт). Б – Предполагаемый механизм посттранскрипционной репрессии гена *expI* в результате деградации мРНК нуклеазами, специфичными к дунитевым молекулам РНК.

В соответствии с разработанным нами методом была определена транскрипционная активность прямой (смысловой) и обратной

(антисмысловой) цепей в 5'-концевых областях генов *expI* и *expR*. Предполагается, что прямые цепи генов считываются с собственных промоторов, в то время как обратные транскрипты образуются в результате активности промоторов противоположных генов и являются частью их протяженных 3'-нетранслируемых областей (3' UTR) (рис. 15). Для процессов, связанных с взаимодействием комплементарных РНК (РНК-интерференции) важное значение имеет соотношение двух цепей, способных к образованию гетеродуплексов. В связи с этим, результаты анализа были представлены как процентное отношение количества антисмысловых цепей (асРНК) к количеству мРНК.

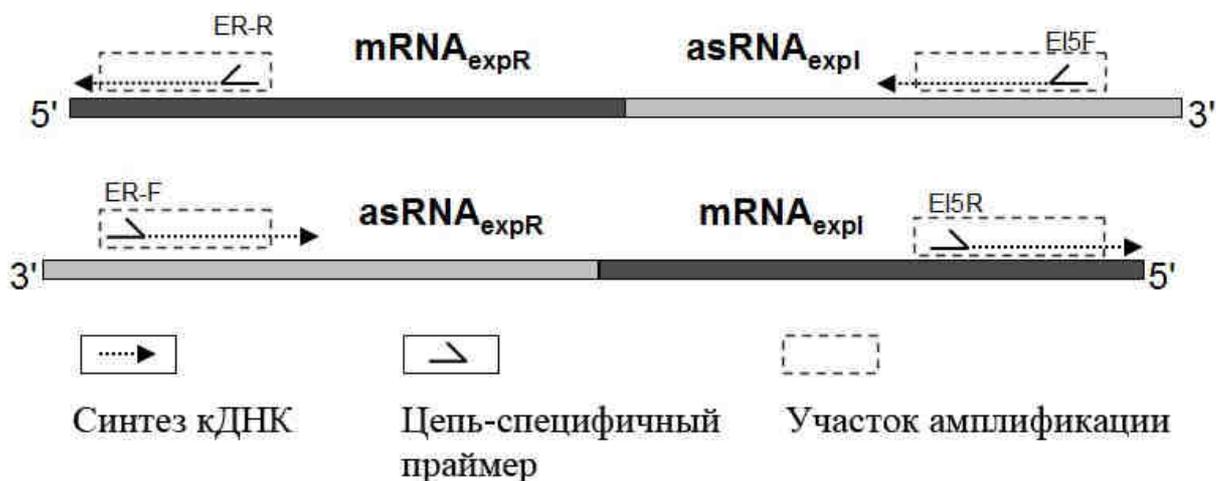


Рисунок 15. Схема эксперимента по определению транскрипционной активности прямых и обратных цепей генов *expI* и *expR*.

Было показано, что в растущей культуре *Pba* высокое относительное количество асРНК коррелирует с низкой транскрипционной активностью генов. Максимальный уровень мРНК генов *expI* и *expR* в клетках бактерий наблюдался через 24 часа выращивания (рис. 16), что соответствует минимальному относительному количеству антисмысловых транскриптов (рис. 16). Переход культуры на стационарную фазу роста через 48 часов сопровождался увеличением соотношения асРНК/мРНК и снижением транскрипционной активности гена *exp I*. В опытах по определению

динамики концентрации АГЛ было продемонстрировано, что в это время происходит прекращение его синтеза.

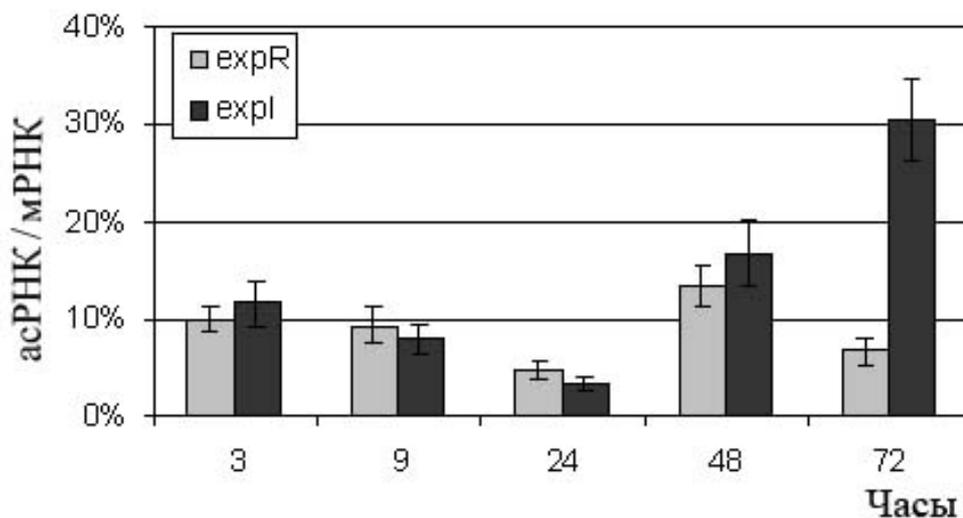


Рисунок 16. Динамика соотношения антисмысловых транскриптов к мРНК генов *expI* и *expR* в клетках растущей культуры *Pba*.

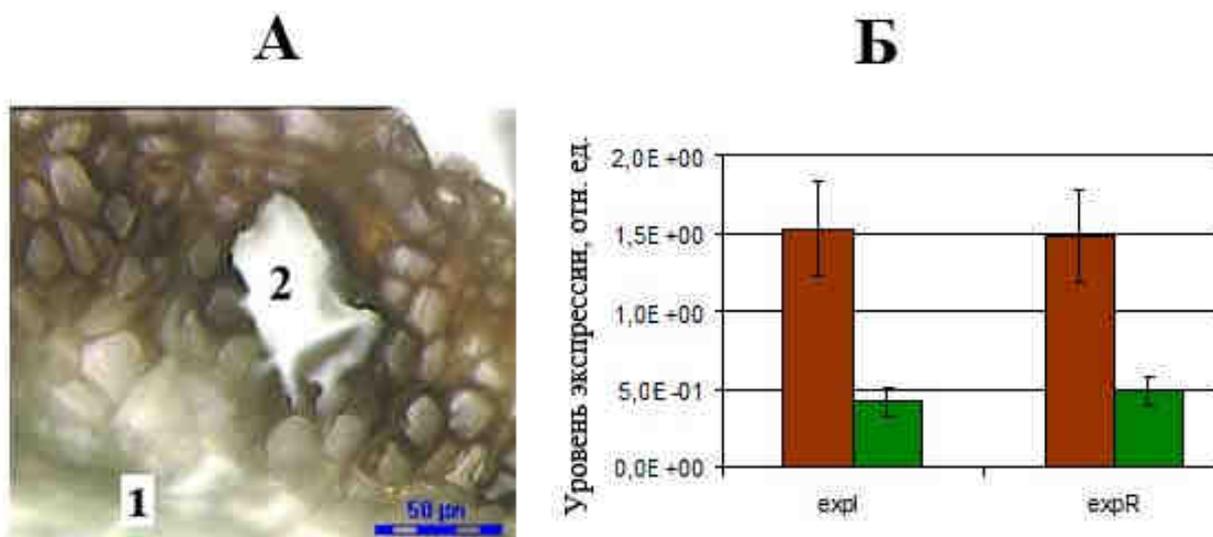


Рисунок 17. А – Полутонкий срез листа табака, подвергнутый микродиссекции; 1 – сосуды ксилемы, 2 – вырезанная область паренхимы. Б – уровень экспрессии генов белков системы «кворум сенсинга» (*expI*, *expR*) в клетках бактерий, колонизирующих ксилему (левые столбики) и паренхиму (правые столбики).

Представленные результаты модельных экспериментов были подтверждены в опытах *in planta*. С помощью лазерной микродиссекции

нами были получены образцы растительных сосудов и тканей паренхимы, инфицированных *Pba* (рис. 17А). Из образцов была выделена РНК и получена кДНК в реакции обратной транскрипции. Препараты были подвергнуты количественному анализу ПЦР в реальном времени. В результате было установлено, что гены кворум-сенсинга и контролируемые факторы вирулентности активированы в большей степени при заселении бактериями ксилемных сосудов. Переход бактерий в паренхиму связан с репрессией генов данной сигнальной системы (рис. 17).

Таким образом, использование микродиссекторных образцов позволило выявить дифференциальную экспрессию генов, контролирующих вирулентность бактерий в зависимости от локализации микроорганизмов *in planta*. С одной стороны, это раскрывает последовательную закономерную активацию и репрессию генов сигнальной системы кворум-сенсинга бактерий в ходе их жизненного цикла, с другой стороны, подтверждает участие в этом процессе метаболитов растения-хозяина.

2.1.4. Исследование пространственной структуры низкомолекулярных PR-белков и комплексов этих белков с медиаторами сигнальных систем с применением метода ЯМР высокого разрешения и других взаимодополняющих физических методов

Современная спектроскопия ЯМР широко используется для решения широкого круга задач как в органической химии по идентификации структуры относительно небольших органических молекул, так и в молекулярной биологии при расшифровке пространственной структуры биополимеров – белки, пептиды, фрагменты ДНК и РНК. На сегодняшний день накоплен большой инструментарий различных импульсных последовательностей для решения подобных структурных задач. И становится возможным выбирать необходимые экспериментальные методы индивидуально под исследуемое соединение или класс соединений, которые

можно объединить друг с другом по какому либо признаку. В нашем случае объектом исследования является белок с естественным содержанием изотопов по ядрам ^{13}C и ^{15}N , с молекулярной массой 5.4 кДа.

Все спектры ЯМР регистрировали на спектрометре Bruker Avance III с рабочей частотой 600 МГц на ядрах ^1H используя 5-мм инверсный трех-ядерный датчик $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$, оснащенный градиентной катушкой. В качестве стандарта калибровки спектра ЯМР использовали TSP. При записи одномерных спектров ^1H - ЯМР использовали релаксационную задержку для восстановления намагниченности перед импульсной последовательностью d1 2с. Число накоплений для различных экспериментов варьировалось от 32 до 128. Длительность 90-градусного импульса составляла 9.18 мкс. Для записи спектров DOSY использовали стандартную импульсную последовательность «стимулированное эхо» с биполярными градиентами. Время диффузии для каждого эксперимента составило 50 мс, а длительность градиентного импульса 2.5 мс. Величина градиента магнитного поля изменялась в интервале от 0.025 до 0.5 Тл/м. Задержка d1 была 5с. Количество точек на диффузионных спадах 32. Для обработки всех спектров применялась программа Topspin 2.1. Измерения выполнены при температурах растворов 25°C, 40°C и 50°C. В качестве внутреннего стандарта в спектрах ^1H ЯМР использовался TSP (3-триметилсилилпропионовая-2,2,3,3- d_4 -кислота, натриевая соль), сигналы которого принимались за начало отсчета равными 0 м.д. Для записи спектров NOESY использовалась стандартная последовательность poesyesgpph с подавлением сигналов протонов воды из библиотеки импульсных последовательностей входящих в комплектацию спектрометра. Дефензин растворялся в водном (соотношение $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$, 90% к 10%) буферном растворе NaPhas 20 mM, pH 7.0, NaN_3 0.3%. Концентрация белка составила 0.33 mM.

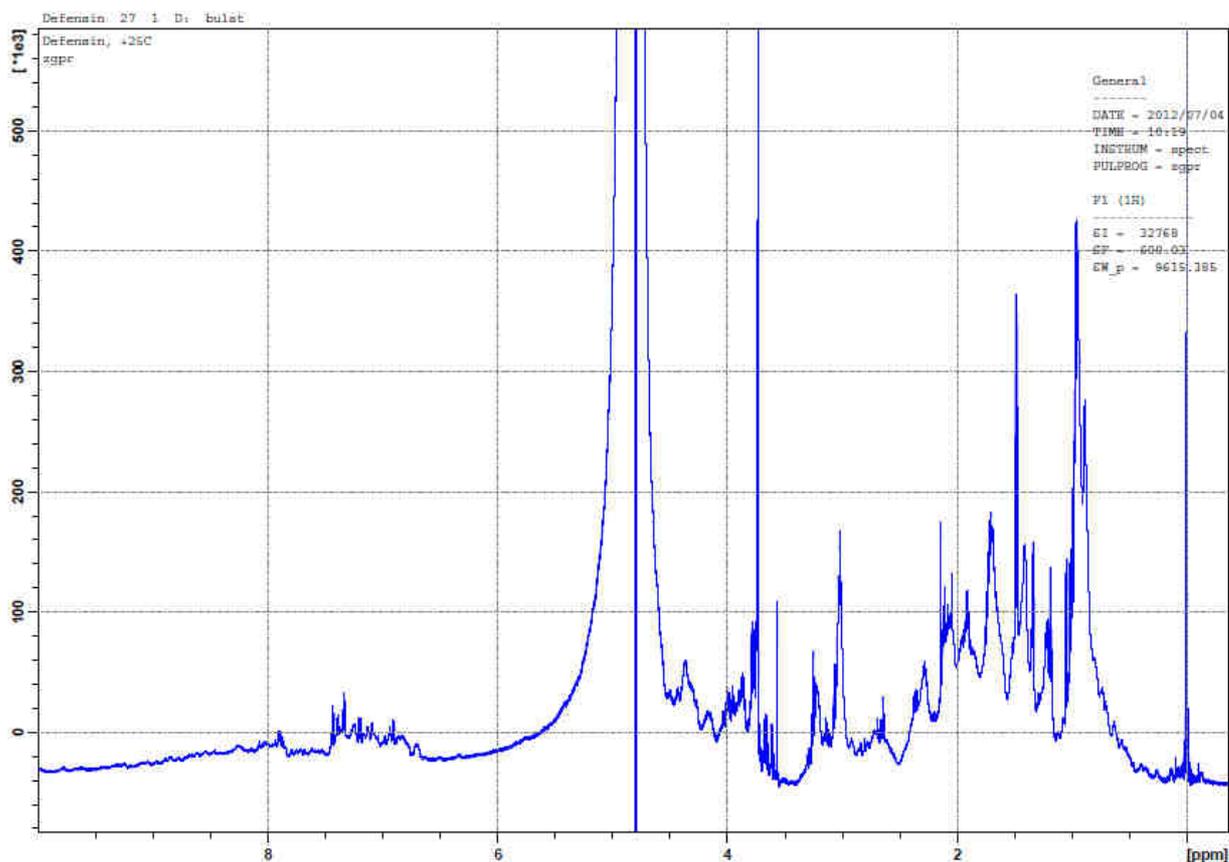


Рисунок 18. Спектр ^1H ЯМР дефензина в NaP 20 mM буферном растворе со значением pH 7.0, при температуре 25 С.

На одномерном спектре ЯМР ^1H , представленном на Рисунок 18, наблюдается типичная картина, характерная для ЯМР в белках. В высокопольной области спектра, в диапазоне примерно от 4.5 м.д. до 0.5 м.д., видны сигналы от алифатических протонов боковых цепей, а в низкопольной области, в диапазоне 6.4 – 10 м.д., резонируют амидные протоны основной цепи и ароматические протоны боковых цепей. Так же необходимо отметить, что в целом сигналы в протонном спектре существенно уширены. Что может наблюдаться в случае наличия химического обмена, или для белков с достаточно большой молекулярной массой. Записанный спектр NOESY при температуре 25 С, с временем смешивания 120 мс. (см. рис. 19), показал наличие относительно небольшого числа кросс-пигов образованных за счет ЯЭО. Для нашего белка ожидался более насыщенный спектр NOESY с более

узкими и интенсивными кросс-пиками. Сигналы наблюдаемых кросс-пиков так же уширены.

Как известно, молекулярная масса дефензина составляет 5.4 кДа. Соответственно, для изучаемого белка, причиной уширения спектральных линий может быть наличие химического обмена. В нашем случае можно предположить два механизма. Первый, часть белка образует хорошо свернутый домен, а часть - расплавленную глобулу. Вторым механизмом – наблюдается олигомеризация белка. Из литературных данных известно, что белки семейства дефензинов способны к олигомеризации.

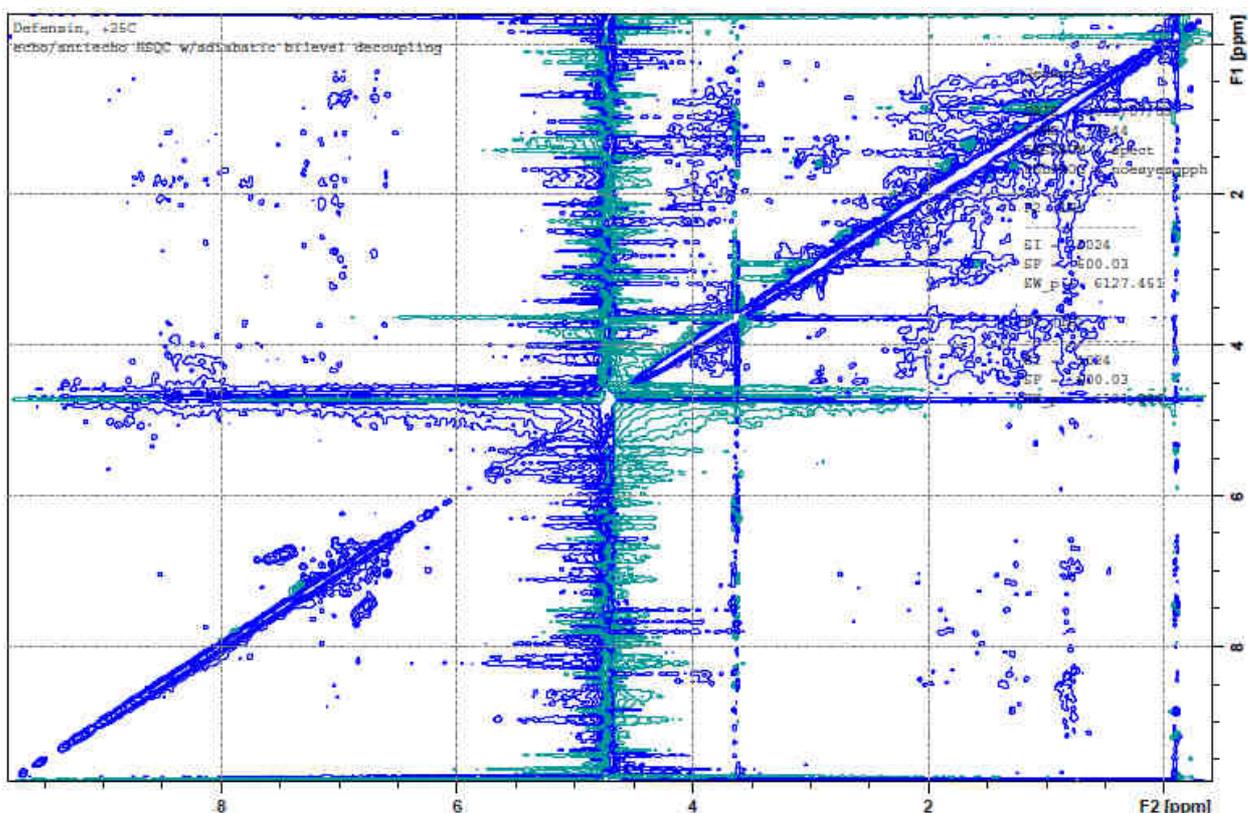


Рисунок 19. Двумерный спектр NOESY со значение времени смешивания t_{mix} 0.12с, в NaP 20 mM буфере, pH 7.0, T 25 C.

Для получения представления о подвижности белка как целого был записан диффузионный спектр DOSY при температуре раствора 25°C. Анализируя этот спектр, из диффузионных кривых затухания спектральных сигналов можно получить представления о размерах белка. Диффузионные затухания

представлены на рисунках: для области 0.57-0.93 м.д. на рис. 20, для области 1.48-1.68 м.д. на рис. 21. Наилучшее согласие экспериментальных значений с теоретическими получилось при аппроксимации двухкомпонентной функцией со значениями коэффициентов самодиффузии $5.2 \cdot 10^{-10}$ м²/с и $4.7 \cdot 10^{-10}$ м²/с для быстрой компоненты и $1.6 \cdot 10^{-10}$ м²/с и $1.5 \cdot 10^{-10}$ м²/с для медленной компоненты (для областей 0.57-0.93 м.д. и для 1.48-1.68 м.д. соответственно). Расчет диаметров белка из уравнения Стокса-Энштейна дают значения 11 Å и 31 Å. Откуда можно предположить, что в растворе белок олигомеризуется. Таким образом, скорее всего в нашей системе реализуется второй вариант.

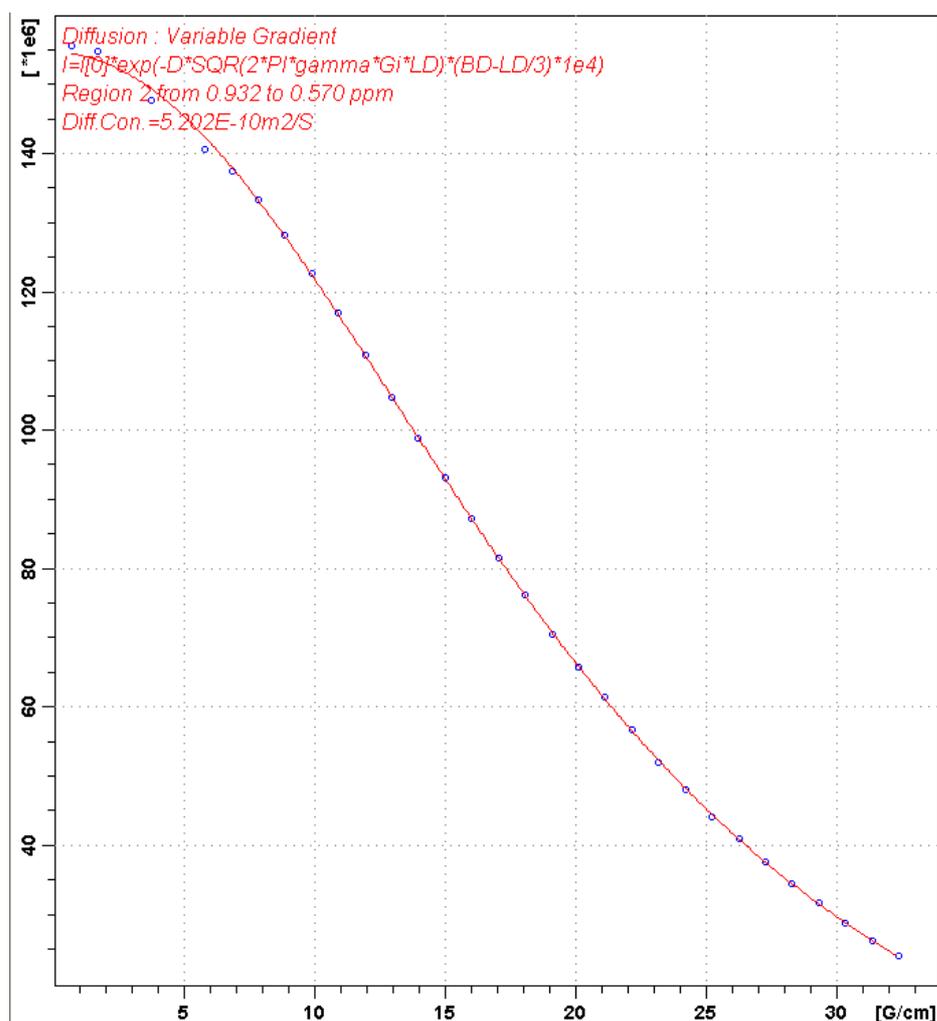


Рисунок 20. Диффузионное затухание полученное из спектра DOSY при температуре образца 25°C для спектральной области 0.57-0.93 м.д.

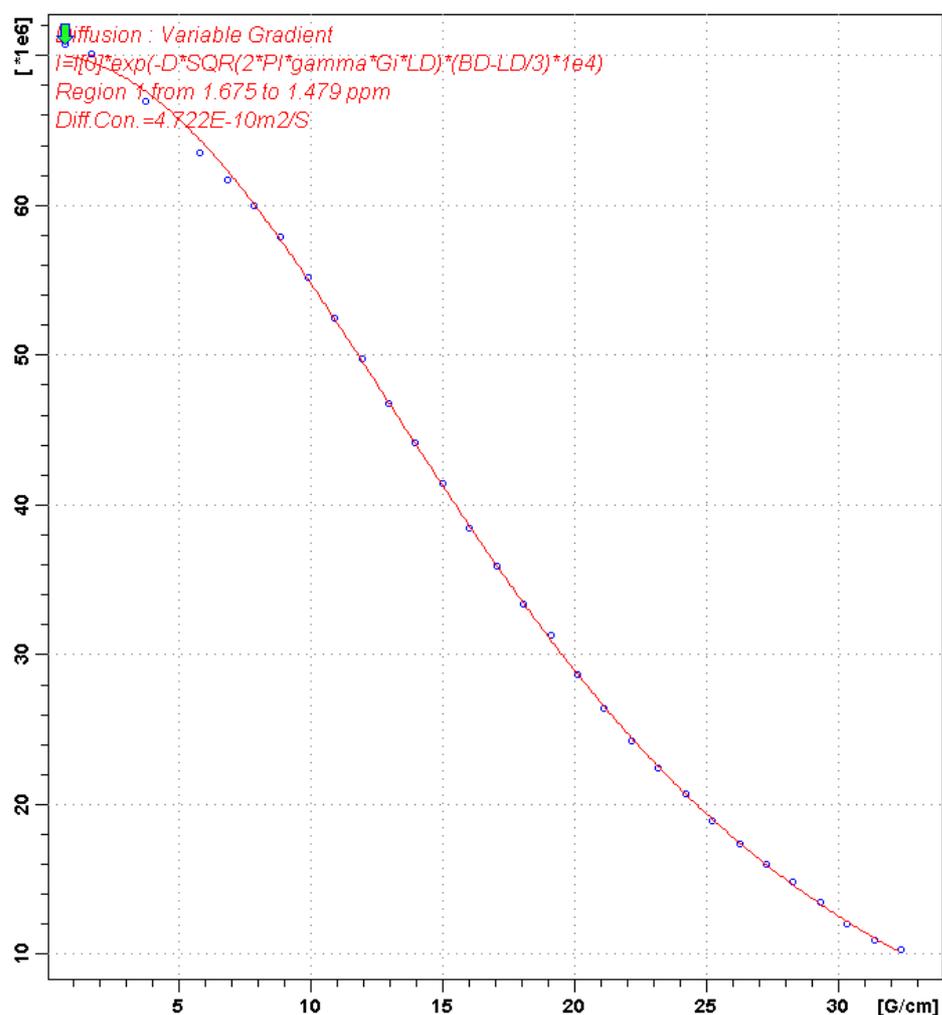


Рисунок 21. Диффузионное затухание полученное из спектра DOSY при температуре образца 25°C для спектральной области 1.48-1.68 м.д.

Для смещения равновесия в сторону преобладания мономеров белка дефензина нагрели образец. На рис. 22 представлены спектры ЯМР ^1H слабopольной области спектра характерной для амидных и ароматических протонов, записанные для различных температур. Видно, что с повышением температуры спектр изменяется, хотя и незначительно, но спектральные линии сужаются. Спектр NOESY, записанный при температуре 50°C, приведен на рис. 23. На нем видно, что число наблюдаемых кросс-пиков ЯЭО стало больше, по сравнению со спектром NOESY при температуре 25°C. Но,

тем не менее, спектральные линии по-прежнему существенно уширены с плохим отношением сигнал-шум.

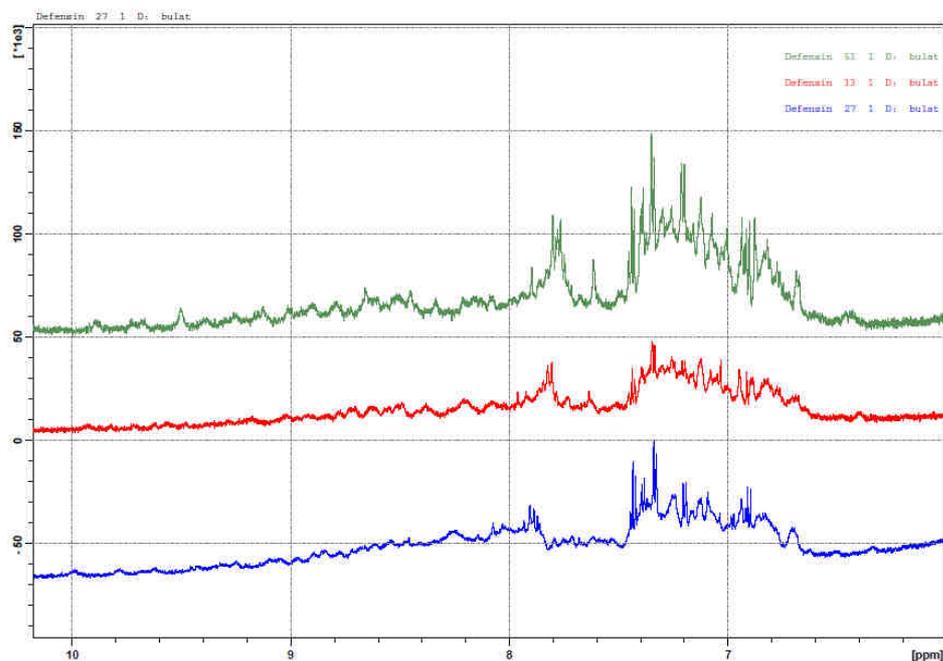


Рисунок 22. Спектры ЯМР ¹H дефензина в NaP 20 mM, pH 7.0, при температуре раствора: нижний спектр 25°C, средний 40°C, верхний 50°C.

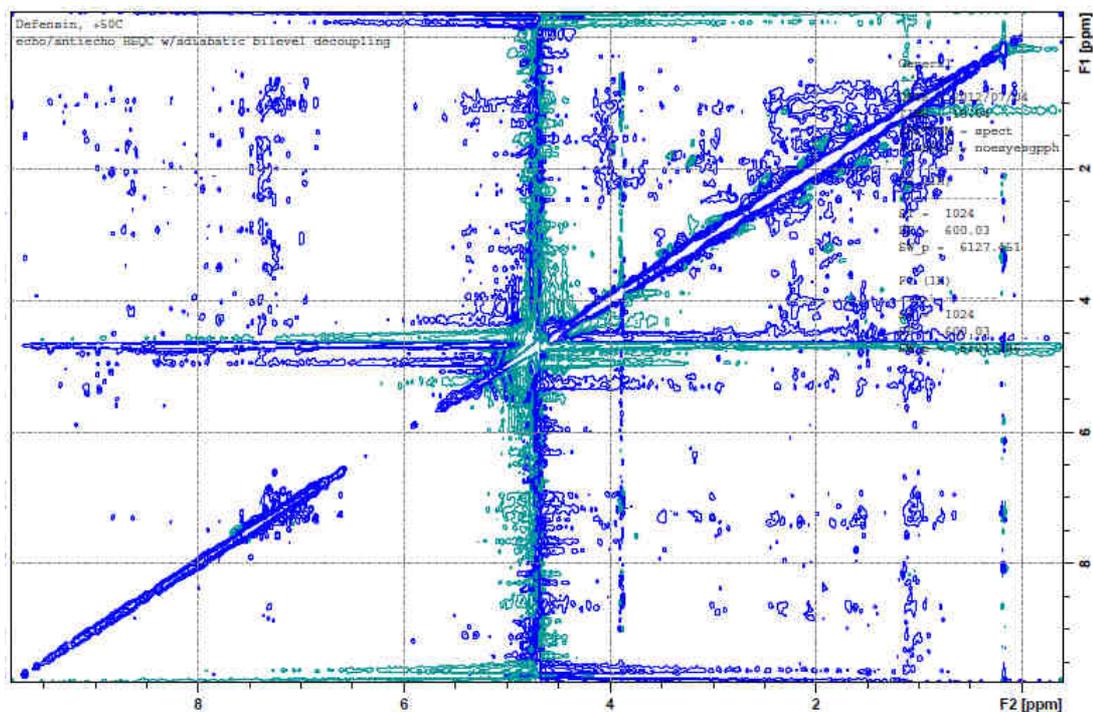


Рисунок 23. Спектр ЯМР NOESY в NaP 20 mM, pH 7.0, значение времени смешивания t_{mix} 0.3 с, температура 50°C.

Для предотвращения агрегации белка дефензина было решено уменьшить pH буферного раствора с целью повышения поверхностного заряда белка. Следующий образец дефензина был приготовлен в водном (соотношение H₂O/D₂O, 90% к 10%) буферном растворе NaPhos 20mM со значением pH 5.6 и содержанием NaN₃ 0.3%. Одномерные спектры ЯМР ¹H дефензина представлены на рис. 24, на котором отображены слабополюные части спектра. Хорошо видно, что спектры заметно менее уширены, нежели для образца дефензина растворенного в буферном растворе с pH 7.0 (см. рис. 22). Так же можно заметить некоторое изменение спектров при изменении концентрации в диапазоне от 8.2 м.д. до 8.6 м.д. Записанный двумерный спектр TOCSY показал наличие кросс-пииков характерных для белков и пептидов (см. рис. 25). Например, это кросс-пики образованные от амидных протонов основной цепи с протонами N α , N β и N γ боковой цепи одной аминокислоты.

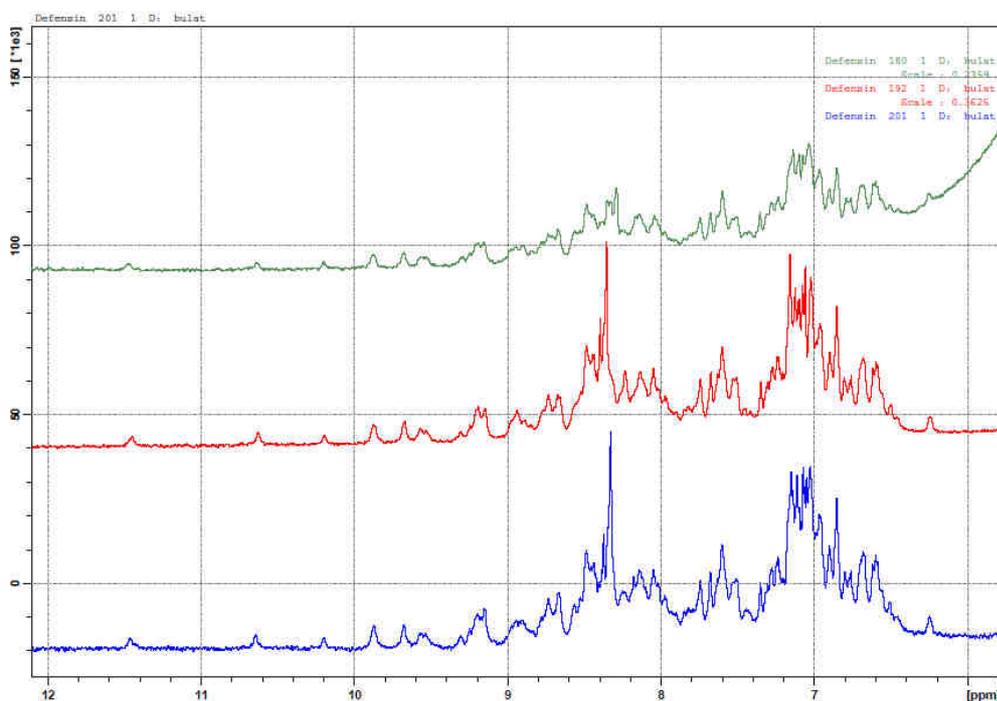


Рисунок 24. Спектры ЯМР ¹H дефензина в 20 mM NaP, pH 5.6, при различных концентрациях: верхний спектр 0.04 mM, средний - 0.1 mM, нижний - 0.18 mM. Для отображения спектров использовался различный

коэффициент усиление по амплитуде. Температура записи для всех спектров 25°C.

Дальнейшее увеличение концентрации дефензина до 0.4 mM позволило получить спектр NOESY с временем смешивания t_{mix} 0.3 с, который представлен на рис. 26. Этот спектр также соответствует спектрам NOESY получаемых для белков. И демонстрирует, что удалось выделить белок и подобрать среду, в которой он стабилен длительное время и не преципитирует. Таким образом, показано, что уменьшение значения pH буферного раствора позволило стабилизировать мономерную форму дефензина.

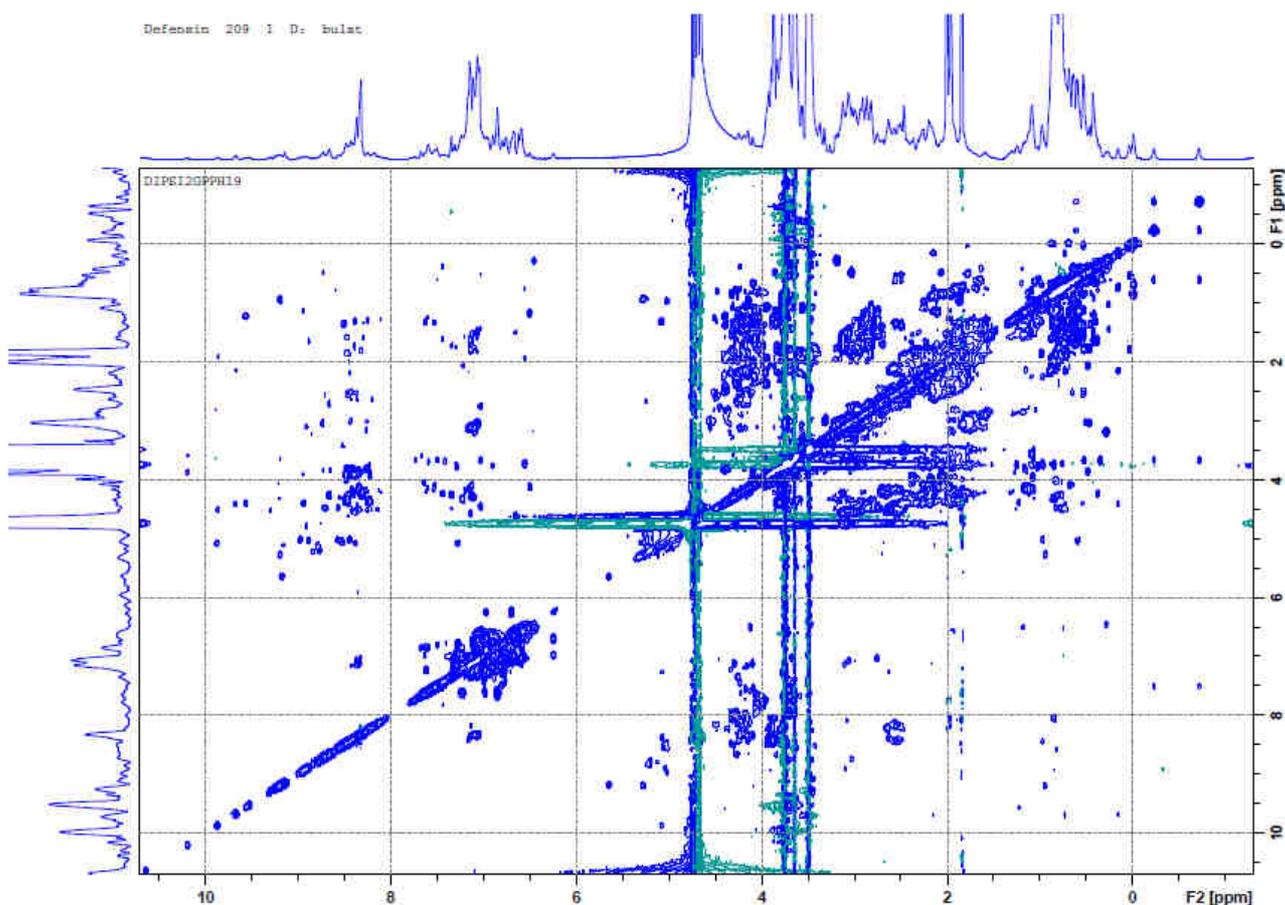


Рисунок 25. Двумерный спектр ЯМР TOCSY дефензина 0.18 mM в NaP 20 mM, pH 5.6. Наблюдаются кросс-пики, характерные для белков. Температура записи 25°C.

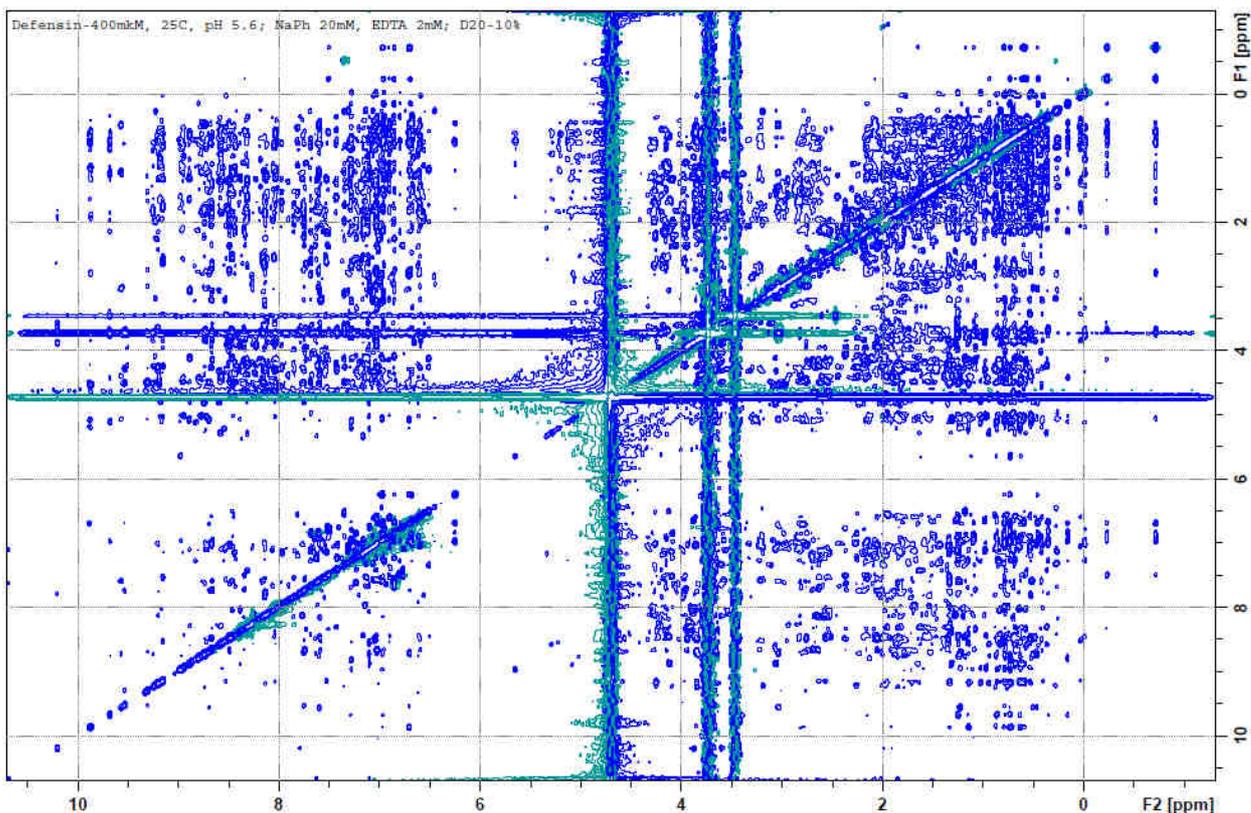


Рисунок 26. Спектр ЯМР NOESY дефензина 0.4 mM в NaP 20 mM, pH 5.6, значение времени смешивания t_{mix} 0.3 с, температура 25°C.

Таким образом, из данных ЯМР следует:

1. Записанные спектры ЯМР подтверждают, что полученный образец – белок.
2. Исследуемый белок в натрий-фосфатном буфере с pH 7.0 олигомеризуется и выпадает в осадок.
3. Увеличение температуры раствора до 50°C не привело к существенному увеличению растворимости.
4. Уменьшение значения pH буфера до 5.6 pH благоприятно сказалось на растворимости белка. Удалось получить стабильный раствор белка дефензима с концентрацией 0.5 mM в NaP 20 mM со значением pH 5.6.

Невысокая растворимость белка и, соответственно, его низкая концентрация в растворе была причиной невозможности проведения структурных исследований методом ИК-спектроскопии.

2.1.5. Компьютерное моделирование взаимодействия низкомолекулярных PR-белков с целевыми лигандами

Понимание механизма взаимодействия биомолекул с лигандами является одной из основных задач современной биофизики. В настоящее время для решения этой задачи широко применяются методы компьютерного моделирования. Метод Молекулярной динамики дает возможность строгого расчета энергии межмолекулярного взаимодействия, однако, этот метод слишком медленный для поиска наиболее энергетически выгодной конфигурации комплекса. С целью получения более быстрого способа моделирования различного типа комплексов в последнее время активно развивается метод, который получил название молекулярного докинга.

Метод молекулярного докинга применяется для разработки лекарств, специфически связывающихся с тем или иным белком, при виртуальном высокопроизводительном скрининге, при белок-белковом докинге, а так же для изучения химических механизмов взаимодействия, для определения геометрии лиганд-рецепторных комплексов, данных о строении лиганд-связывающего центра, поэтому этот метод в настоящее время очень актуален. В данном проекте метод молекулярного докинга был применен для исследования взаимодействия ряда растительных дефензинов с фосфолипидной мембраной.

Дефензины — катионные пептиды иммунной системы, активные в отношении бактерий, грибов и многих оболочечных и безоболочечных вирусов. Для молекул дефензинов характерно высокое содержание положительно заряженных аминокислот (аргинина, лизина, гистидина), что придает их молекуле положительный заряд. Гидрофильные и гидрофобные

участки молекулы дефензина четко отделены друг от друга. Это свойство облегчает связывание и встраивание их в фосфолипидный бислой микроорганизмов.

Растительные дефензины подавляют рост до 20 видов грибов и бактериальных патогенов. Существуют дефензины, обладающие инсектицидной и фунгицидной активностью. Дефензины растений могут экспрессироваться в ответ на абиотический стресс: засуху, засоление и пониженные температуры. Принципиальное отличие растительных дефензинов от других антимикробных белков растений заключается в нетоксичности для клеток млекопитающих и растений. Растительные дефензины накапливаются преимущественно в периферических клеточных слоях, семядолях, гипокотилеях, цветковых структурах. Относительно недавно выяснилось, что дефензины способны подавлять не только рост грибных и бактериальных патогенов, но и развитие насекомых. Дефензины часто называют природным антибиотиком. Несмотря на широкое распространение дефензинов и их активную роль в биологических процессах, механизм их взаимодействия с мембранами остается неизученным.

Таблица 3. Характеристики исследуемых дефензинов

лиганд	Код PDB файла	Тип (источник)	Общий заряд
D1	1JKZ.PDB	Чеснок	3
D2	2KSK.PDB	сахарный тростник	6
D3	1TI5.PDB	Фасоль	6
D4	3PSM.PDB	ямс, сладкий картофель	1
D5	1N4N.PDB	цветочный	6
D6		Сосна	6

В данной работе исследовались 6 дефензинов растительного происхождения, которые различаются между собой источником (происхождением), зарядом (от +1 до +6), распределением заряженных остатков по поверхности белка (табл. 3, рис. 27). Аминокислотные последовательности исследуемых дефензинов характеризуются слабой гомологией, однако вторичная структура и третичная структуры сохраняются.

Структура дефензина D6 была получена на основе структуры дефензина D1 (код в Protein Data Bank 1JKZ.pdb (Bernstein, 1977)) путем мутации аминокислотных остатков согласно первичной последовательности, опубликованной в (Thevissen, 2003) и оптимизирована с помощью программы HyperChem и силовых полей типа CHARMM. Все исследуемые дефензины имеют положительный заряд, от +1 до +6.

Анализ гомологичности исследуемых дефензинов (рис. 28) показывает очень слабую степень гомологии. Дополнительно к наличию CYS аминокислотных остатков, все дефензины характеризуются наличием GLY аминокислотного остатка в позиции 12, который находится на петле соединяющей бета-стренд и альфа спираль.

Фосфолипидные мембраны были построены с помощью программы VMD (Humphrey, 1996) из 60 молекул фосфолипидов, образующих бислоя. Гидрофобные хвосты холинов направлены в глубину бислоя, полярные головки направлены наружу. Общий заряд каждой молекулы фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина был равен нулю. Полярные головные группы фосфолипидов были экранированы молекулами воды, примерно по 500 молекул воды с каждой стороны бислоя. Были построены два типа мембран, одна содержала молекулы фосфатидилхолина (M1), другая – фосфатидилэтаноламина (M2).

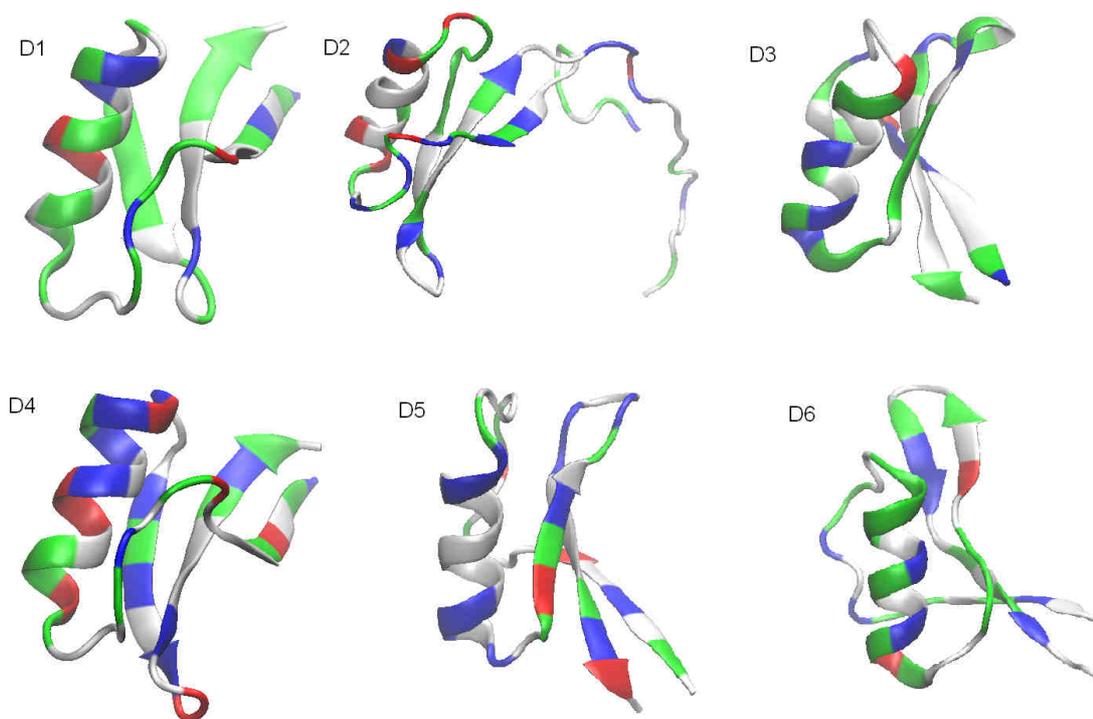


Рисунок 27. Вторичная структура и распределение заряженных остатков по поверхности дефензинов. Синим цветом показаны положительно заряженные остатки, красным – отрицательно заряженные, зеленым – полярные остатки, белым – гидрофобные.

D1 ----KTCKXLADTYRGVCFITNASCDDXCCKNKAX-LISGTCX--N---W-
 KCFCTQNC-
 D2 --HTPTPTPICKSRSHEYKGRCIQDMDCNAA CVKESES YTGGF CN-
 GRPPFK-QCFCTKPKCKRERAAATLRWPGL
 D3 ----RTCMIKKEGW-GKCLIDTTCAHSCCKN-RG-YIGGNCK-GM-T-R-
 TCYCLVNC-
 D4 -----KTCENLADTFRGP CFTDGS CDDHCCKNKEH-LIKGR CR-DD---F-
 RCWC TRNC-
 D5 -----ATCKAECPTWDSVCINKKPCVACCCKK-AK-FSDGHCS-KI-L-R-
 RCLCTKEC-
 D6 -----RMCKTPSGKFKGYCVNNTNCKNVCRTEGF-PTGS-CDFXV-A-
 GRKCYCYKPCP

Рисунок 28. Сравнение аминокислотной последовательности дефензинов. Желтым показаны одинаковые аминокислотные остатки.

Для исследования взаимодействия лигандов с макромолекулами была использована программа AutoDock4.2. (Morris, 2009). Она позволяет проводить молекулярный докинг с целью определения наиболее энергетически выгодных комплексов белок – лиганд в результате поиска

локального минимума энергии взаимодействия между лигандом и белком, проводить поиск глобального минимума энергии взаимодействия между лигандом и белком, если положение лиганд связывающего центра не определено экспериментально, и проводить статистический анализ полученных решений. AutoDock состоит из двух главных программ: AutoDock и AutoGrid. AutoDock выполняет докинг лигандов к белку. Для того чтобы ускорить расчеты энергии взаимодействия лиганда с макромолекулой AutoDock использует трехмерную пространственную решетку, которая строится с помощью программы AutoGrid .

Разработан графический пользовательский интерфейс, который называется AutoDockTools, который позволяет подготавливать исходные структуры молекулы, распределяет заряды по аминокислотным остаткам, запускает расчетные программы AutoDock и AutoGrid, а также позволяет анализировать полученные результаты.

Для того чтобы ускорить расчеты энергии взаимодействия лиганда с макромолекулой, AutoDock использует трехмерную пространственную решетку, которая строится с помощью программы AutoGrid. Центр решетки может быть установлен в любой точке макромолекулы. В качестве макромолекулы могут быть выбраны белок, ДНК, РНК, полимер или ионный кристалл. Размер шага решетки может варьироваться в диапазоне от 0.2 до 1 Å. По умолчанию размер шага устанавливается равным одной четвертой длины связи C-C и равен 0.375Å. Каждой точке пространственной решетки назначается потенциал равный энергии взаимодействия тестового или пробного атома с атомами макромолекулы. Таких решеток строится несколько для каждого типа взаимодействия (электростатического, сольватационного и Ван-дер-Ваальсового). Для того чтобы описать Ван-дер-Ваальсовое взаимодействие строятся решетки для каждого типа атома лиганда. Такое предварительное создание решетки потенциалов позволяет значительно ускорить процесс расчета.

Расчет полной энергии взаимодействия осуществляется с учетом электростатических, Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий, водородных связей, эффекта сольватации и торсионной энтропии.

$$\Delta G = \Delta G_{vdw} + \Delta G_{hbond} + \Delta G_{elec} + \Delta G_{tor} + \Delta G_{sol},$$

где ΔG_{vdw} - энергия Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий, ΔG_{hbond} - энергия водородных связей, ΔG_{elec} - электростатическое взаимодействие, ΔG_{sol} - энергия сольватации, ΔG_{tor} - вклад, оценивающий торсионную энтропию. Докинг выполняется с использованием генетического алгоритма Lamarckian (LGA). Этот алгоритм начинает работу со случайного расположения популяции молекул лиганда в некоторых случайных точках пространства на построенной решетке. Конформация лиганда также выбирается случайной. С использованием алгоритма Монте-Карло производятся изменения в ориентации, положении и конформации лиганда и производится расчет энергии белок – лигандного взаимодействия. Если энергия взаимодействия в новой точке пространства более отрицательна, чем энергия в предыдущей точке, то новая конформация принимается как более выгодная. После многократного повторения процедуры в результате одного расчета определяется одна структура комплекса белок - лиганд, которая определяется программой как наиболее энергетически выгодный комплекс. Для того чтобы провести статистический анализ полученных результатов поиск производят несколько раз, максимально возможно количество расчетов при одном запуске программы равно 256.

Предварительное исследование образования комплексов дефензинов с монофосфолипидами показало, что дефензины образуют устойчивые, энергетически выгодные комплексы со всеми видами фосфолипидов, движущей силой которых является Ван-дер-Ваальсовое взаимодействие и сольватационный эффект. Однако специфичности связывания различных фосфолипидов обнаружено не было. В данной работе исследуется

взаимодействие дефензинов растительного происхождения с фосфолипидной мембраной. В результате докинга были получены структуры нескольких типов комплексов для 6 различных дефензинов с двумя типами мембран, первая мембрана состояла из молекул фосфатидилхолина (M1), вторая – из молекул фосфатидилэтаноламина (M2). Были проанализированы структуры всех полученных комплексов, наряду с информацией об энергиях взаимодействия и кластеризации. Один из полученных комплексов в качестве примера показан на рис. 29.

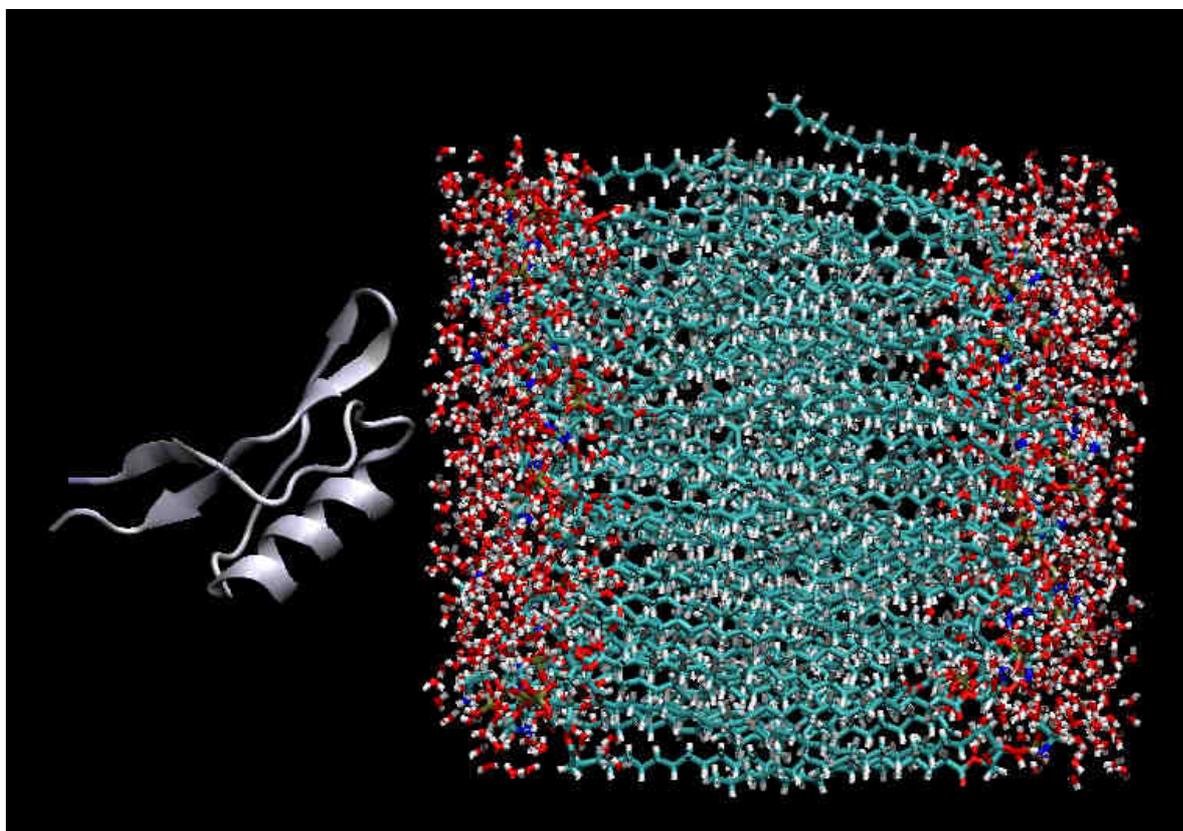


Рисунок 29. Комплекс D1 с поверхностью мембраны фосфатидилхолина.

Анализ полученных результатов проводился по следующим характеристикам: средняя энергия взаимодействия белка с бислоем, максимальная энергия взаимодействия, константа диссоциации комплекса и вероятность образования комплекса. В табл. 4 представлены средняя энергия, максимальная энергия взаимодействия и константа диссоциации комплекса для 6 различных дефензинов с бислоем фосфатидилхолина. Все исследуемые

дефензины образуют стабильные комплексы с поверхностью мембраны. Все полученные комплексы выстраивают согласно их энергии взаимодействия, и сравнительный анализ полученных результатов позволяет определить несколько лучших решений, то есть структуры комплексов с максимальной энергией взаимодействия. Анализ табл. 4 показывает, что дефензин D3 образует наиболее устойчивые комплексы с бислоем фосфатидилхолина, а наименее устойчивые – дефензин D4.

Таблица 4. Средняя энергия и максимальная энергия взаимодействия, константа диссоциации комплексов образованных дефензином и бислоем фосфатидилхолина.

Дефензин	Средняя энергия взаимодействия (ккал/моль)	Максимальная энергия взаимодействия (ккал/моль)	Константа диссоциации (mM)
D1	-1.5	-1.81	47.15
D2	-1.7	-1.94	37.97
D3	-2.0	-2.46	15.71
D4	-1.12	-1.14	146.38
D5	-1.8	-2.36	18.57
D6	-1.37	-1.86	42.98

Кластерный анализ характеризует устойчивость полученных решений, то есть насколько близки друг к другу полученные структуры комплексов. Если среднеквадратичное отклонение (RMSD) одной полученной структуры от другой структуры не превышает 2Å , то считается, что комплексы образуют кластер. Чем больше комплексов образуют один кластер, тем более устойчивым является найденной решение, тем больше вероятность образовать данный тип комплекса.

Все полученные комплексы характеризуются высокой степенью кластерности. В качестве примера на рис. 30 показан результат анализа устойчивости полученных решений для дефензина D2 с бислоем фосфатидилхолина. Общее количество полученных комплексов было равно 256. Все полученные структуры образуют два больших кластера с энергиями взаимодействия -1.9 и 1.5 ккал/моль, и три кластера меньших размеров.

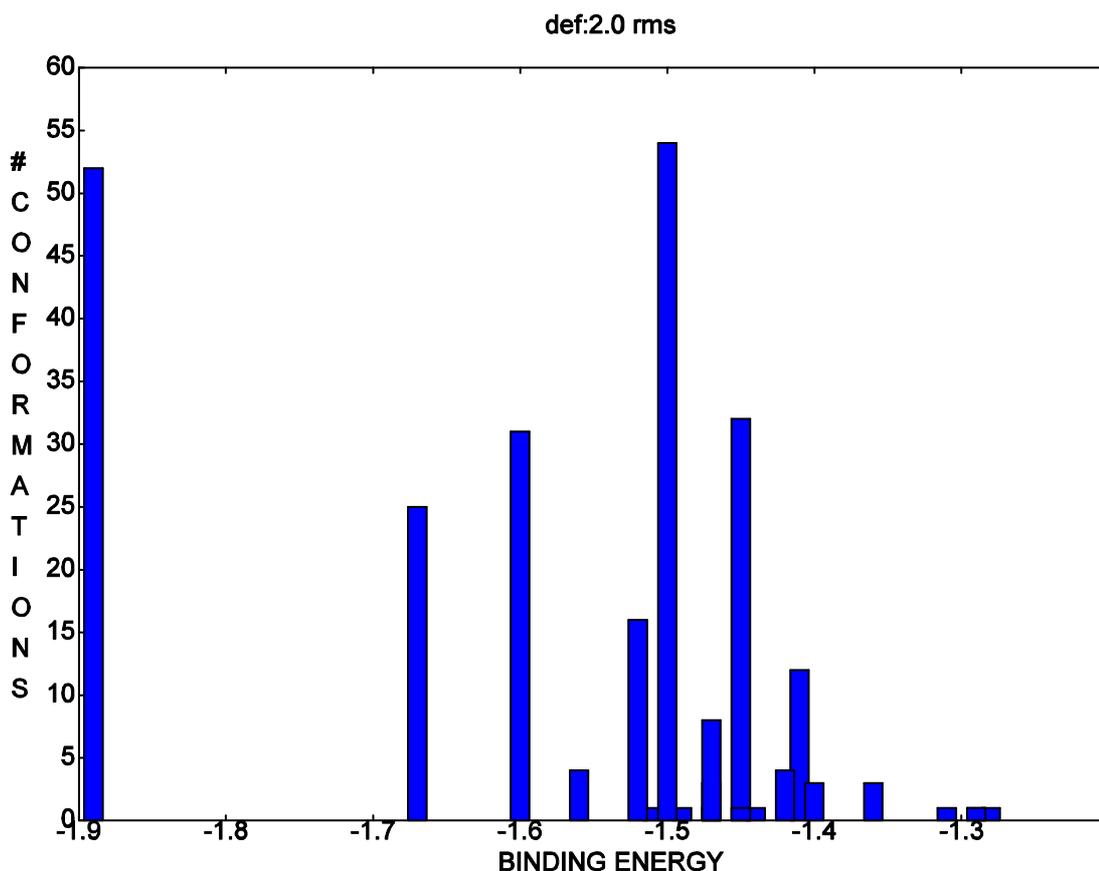


Рисунок 30. Количество полученных комплексов, обладающих одинаковой энергией и одинаковой в пределах RMSD структурой в зависимости от энергии комплекса для дефензина D2 и мембраны M1.

Для того чтобы проанализировать какие аминокислотные остатки белка наиболее часто участвуют в образовании комплексов была разработана специальная программа, которая определяет расстояние между центрами масс взаимодействующих молекул, а также определяет минимальное расстояние между молекулами и проводит статистический анализ участия всех аминокислотных остатков в образовании комплексов.

Анализ наиболее энергетически выгодных комплексов показал, что в комплексах дефензина D1 с бислоем фосфатидилхолина, D1 взаимодействует с поверхностью мембраны фосфатидилхолина аминокислотными остатками расположенными на N- терминальном конце и петле соединяющей $\beta 2$ и $\beta 3$ бета-слои, и наибольший вклад в энергию взаимодействия дают аминокислотные остатки LYS1 и ASN37. В энергию взаимодействия дефензина D2 с бислоем наибольший вклад дают остатки LYS32, GLU35, расположенные на $\beta 2$ бета-слое. А дефензин D3 взаимодействует с мембраной своими N и C – терминальными остатками - ARG 1, ASN 45, CYS 46. Для дефензина D4 характерно взаимодействие ASP37 и PHE39, расположенных на петле соединяющей $\beta 2$ и $\beta 3$ бета-слои. Для D5 наибольшее количество контактов с бислоем образуют остатки ALA1, THR2, LYS28, LYS36, CYS47 расположенные на N и C терминальных концах белка и на петле соединяющей альфа-спираль и бета-слой. В энергию взаимодействия дефензина D6- с бислоем наибольший вклад дают остатки LYS21, ARG25, PHE29, LYS 9, PRO50, которые расположены на альфа-спирали и на петле соединяющей альфа-спираль и бета-слой.

Для мембраны фосфатидилэтаноламина также наблюдается различная ориентация дефензинов в наиболее энергетически выгодных комплексах. Детальный анализ аминокислотных остатков дающих наибольший вклад в энергию взаимодействия дефензинов с мембраной фосфатидилэтаноламина представлен в табл. 5. Кроме того в таблице представлены средняя и максимальная энергии взаимодействия дефензинов с бислоем, а также константа диссоциации комплексов.

Сравнение энергии взаимодействия дефензинов с двумя типами мембран показывает, что дефензины примерно одинаково по энергии взаимодействуют с обоими бислоями, при этом дефензины D1 и D2 демонстрируют большее сродство с мембраной фосфатидилэтаноламина.

Таблица 5. Средняя энергия и максимальная энергия взаимодействия, константа диссоциации комплексов образованных дефензином и бислоем фосфатидилэтаноламина и аминокислотные остатки дефензинов дающие наибольший вклад в энергию взаимодействия.

Дефензин	Средняя энергия взаимодействия (ккал/моль)	Максимальная энергия взаимодействия (ккал/моль)	Константа диссоциации (mM)	Аминокислотные остатки
D1	-2.10	-2.20	24.54	LYS1, ASN37
D2	-2.0	-2.27	21.71	GLU35, LYS58, ARG59
D3	-1.7	-2.19	24.98	ARG1, LYS24, ASN45, LYS6
D4	-0.9	-0.93	208.02	ASP8, ARG11, ASP37
D6	-1.4	-1.89	41.21	ARG1, PRO50, LYS21, LYS9

Сравнительный анализ различных вкладов в энергию взаимодействия дефензинов с фосфолипидами показал, что наибольший вклад дают электростатическое взаимодействие, а также сольватационный и гидрофобный эффекты. Достаточно слабая энергия взаимодействия дефензинов с поверхностью мембраны позволяет предположить

необходимость включения в мембрану специфических рецепторов для усиления взаимодействия.

Специфичность взаимодействия дефензинов проявляется прежде всего в различной ориентации молекул белка относительно поверхности бислоя. Различная ориентация белков относительно поверхности мембраны позволяет предположить, что дефензины будут по-разному встраиваться в мембраны. Дефензины ориентированные гидрофобными остатками будут встраиваться в гидрофобную зону бислоя, в то время как взаимодействие заряженных концевых остатков с полярными группами фосфолипидов будет удерживать белок в поверхностной зоне. Широкая зона контакта белка с поверхностью мембраны будет создавать дополнительное стерическое противодействие проникновению белка вглубь мембраны.

Таким образом, сравнительный анализ взаимодействия шести дефензинов растительного происхождения с твердой поверхностью мембраны показал, что дефензины слабо взаимодействуют с поверхностью мембраны и основной вклад в энергию взаимодействия дает электростатическое взаимодействие, а также сольватационный и гидрофобный эффекты. Специфичность взаимодействия проявляется в различной ориентации белка относительно поверхности мембраны.

2.1.6. Построение модели репрограммирования экспрессии генома растений при индукции устойчивости с включением новых компонентов – генов PR-белков, белков ATG-семейства, интранирующих РНК, генов липоксигеназной сигнальной системы, новых медиаторов сигнальных систем, защитных метаболитов и пептидов.

В результате проведенных исследований нами получен обширный экспериментальный материал, отражающий различные процессы стрессового ответа растений и приспособительных реакций фитопатогенных

микроорганизмов. Суммирование результатов, касающихся отдельных элементов фитоиммунитета и патосистем представлено в виде табл. 6.

Таким образом, в таблице представляет собой описание модели стрессового состояния растения, связанного с инфицированием и абиогенным стрессом. Следует отметить, что в отношении фитопатогенной бактерии *Pba* имеющиеся сведения позволяют построить более полную картину изменения физиологической программы при формировании патосистемы. В отношении растений дополнение модели нуждается в дальнейшем исследовании. Обращают на себя внимание принципиальные различия в индукции белков между корнями и листьями. Это объясняется как отсутствием в корнях хлоропластов и белков, обслуживающих процесс фотосинтеза, так и отличиями в наборе конститутивных и индуктивных антипатогенных белков корней и надземных органов.

Таблица 6 А. Взаимодействие факторов иммунитета растений при стрессовом ответе и формировании патосистемы

Описание воздействия, орган				Ген (белок)	Функция	Описание воздействия, орган			
Раневой стресс, метилжасмонат, этилен						Окислительный стресс, салициловая кислота, АБК			
Корень		Побег				Корень		Побег	
Ранний ответ	Поздний ответ	Ранний ответ	Поздний ответ			Ранний ответ	Поздний ответ	Ранний ответ	Поздний ответ
+	-	+		Фосфолипаза A ₂	Метаболизм липидов	+	-	+	-
+	-	+		Липоксигеназы,	Метаболизм оксипинов	+	-	+	-
				Липиддесатураза подобный белок	Метаболизм липидов, синтез полиеновых жирных кислот				+
			+	алленоксидсинтазы	Синтез жасмонатов			-	+
			+	Гидропероксидлиазы	Синтез летучих сигнальных соединений	-	-		
				PR6	Ингибирование протеолитических ферментов некротрофных патогенов	+	+		
	+			PR-12	Дефензины, дезорганизация мембраны фитопатогенных грибов	+		+	
	-			PR1	Неизвестно	+			
	+			PR10	Рибонуклеазы, разрушение РНК	-	+		
	+		+	PR-9	Пероксидазы, синтез лигнина, укрепление клеточной стенки, метаболизм АФК	+		+	
				PR-2	Бета-1,3-Глюканаза			+	+
				PR-7	Протеиназы, разрушение белков патогенов	+			
				PR-3, PR-4	Хитиназы, разрушение хитина патогенов			+	+
	+			PR-8	Лизоцим-подобные белки, разрушение клеточной стенки бактерий				
				PR-5	Осмотины, тауматино-подобные белки	+			

+	Профукозидазы	Реорганизация полисахаридов клеточной стенки	+
-	Тубуллин А	Участие в росте и делении клеток	-
+	Фруктокиназа	Участие в энергетическом обмене	+
+	5-метилтетрагидроптероилтриглутаматгомоцистеин-S-метилтрансфераза	Синтез метионина	+ +
	Аутофагические белки (<i>atg4</i> , <i>atg6</i>)		- +
	Апопластные пероксидазы	Метаболизм АФК	+ -
	Альфа-амилаза	Метаболизм углеводов	+
	Малатдегидрогеназа	Участие в энергетическом обмене	+ --
	Белок 33 кДа фотосистемы II	Участие в фотосинтезе	+
	Глютаминамидотрансфераза класс-I	Синтез пуриновых и цитозинового нуклеозидов	+
	Шаперонин альфа-срп60	АТР-зависимый рефолдинг белков	+
	Енолаза	Участие в гликолизе	+
	Полиубиквитин	Участие в протеолизе	+
	Бета-субъединица В трансляционного фактора I элонгации	Синтез белка	+
	Ядерный антиген пролиферирующих клеток (PCNA)	Репарация ДНК	+
	10,11-редуктаза 12-оксофитодиеновой кислоты	Метаболизм оксипиринов	+
	Глютатион-S-трансфераза	Защита от ксенобиотиков	+
	NBS-LRR белки	Участие в узнавании экскретируемых	+

		патогенами эффекторных белков	
+	Тубулин А	Участие в клеточном делении и движении цитоплазмы	
+	Ингибиторы протеаз	Участие в апоптозе и белковом обмене клетки	

Таблица 6 Б. Регуляция сигнальных систем и факторов вирулентности фитопатогенной бактерии *P. atrosepticum*

Ткань, стадия инфекции				Гены (белки)	Функция	Ткань, стадия инфекции			
Колонизация						Патогенез			
Корень		Побег				Корень		Побег	
Ранняя стадия	Поздняя стадия	Ранняя стадия	Поздняя стадия			Ранняя стадия	Поздняя стадия	Ранняя стадия	Поздняя стадия
-	+	-	+	Система секреции третьего типа (HrpA)	Подавление сигнальных систем растения и фитоиммунитета	-	-	-	-
+	+	+	+	Гарпины (DspE)	Подавление сигнальных систем растения и фитоиммунитета	-	-	-	-
-	-	-	-	Гидролитические экзоферменты	Разрушение клеточных стенок растения, мацерация тканей	-	+	+	+
-	+	-	+	KdgR	Рецептор распознавания продуктов деградации клеточной стенки растений	+	-	+	-
+	+	+	+	RsmA	Специфичная РНК-аза, глобальный репрессор генов вирулентности	-	-	-	-
-	-	-	+	<i>rsmB</i>	Регуляторная РНК, антагонист RsmA	+	-	+	-
-	+	-	+	ExpR	Позитивный регулятор транскрипции RsmA и генов вирулентности	+	-	+	-
-	-	-	-	<i>expR</i> - анти-сенс <i>expI</i>	Регуляторная РНК, репрессор гена АГЛ-синтазы	+	+	+	+
-	-	-	+	<i>expI</i>	Ген АГЛ-синтазы	+	-	+	-

2.1.7. Практические испытания и масштабирование применения антагонистов фитопатогенов в качестве регуляторов фитоиммунитета в условиях *in vivo* в цехах ООО «Тепличный Комбинат «Майский»

Одним из важных направлений современных исследований является повышение продуктивности растений. Этот показатель зависит от видовой принадлежности и от условий выращивания растений (Громовых, 2002; Голованова, 2008). На протяжении долгого времени основным средством повышения урожая сельскохозяйственной продукции являлось использование химических средств защиты растений. Однако при этом не учитывались негативные последствия применения химических препаратов: возникновение резистентных форм фитофагов и фитопатогенов и, как следствие этого, усиление пестицидного пресса, нарушение биологического равновесия в агроценозах, что приводит к вспышкам массового размножения фитопатогенов не только доминирующих, но иногда и второстепенных видов, общее ухудшение экологии.

В настоящее время альтернативой химическому методу защиты растений от болезней является биологический способ защиты растений. Основа данного метода – использование организмов, выступающих естественными врагами возбудителей болезней растений. Одними из таких организмов уже давно положительно зарекомендовали себя почвенные сапротрофные грибы рода *Trichoderma*. Выступая естественными обитателями многих субстратов, быстро размножаясь в условиях культуры и природы, являясь непатогенными для растений, животных и человека, грибы рода *Trichoderma* представляют собой удобный объект для изучения и создания на основе их активных штаммов препаратов биоконтроля фитопатогенных микромицетов в фитоценозах (Алимова, 2006; Коломбет, 2007; Druzhinina, 2011). Многие антагонистически активные штаммы грибов рода *Trichoderma* уже стали базой для создания безопасных для

окружающей среды биопрепаратов защиты растений от болезней (“Триходермин”, “Энпродерма” и др.).

Структура патогенных комплексов неодинакова, их состав и представленность отдельных компонентов постоянно меняются вследствие изменения сортового состава растений-хозяев, технологий возделывания. Поэтому, основной задачей на сегодняшний день является постоянный поиск новых антагонистически активных в отношении фитопатогенов штаммов грибов рода *Trichoderma* и создание на их основе новых эффективных биопрепаратов, а также расширение спектра действия уже имеющихся.

В связи с этим целью настоящих исследований явился поиск антагонистов фитопатогенов являющихся регуляторами фитоиммунитета растений, а так же их практическое испытание и масштабирование в условиях *in vivo*. Анализ был проведен на семенах пшеницы сорта Люба (создан в НПО “Подмосковье”). В работе использовались изоляты гриба рода *Trichoderma*: *T. koningii* 9А (з), *T. koningii* 183, *T. viride* 192-3, *T. asperellum* 302, *T. sp.* 406-2.

Фитоэкспертиза семян пшеницы сорта Люба (урожай 2011 года) проведенная нами ранее показала, что они характеризуются заспоренностью: *Tilletia caries* (66,4%), *Septoria* (14%), *Bipolaris* (53,6%), *Fusarium* (38,5%), *Alternaria* (22%). На семенах также выявлены возбудители плесени из рода *Penicillium* (57,5%) и *Aspergillus* (25%).

Затем в опытах *in vitro* было проведено исследование различных видов препарата разработанных нами на основе изолятов гриба рода *Trichoderma* на рост и развитие проростков и корней пшеницы.

Биотический аспект изучения препаратов предполагает обязательное изучение их взаимоотношения с эдификаторами, которыми являются фототрофные организмы. Главным регулирующим фактором типа взаимоотношений является спектр метаболитов, выделяемых растением, вид растения, стадия онтогенеза, физико-химические свойства почв, а также

спектр возбудителей внутренней инфекции. Отмечена зависимость типа воздействия на растение от концентрации препарата. Эффект разведения вызывал разнонаправленное действие на растения - от стимуляции до ингибирования роста и развития.

Исследования влияния препарата на семена проводили через 24 часа, на третьи и на седьмые сутки. Выявлены стимулирующее воздействие препарата на все показатели и исследуемые органы растения. Выявлена зависимость от степени разведения и вида препарата. Для исходного препарата и его разведений 1:10 и 1:100 в вариантах на основе *T. asperellum* 302 и *T. koningii* 183 отмечено достоверное стимулирующее влияние на всхожесть, энергию прорастания, длину корней и проростков на третьи и седьмые сутки развития семян (рис. 31, 32). Так же для этих вариантов выявлена линейная зависимость между степенью разведения препарата и фенологическими параметрами растений.

Для изолятов *T. koningii* 9А (з) в исходной культуральной жидкости и в разведении 1:10 и 1:100 наблюдалась нелинейная зависимость между степенью разведения КЖ и фенологическими параметрами.

Так же ранее нами было исследовано влияние различных видов препарата на фитосанитарное состояние семян в опытах *in vitro*. Было проведено протравливание зерен (урожай 2011 года) различными видами препарата и были отмечены существенные изменения пораженности посевного материала при обработке разными формами протравителя (табл. 7). Так по данным фитомониторинга семян пшеницы сорта «Люба», обработанных различными видами препарата, наибольший фунгицидный эффект в отношении *Bipolaris* и *Fusarium* был отмечен при использовании в качестве протравителя препарата на основе *T. koningii* 9 А (з), к *Alternaria* и *Septoria* в вариантах с использованием препарата на основе *T. viride* 192-3, *T. koningii* 9 А (з), *T. asperellum* 302, *T. koningii* 183, к *Penicillium* - *T. viride* 192-3, *T. sp.* 406-2, *T. asperellum* 302, *T. koningii* 183, *Aspergillus* в вариантах с *T.*

koningii 183, *T.viride* 192-3, *T. asperellum* 302. Снижение развития болезни проростков отмечено в варианте с *T.viride* 192-3.

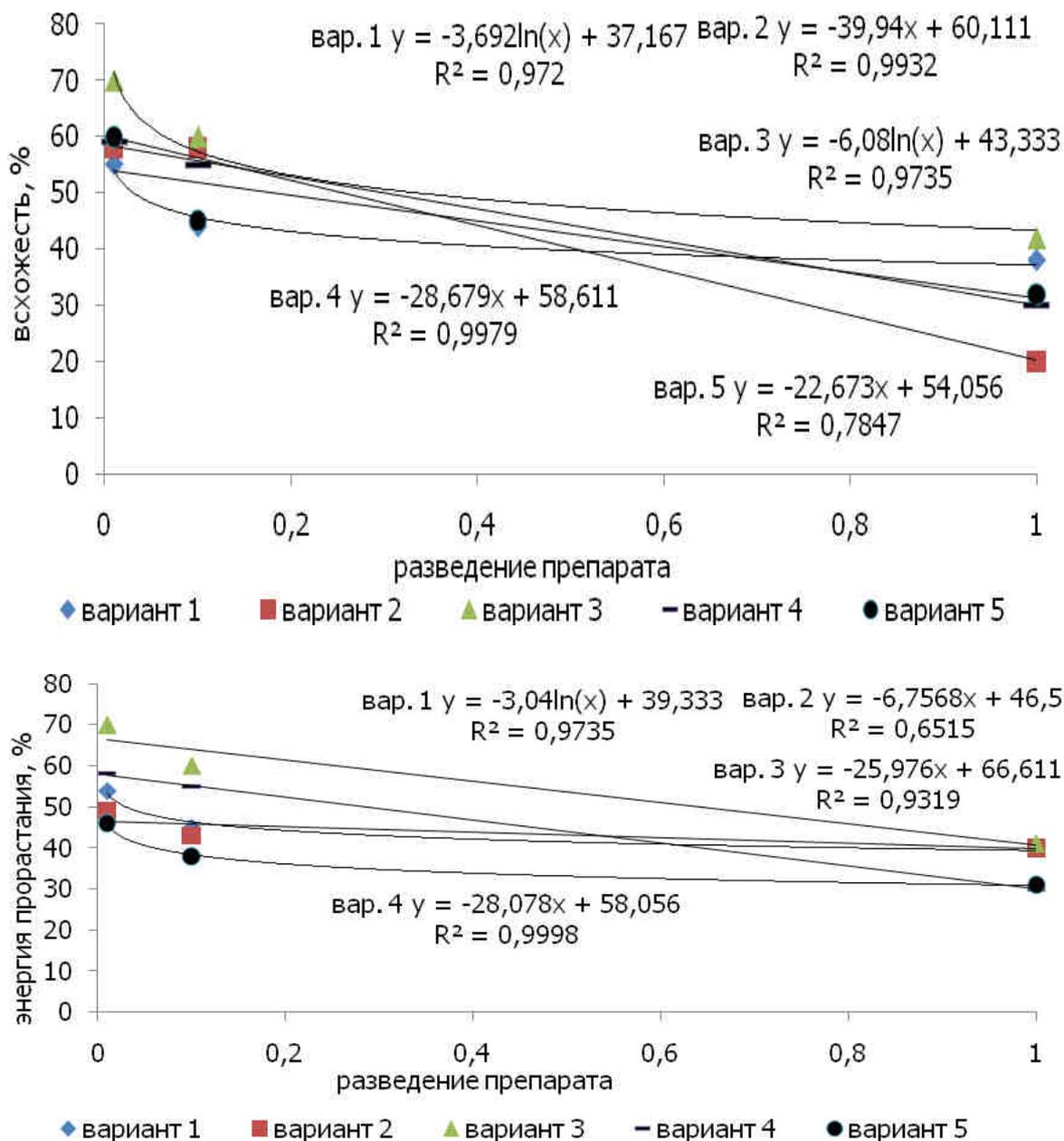


Рисунок 31. Зависимость всхожести и энергии прорастания семян пшеницы сорта «Люба» от степени разведения различных видов препаратов. Варианты: 1 – препарат на основе *T. viride* 192-3; 2 - препарат на основе *T. sp.* 406-2; 3 - препарат на основе *T. koningii* 9A(з); 4 - препарат на основе *T. asperellum* 302; 5 - препарат на основе *T. koningii* 183.

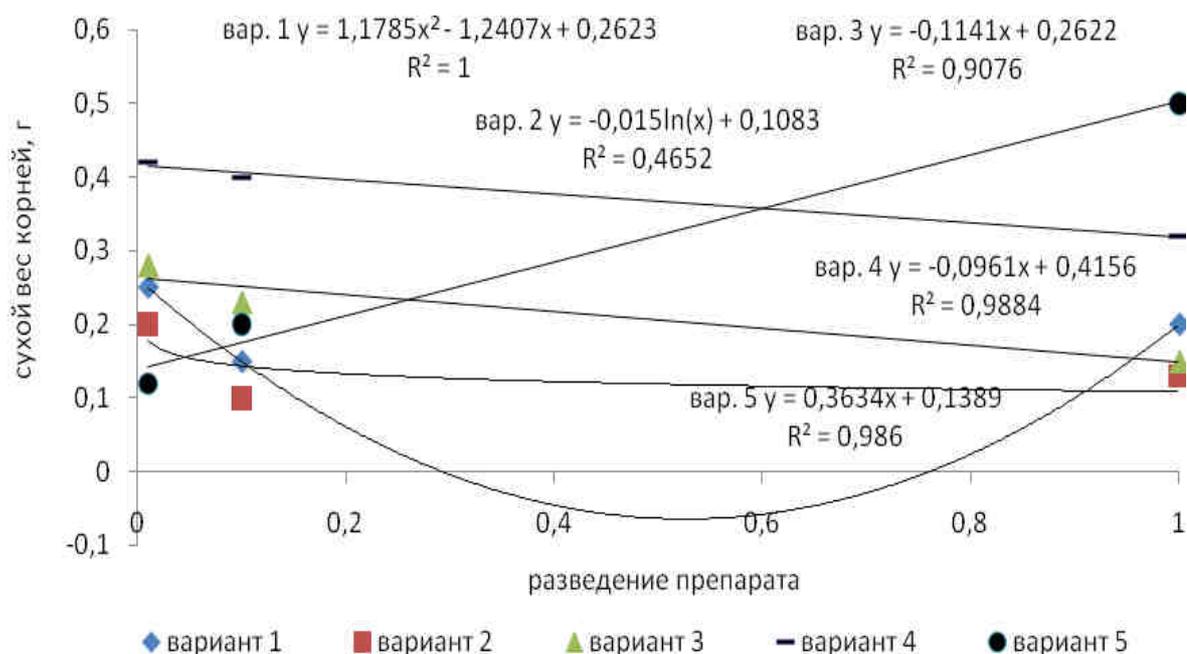


Рисунок 32. Зависимость длины корней и проростков семян пшеницы сорта «Люба» на третьи и седьмые сутки после обработки от степени разведения различных видов препаратов («Фитотрикс»). Варианты: 1 – препарат на основе *T. viride* 192-3; 2 - препарат на основе *T. sp.* 406-2; 3 - препарат на основе *T. koningii* 9 A (з); 4 - препарат на основе *T. asperellum* 302; 5 - препарат на основе *T. koningii* 183.

Таблица 7. Фитоэкспертиза семян пшеницы до и после протравливания в опытах *in vitro*.

Показатель	Пораженность, %					
	контроль	Варианты обработки <i>T. sp.</i>				
		9 A(з)	183	192-3	302	406-2
<i>Tilletia caries, Tilletia levis</i>	66,4	66,4	66,4	66,4	66,4	66,4
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	53,6	13,5	32,4	21,5	15,1	8,4
<i>Fusarium sp.</i>	38,5	20	21	14,5	22,3	7,9
<i>Alternaria alternata</i>	22	0	0	0	0	15,3
<i>Septoria nodarum</i>	14	0	0	0	0	0
<i>Penicillium sp.</i>	57,5	12,5	0	0	0	0
<i>Aspergillus sp.</i>	25	21,2	0	0	0	12,3
Развитие болезней проростков	56,4	16,4	23,5	13,9	31,1	24,3

Инфицированные семена, посаженные в почву могут в дальнейшем заражаться и почвенными фитопатогенами, которые вызывают заболевание корневой системы, а надземная часть по ходу вегетации – фитопатогенами

воздушно-капельным путем. Семена пшеницы, обработанные различными видами препарата, были посажены в почву весной 2012 года. Данные по исследованию энергии прорастания, всхожести семян, высоты растений, а так же фитосанитарного состояния посевов пшеницы приведены в предыдущем отчете.

Так же мы изучали влияние различных видов препарата на структуру урожая пшеницы сорта «Люба». Из приведенных ниже данных по величине урожая видно, что лучшие результаты по продуктивной кустистости получены в вариантах 4 (на основе *T. asperellum* 302) и 2 (на основе *T. sp.* 406-2) при обработке семян (1,36 и 1,48, соответственно) и в вариантах 4-1 и 2-1 - при обработке и семян, и растений по вегетации (1,23 и 1,38, соответственно) по сравнению с контролем (1,16) (табл. 8).

Увеличение длины колоса при воздействии протравителей отмечено почти во всех вариантах, где отличились варианты 1 на основе *T. viride* 192-3 (8,52 см), 4 на основе *T. asperellum* 302 (8,71 см), 2 на основе *T. sp.* 406-2 (9,01 см) при обработке исследуемыми изолятами только семян и варианты с 1-1 (8,43 см), 4-1 (8,21 см) и 2-1 (8,95 см) при обработке ими и семян, и растений по вегетации, по сравнению с контролем (8,49 см).

Отмечено увеличение числа зерен с 1 колоса в вариантах 4 с *T. asperellum* 302 (29,81 шт.), 2 с *T. sp.* 406-2 (33,91 шт.) при обработке ими только семян пшеницы сорта Люба и в варианте 2-1 с *T. sp.* 406-2 (29,14 шт.) при обработке ими и семян, и по стерне по сравнению с контролем (24,76 шт.). Самые низкие показатели отмечены в варианте 3 с *T. koningii* 9A (з) (20,7 шт.) и в вариантах 5-1 с *T. koningii* 183 (19,6 шт.) и 1-1 с *T. viride* 192-3 (14,8 шт.).

Таблица 8. Структура урожая яровой пшеницы сорта Люба урожая 2012 года.

Варианты	Продуктивная кустистость, шт..	Длина колоса, см	Число зерен с 1 колоса, г	Вес зерна с 1 колоса, г	Абсолютный вес 1000 зерен, г
Контроль	1,16	8,49	24,76	0,9	25
Вариант 1 на семенах	1,45	8,52	26,4	0,7	24
Вариант 2 на семенах	1,48	9,01	33,91	1,08	30,3
Вариант 3 на семенах	0,9	6,9	20,7	0,6	22
Вариант 4 на семенах	1,36	8,71	29,81	0,98	28,9
Вариант 5 на семенах	1,2	7,2	22,4	0,8	25
Вариант 1-1 на семенах + компост	1,09	8,43	14,8	0,6	26,4
Вариант 2-1 на семенах + компост	1,38	8,95	29,14	1,05	29,98
Вариант 3-1 на семенах + компост	1,6	7,9	21,4	0,4	24
Вариант 4-1 на семенах + компост	1,23	8,21	20,7	0,98	29,12
Вариант 5-1 на семенах + компост	1,26	8,1	19,6	0,77	20,2

Варианты обработки семян: 1 – препарат на основе *T. viride* 192-3; 2 - препарат на основе *T. sp.* 406-2; 3 - препарат на основе *T. koningii* 9 А (з); 4 - препарат на основе *T. asperellum* 302; 5 - препарат на основе *T. koningii* 183.

Варианты обработки семян и растений по вегетации (стерни): 1-1 – препарат на основе *T. viride* 192-3; 2-1 – препарат на основе *T. sp.* 406-2; 3-1 - препарат на основе *T. koningii* 9 А (з); 4-1 - препарат на основе *T. asperellum* 302; 5-1 - препарат на основе *T. koningii* 183.

Данные анализа структуры урожая показывают, что более высокие значения веса зерна с 1 колоса получены в вариантах 4 с *T. asperellum* 302 (0,98 шт.), 2 с *T. sp.* 406-2 (1,08 шт.) при обработке ими только семян пшеницы сорта Люба и при обработке ими семян пшеницы сорта Люба по стерне по сравнению с контролем (0,9 шт.).

Высокие показатели по абсолютному весу 1000 зерен были в вариантах 4 (28,9 грамма), 2 (30,3 грамма) и в вариантах 4-1 (29,12 грамма), 2-1 (29,98 грамма) по сравнению с контролем (25 грамма).

Таким образом, исследуемые формы изолятов гриба рода *Trichoderma* оказали различное воздействие на структуру урожая в зависимости от вида *Trichoderma*. Ингибирующее воздействие на структуру отмечено в варианте с *T. koningii* 9A (з) при обработке им только семян пшеницы сорта Люба, а также при обработке и семян пшеницы сорта Люба по стерне. Максимально положительный эффект отмечен при использовании способов обработки только на семенах КЖ или в почве *Trichoderma* в вариантах с *T. asperellum* 302 и *T. sp.* 406-2.

Следующим этапом исследования препаратов на основе отобранных изолятов *Trichoderma* явилась фитоэкспертиза семян урожая 2012 года, полученного после протравливания посадочного материала.

Проведенная нами фитоэкспертиза показала, что семена пшеницы сорта Люба урожая 2012 года характеризуются заспоренностью фитопатогенами родов *Tilletia*, *Bipolaris*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Septoria* также были выявлены возбудители плесени *Penicillium* и *Aspergillus* (табл. 9).

В соответствие с полученными данными, заспоренность семян пшеницы в контроле возбудителями твердой головни снизилась с 66,4 до 14,4%. Зараженность фузариозом и альтернариозом снизилась незначительно (с 38,5 до 31,2 и с 22 до 20,0, соответственно).

Таблица 9. Эффективность действия различных видов препарата на фитопатогенные микромицеты.

Показатель	Пораженность, %											
	контроль		Варианты обработки <i>T. sp</i>									
			192-3		406-2		9 А (з)		302		183	
	до	после	до	после	до	после	до	после	до	после	до	после
Твердая головня (<i>Tilletia caries</i> , <i>Tilletia levis</i>), спор на одно зерно	66,4	14,4	66,4	14,4	66,4	14,4	66,4	14,4	66,4	14,4	66,4	14,4
Гельминтоспориоз (<i>Bipolaris sorokiniana</i>)	53,6	82,3	21,5	16,8	8,4	6,9	13,5	12,7	22,3	19,3	32,4	26,9
Фузариозы (<i>Fusarium sp.</i>)	38,5	31,2	14,5	11,8	7,9	5,8	20	18,7	0	0	21	18,5
Альтернариоз (<i>Alternaria alternata</i>)	22	20	0	0	15,3	12,8	0	0	0	0	0	0
Поражение колоса, пятнистость листьев и стеблей (<i>Septoria nodarum</i>)	14	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Пеницилез (<i>Penicillium sp.</i>)	57,5	62,4	0	0	0	0	12,5	10,5	0	0	0	0
Аспергиллез (<i>Aspergillus sp.</i>)	25	32	0	0	12,3	9,8	21,2	18,7	0	0	0	0
Развитие болезней проростков	56,4	62	13,9	10,8	24,3	21,9	16,4	13,6	31,3	26,7	23,5	21,3

Новый урожай, полученный *in vivo* из семян, предварительно обработанных различными видами препарата, характеризуется следующими параметрами по зараженности фитопатогенами: *Tilletia caries* и *Tilletia levis* (14,4), *Bipolaris* (с 82,3 до 6,9), *Fusarium* (с 31,2 до 5,8), *Alternaria* (с 20 до 12,8), *Septoria* (с 12 до 6), а также заспоренность семян возбудителями плесневения из родов *Penicillium* (с 62,4 до 10,5), *Aspergillus* (с 32 до 9,8). Нами отмечено снижение заспоренности семян по *Aspergillus* с 32 до 9,8 и *Alternaria* с 20 до 12,8.

Одной из возможных причин различного эффекта протравителей на семена может служить разнообразие фитопатогенных микромицетов на семенах. Угнетение одного микромицета протравителями может способствовать увеличению количества другого (Павлова, 2002).

Внесение в почву грибов рода *Trichoderma* существенно изменяет видовой состав грибной микрофлоры. Произшедшие изменения положительно сказались в снижении распространенности инфекционного фона семян (Якименко, 2000).

Наблюдаемый ранее фунгицидный и фунгистатический эффект в опытах *in vitro* подтвердился и в наших опытах *in vivo*. В зависимости от вариантов обработки биопрепаратом, содержание пораженных корневой гнилью (*Bipolaris*) семян исследуемой партии, снизился приблизительно в два раза. Содержание семян пораженных *Fusarium* снизилось в вариантах 3 (*T. koningii* 9 А (з)) и 5 (*T. koningii* 183). Таким образом, наблюдаемый нами эффект *Trichoderma* дает сохранение его фунгицидного и фунгистатического действия не только в вегетации и в опытах *in vitro*, но и в качестве нового урожая.

Нами отмечена разница в структуре микромицетного сообщества урожая пшеницы 2012 года полученного из посевного материала 2011 года (табл. 10).

Исследование структуры микромицетного сообщества заселяющего семена пшеницы полученных в системе биологического земледелия, т.е. в

условиях предпосевного протравливания *Trichoderma* показало, что доминирующее положение среди фитопатогенных микромицетов занимали микромицеты рода *Alternaria*. Количество КОЕ (колонии образующие единицы) изменялось в зависимости от варианта опыта (от 18 до 73%). Возбудитель *Fusarium* из разряда доминирующего перешел в разряд часто встречающихся. Из данных табл. 11 видно, что под действием всех вариантов обработки посадочного материала уменьшилась частота встречаемости плесневых грибов родов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, пораженность которых снизилась до 5-10%, в зависимости от рода сапротрофов и вида применяемого протравителя. В варианте 5 (*T. koningii* 183) отмечено максимальное снижение частоты встречаемости *Bipolaris*.

Показано, что для семян 2012 года все варианты обработки были эффективны против *Septoria*, плесневых грибов. По данным урожая 2011 года полученные в результате протравливания посадочного материала подтвердили высокую биологическую эффективность варианта 5 (*T. koningii* 183) в отношении *Bipolaris* и *Fusarium*. Однако вытеснение *Fusarium* вызвало возрастание поражения альтернариозом (*Alternaria*).

Таблица 10. Структура сообщества микроорганизмов, заселяющих семена пшеницы сорта Люба 2012 годы в опытах *in vivo*.

Виды микроорганизмов	Частота встречаемости, %					
	Варианты обработки <i>T. sp</i>					
	контроль	192-3	406-2	9 А (з)	302	183
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	69	50	20	40	40	50
<i>Fusarium oxysporum</i>	46	38,1	30	34	12	49,5
<i>Fusarium solani</i>	34,5	0	0	0	0	0
<i>Fusarium graminearum</i>	46	0	0	0	0	0
<i>Alternaria alternata</i>	86	44	18	73	23	53
<i>Septoria nodarum</i>	23	0	3	2	0	0
<i>Mucor sp.</i>	52	0	0	45	0	0
<i>Penicillium sp.</i>	61	15	10	20	0	0
<i>Aspergillus sp.</i>	24	5	3	20	0	0

Фитоэкспертиза нового урожая показала, что по суммарному снижению пораженности тремя возбудителями заболеваний *Bipolaris*,

Alternaria и *Fusarium* отмечено для вариантов 2 (*T. sp.*406-2), 3 (*T. koningii* 9 А (з)) и 4(*T. asperellum* 302), т.к. КЖ этих вариантов эффективна в отношении *Bipolaris* и *Alternaria*, но не эффективна против *Fusarium*, тогда как совместное сочетание их обладает высоким фунгицидным эффектом в отношении всех трех возбудителей.

2.1.8. Использование материалов и результатов НИР в образовательном процессе

Результаты НИР были использованы в разработке новых учебных курсов и дополнений к уже существующим (всего 42 наименования). Данные приведены в приложении 3 к Аннотации отчета и в прикрепленном файле.

2.1.9. Использование материалов и результатов НИР в целях профориентации молодежи при выборе профессии

В процессе выполнения НИР активное участие принимали студенты Казанского (Приволжского) федерального университета. Активное участие научных сотрудников и преподавателей в учебном процессе и при выполнении студентами исследовательской работы позволило большинству из них выбрать в качестве профессиональной ориентации научно-исследовательскую работу (см. Показатели и индикаторы и прикрепленные сопроводительные документы).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ранее нами было показано, что в ответ на действие патогенов в растениях происходит интенсификация липоксигеназного метаболизма (Chechetkin et al., 2009). В растениях, инфицированных *Pba*, количество образуемых оксилипинов было значительно выше, чем у неинфицированных

растений. На данном этапе исследований на основе разработанной нами экспериментальной платформы для оценки уровня экспрессии генов кукурузы мы проанализировали изменение уровня экспрессии полной совокупности генов липоксигеназ и СУР74. В результате многочисленных экспериментов были зафиксированы значительные изменения в транскрипционной активности генов, кодирующих белки метаболизма оксипиринов при раневом стрессе и инфицировании фитопатогенами.

Общепризнано, что липоксигеназная сигнальная система является одним из основных участников формирования фитоиммунитета. Было показано, что медиаторы этой системы – жасмоновая кислота (ЖК) и метилжасмонат (МеЖ) вызывают значительные изменения в транскриптомных профилях и протеомных спектрах. В рамках выполнения Проекта нами впервые было показано, что обработка растений МеЖ приводит к изменениям протеома корней. Из обнаруживаемых на электрофореграммах около 600 белков, было идентифицировано 20, для которых отмечено повышение или снижение содержания в корнях при обработке МеЖ.

В рамках проекта нами был получен ряд результатов приоритетного характера об изменениях протеомов растений под влиянием их обработки другим сигнальным медиатором, конкурентным по отношению к МеЖ, салициловой кислотой (СК). Значительная часть белков, содержание которых существенно изменилось под влиянием СК, были идентифицированы, с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии.

Большинство из идентифицированных нами СК-индуцируемых белков листьев могут принимать участие в защитных функциях растений. Часть из них может разрушать клеточные стенки патогенных микроорганизмов (хитиназа, гликозидгидролаза семейства 18, бета-1,3-глюканазы), другие – повышать устойчивость клеток (белок устойчивости к болезням) и способствовать активации липоксигеназного сигнального каскада (липиддесатураза). В целом, по результатам исследований можно

заклучить, что СК вызывала усиление синтеза белков, повышающих устойчивость, как самих растительных клеток, так и белков прямого антипатогенного действия. Особенно важным можно считать обнаружение СК-индуцируемого исчезновения 10,11-редуктазы 12-оксофитодиеновой кислоты. Это может не только затормозить синтез жасмонатов, но и привести к накоплению их предшественника – ОФДК, являющегося важнейшим фактором локального иммунитета растений.

Нами было изучено совместное действие салициловой кислоты и МеЖ в протеомах корней гороха. В результате было выявлено отрицательное взаимовлияние на биосинтез двух фитогормонов. В тоже время, в отношении образования защитных белков показано сохранение изменений, характерных для действия каждого фитогормона по отдельности. Так как салициловая кислота является ключевым фактором иммунитета против биотрофных патогенов, а МеЖ – против некротрофных, то полученные результаты могут использоваться для рекомендаций по составу антипатогенных препаратов одновременно и против биотрофных и некротрофных патогенов.

Актуальной проблемой фитопатологии является изучение мембранной регуляции стрессовых ответов растения и патогена. Искусственная модификация стеринового компонента мембран может быть осуществлена с помощью полиеновых антибиотиков, к которым относится нистатин. Методом ПЦР в реальном времени со специфичными праймерами нами показано увеличение экспрессии генов пероксидаз в растениях пшеницы при действии нистатина. Эти данные подтверждены экспериментами по определению содержания в клетках H_2O_2 . Таким образом, нами впервые показано, что увеличение ионной проницаемости плазмалеммы с помощью различных агентов, в том числе антибиотиков различной природы, сопровождается развитием окислительного стресса.

Важным механизмом, способствующих удалению окисленных белков, липидов и поврежденных органелл, является процесс аутофагии. Исследованиями, проведенными нами ранее, было показано, что

окислительный стресс в клетках корней пшеницы приводит к интенсивному образованию аутолитических вакуолей (аутофагосом) (Дмитриева и др., 2012). Результаты, полученные нами на данном этапе свидетельствуют о том, что нарушение мембранной проницаемости клеток каналоформерами различной природы приводит к развитию в клетках растений окислительного стресса и индукции аутофагии. Анализ молекулярно-генетических эффектов стерин-истощающего агента нистатина и неспецифического каналоформера грамицидина S свидетельствует о том, что токсичное действие этих антибиотиков на клетки сопровождается изменением интенсивности экспрессии ключевых антиоксидантных и аутофагических генов.

При формировании патосистемы исход противостояния макро- и микроорганизма во многом определяется адекватностью ответов партнеров на происходящие изменения физиологических программ паразита и хозяина. В связи с этим, проблема борьбы с фитопатогенами не может быть решена без изучения сигнальных систем и адаптивных реакций не только растений, но и микроорганизмов. В первую очередь представляет интерес регуляция экспрессии факторов вирулентности патогенов. Одним из основных факторов вирулентности фитопатогенных бактерий являются ферменты деградации клеточной стенки растений. Фитопатоген *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 (*Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*, *Pba*) обладает богатым арсеналом таких ферментов. Нами установлено, что регуляция экспрессии основных генов вирулентности *Pba* осуществляется с обязательным участием метаболитов растения-хозяина. Максимальная активность генов, отвечающих за синтез гидролитических ферментов, наблюдается при достижении популяцией бактерий пороговой величины плотности клеток. При переходе на стационарную фазу роста активность этих генов значительно снижается.

Благодаря разработанному нами методу цепь-специфичной амплификации обратных транскриптов нами была определена транскрипционная активность прямой (смысловой) и обратной

(антисмысловой, ас-) цепей в 5'-концевых областях генов *expI* и *expR*. Было показано, что в растущей культуре *Pba* высокое относительное количество асРНК коррелирует с низкой транскрипционной активностью генов. Таким образом, предполагаемый механизм регуляции гена АГЛ-синтазы *Pba* реализуется на посттранскрипционном уровне и заключается в деградации мРНК, индуцируемой регуляторной РНК, являющейся продуктом транскрипции регуляторного гена.

С помощью лазерной микродиссекции нами были получены образцы растительных сосудов и тканей паренхимы, инфицированных *Pba*. Использование микродиссекторных образцов позволило выявить дифференциальную экспрессию генов, контролирующую вирулентность бактерий в зависимости от локализации микроорганизмов *in planta*. С одной стороны, это раскрывает последовательную закономерную активацию и репрессию генов сигнальной системы кворум-сенсинга бактерий в ходе их жизненного цикла, с другой стороны, подтверждает участие в этом процессе метаболитов растения-хозяина.

При выполнении настоящего этапа Проекта был задействован богатый арсенал методов, представленный широким кругом специалистов. В результате некоторые направления удалось довести до практического применения, заключающегося в разработке способов диагностики, технологий производства и применения биологических средств защиты растений и стимуляторов роста. В частности, полученный опыт был использован для проведения фитоэкспертизы семян. Было выявлено, что семена пшеницы сорта Люба характеризуются высокой степенью заспоренности возбудителями гельминтоспориоза (*Bipolaris sorokiniana*), фузариоза (*Fusarium sp*), альтернариоза (*Alternaria alternata*) и аспергиллеза (*Aspergillus sp.*). Исследуемые семена не соответствуют регламенту ГОСТА России. В результате фенологических наблюдений отмечена также пораженность пшеницы возбудителями септориоза (*Septoria nodarum*), мучнистой росы, корневыми гнилями и бурой ржавчины по вегетации.

Разработанные нами средства биологической защиты могут существенно улучшить фитосанитарные показатели. Показано, что обработка посевного материала пшеницы 2012 года различными изолятами и метаболитами гриба рода *Trichoderma* способствует снижению зараженности семян фитопатогенными и сапротрофными микромицетами. Так, предпосевная обработка семян пшеницы сорта Люба метаболитами *Trichoderma* вызвала снижение пораженности фитопатогенами: корневой гнили (на 35,4%), фузариоза (на 21,3%), альтернариоза (на 6,7%), пенициллеза (на 45%), аспергиллеза (на 25%). Семена нового урожая пшеницы сорта Люба, полученные из семян предварительно протравленных изолятами гриба рода *Trichoderma*, соответствуют регламенту по пораженности гельминтоспориозом. Пораженность фузариозом снижается в 4,5 раза в случае использования метаболитов гриба рода *Trichoderma*. Выявлено влияние обработанных семян метаболитами *Trichoderma* на снижение пораженности фитопатогенами пшеницы сорта Люба и увеличение урожайности по сравнению с контролем в случае использования *T. sp.* 406-2. Дальнейшие исследования позволят расширить область применения полученных результатов.

В ходе реализации Проекта было проведено сопоставление полученных результатов с имеющимися литературными источниками. В ходе анализа этих данных было выявлено, что тематика Проекта является актуальной, поскольку молекулярные механизмы стрессового ответа и формирования устойчивости к неблагоприятным факторам являются одной из центральных проблем современной физиологии и биохимии растений. Использование современных методов биохимии, протеомного анализа, количественного определения экспрессии индивидуальных генов и других методов молекулярной биологии позволило получить новую приоритетную информацию в соответствии с задачами данного этапа Проекта.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что специфичные сигналы биогенного и абиогенного стресса, раневой стресс и инфицирование фитопатогенами вызывают в транскриптом растений изменения в экспрессионной активности генов, кодирующих белки метаболизма оксипиринов, генов пероксидаз, аутофагических генов и генов PR-белков различных классов.
2. Действие салициловой кислоты на растения вызывает усиление синтеза белков, повышающих устойчивость растительных клеток и обладающих прямым антипатогенным эффектом. Ингибирование синтеза 10,11-редуктазы 12-оксофитодиеновой кислоты может быть механизмом конкурентного действия салицилат-индуцируемой и липоксигеназной сигнальных систем, проявляющееся в контроле синтеза жасмонатов.
3. Впервые показано, что обработка растений МеЖ приводит к изменениям протеома корней. Идентифицировано 20 белков, для которых отмечено повышение или снижение содержания в корнях при обработке МеЖ. При совместном действии салициловой кислоты и МеЖ происходит сохранение образования защитных белков, индуцируемых каждым фитогормоном. Полученные результаты могут использоваться для рекомендаций по составу антипатогенных препаратов одновременно и против биотрофных и некротрофных патогенов.
4. Впервые показано, что увеличение ионной проницаемости плазмалеммы с помощью различных агентов, в том числе антибиотиков различной природы, сопровождается развитием окислительного стресса. Анализ молекулярно-генетических эффектов стерин-истошающего агента нистатина и неспецифического каналоформера грамицидина S свидетельствует о том, что токсичное действие этих антибиотиков на клетки сопровождается изменением интенсивности экспрессии ключевых антиоксидантных и аутофагических генов.

5. В рамках Проекта разработан метод цепь-специфичной амплификации обратных транскриптов. С помощью нового метода определена транскрипционная активность прямой и обратной цепей в 5'-концевых областях генов кворум-сенсинга *Pectobacterium atrosepticum*, контролирующих основные факторы вирулентности данного фитопатогена. Выявлено, что в механизме регуляции гена АГЛ-синтазы *Pba* участвует регуляторная антисмысловая РНК, являющаяся продуктом регуляторного гена *expR*.

6. Показано, что регуляция экспрессии ключевых генов вирулентности фитопатогенных бактерий осуществляется с обязательным участием метаболитов растения-хозяина. С использованием микродиссекторных образцов выявлена дифференциальная экспрессия генов *Pba*, контролирующей вирулентность бактерий в зависимости от локализации микроорганизмов *in planta*.

7. Семена пшеницы, использованные в регионе в 2012 году характеризуются высокой степенью заспоренности возбудителями гельминтоспориоза (*Bipolaris sorokiniana*), фузариоза (*Fusarium sp.*), альтернариоза (*Alternaria alternata*) и аспергиллеза (*Aspergillus sp.*). Разработанные нами средства биологической защиты могут существенно улучшить фитосанитарные показатели. Показано, что обработка посевного материала различными изолятами и метаболитами гриба рода *Trichoderma* способствует снижению зараженности семян фитопатогенными и сапротрофными микромицетами.

8. На основе данных ЯМР-спектроскопии получена первичная информация о структуре дефензина сосны, наработанного методом гетерологической экспрессии.

9. Сравнительный анализ взаимодействия шести дефензинов растительного происхождения с твердой поверхностью мембраны, выполненный методом молекулярного докинга, показал, что дефензины слабо взаимодействуют с поверхностью мембраны. Основной вклад в

энергию взаимодействия дает электростатическое взаимодействие, а также сольватационный и гидрофобный эффекты. Специфичность взаимодействия проявляется в различной ориентации белка относительно поверхности мембраны.

10. Предложена модель репрограммирования экспрессии генома растений при индукции устойчивости. Установлены принципиальные различия в индукции белков между корнями и листьями растений. Предположено, что это объясняется отсутствием в корнях хлоропластов и белков, обслуживающих процесс фотосинтеза, а также отличиями в наборе конститутивных и индуктивных антипатогенных белков корней и надземных органов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1 Алимова Ф.К. // Некоторые вопросы применения препаратов на основе грибов рода *Trichoderma* в сельском хозяйстве. Агро XXI. 2006. № 4-6. С. 18-21.

2 Валитова Ю.Н., Котлова Е.Р., Новиков А.В., Шаварда А.Л., Артеменко К.А., Зубарев Р.А., Минибаева Ф.В. (2010) Связывание стерина влияет на функционирование мембран и состав сфинголипидов в корнях пшеницы. Биохимия, 75(5): 644 – 653.

3 Голованова Т.И., Долинская Е.В., Костицына Ю.Н. Влияние грибов рода *Trichoderma* на ростовые процессы растений пшеницы. Электронный научный журнал «Исследовано в России». 2008. С. 173-182.

4 Гордон Л.Х, Минибаева Ф.В., Огородникова Т.И. Салициловая кислота вызывает диссипацию протонного градиента на плазмалемме растительных клеток / // Доклады Академии Наук. – 2002. – Т. 387. – № 6. – С. 839-841.

5 Гордон Л.Х. (1983) Водный обмен, его связь с дыханием и проницаемостью растительных клеток для воды. Дисс. д-ра биол. наук, Институт биохимии и биофизики РАН, Казань.

6 Гордон Л.Х., Валитова Ю.Н., Огородникова Т.И. Рахматуллина Д.Ф., Алябьев А.Ю., Лосева Н.Л., Ценцевицкий А.Н., Рубан Н.Ф. (2005) Энергетический обмен клеток корней пшеницы при модификации ионной проницаемости плазмалеммы каналоформером нистатином. Цитология, 47(12): 1088–1094.

7 Гречкин А.Н., Тарчевский И.А. Липоксигеназная сигнальная система // Физиология растений.- 1999.- Т.46.- № 1. - С. 132-142.

8 Громовых Т.И., Литовка Ю.А., Громовых В.С., Махова Е.Г. Эффективность действия *Trichoderma asperellum* (штамм МГ – 97) на развитие фузариоза на сеянцах *Larix sibirica* // Микология и фитопатология. 2002. Т. 36. Вып. 4. С. 70–75.

9 Дмитриева С.А., Пономарева А.А., Минибаева Ф.В. (2009) Активация аутофагических механизмов в клетках в условиях окислительного стресса. Материалы Всероссийской научной конференции Устойчивость организмов к неблагоприятным факторам внешней среды. Иркутск 24-28 августа 2009: 131–134.

10 Дмитриева С.А., Пономарева А.А., Рябовол В.В., Минибаева Ф.В. (2012) Эффекты окислительного стресса на ультраструктуру и функциональную активность растительных митохондрий *in vivo*. Биологические мембраны, 29(4): 267–275.

11 Коломбет Л.В. Грибы рода *Trichoderma* – продуценты биопрепаратов для растениеводства // Микология сегодня. Т. 1. / Под ред. Дьякова Ю.Т., Сергеева Ю.В. – М.: Национальная академия микологии, 2007. С. 323-371.

12 Павлова В.В. Эффективность протравителей против корневых гнилей зерновых культур / В.В. Павлова // Защита и карантин растений. 2002. - № 8. -С. 21-23.

- 13 Тарчевский, И.А. Метаболизм растений при стрессе / И.А. Тарчевский. –Казань: ФЭН, 2001а. – 448с.
- 14 Тарчевский, И.А. Сигнальные системы клеток растений // И.А. Тарчевский. – Москва: Наука, 2002. – 294 с.
- 15 Якименко, Е., Городницкая, И. Влияние грибов рода *Trichoderma* на почвенные микромицеты, вызывающие инфекционное полегание сеянцев хвойных пород в лесных питомниках Сибири. Микробиология. т.69, 2000, с.850-854.
- 16 Benveniste P. (2004) Biosynthesis and accumulation of sterols. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55: 429–457.
- 17 Bernstein FC, Koetzle TF, Williams GJB, Meyer EF Jr, Brice MD, Rodgers JR, Kennard O, Shimanouchi T, Tasumi M, The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures. *J. Mol. Biol.* (1977) 112, 535–542.
- 18 Brunner F., Stintzi A., Fritig B., Legrand M. Substrate specificities of tobacco chitinases // *Plant J.* – 1998. – Vol. 14. – P. 225-234.
- 19 Canovas F.M., E. Dumas-Gaudot, G. Recorbet. Plant proteome analysis // *Proteomics.* – 2004. – Vol. 4. – P. 285-298.
- 20 Catinot J., Buchala A., Abou-Mansour E., Mretraux J.-P. Salicylic acid production in response to biotic and abiotic stress depends on isochlorogenic acid in *Nicotiana benthamiana* // *FEBS Lett.* – 2008. – Vol. 582. – P. 473–478.
- 21 Chechetkin I.R., Mukhitova F.K., Blufard A.S., Yarin A.Y., Antsygina L.L., Grechkin A.N. Unprecedented pathogen-inducible complex oxylipins from flax – linolipins A and B // *The FEBS Journal.* – 2009. –V. 276. – P. 4463-4472.
- 22 Coleman J.O.D., Blake-Kalff M.M.A., Davies T.G.E. Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation // *Trends Plant Sci.* – 1997. – Vol. 2. – P. 144–151.
- 23 Cullimore, J.V., Ranjeva R., Bono J-J. Perception of lipo-chitoooligosaccharidic Nod factors in legumes // *Trends Plant Sci.* – 2001. – Vol. 6. – P. 24-30.

24 Curto M., Camafeita E., Lopez J.A. A proteomic approach to study pea (*Pisum sativum*) responses to powdery mildew (*Erysiphe pisi*) // *Proteomics*. – 2006. – Vol. 6. – P. 163-174.

25 Curto M., Camafeita E., Lopez J.A. A proteomic approach to study pea (*Pisum sativum*) responses to powdery mildew (*Erysiphe pisi*) // *Proteomics*. – 2006. – Vol. 6. – P. 163-174.

26 De Young B.J., Innes R.W. Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense // *Nat Immunol*. – 2006. – Vol. 7 – N 12. – P. 1243–1249.

27 Den Besten, H., Ingham, C., van Hylckama, V., Beerthuyzen, M., Zwietering, M., and Abee, T. 2007. Quantitative analysis of population heterogeneity of the adaptive salt stress response and growth capacity of *Bacillus cereus* ATCC 14579. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:4797–4804.

28 Desender, S., Klarzynski, O., Potin, P., Barzic, M.-R., Andrivon, D., and Val, F. 2006. Lipopolysaccharides of *Pectobacterium atrosepticum* and *Pseudomonas corrugata* Induce Different Defence Response Patterns in Tobacco, Tomato, and Potato. *Plant Biol.* 8: 636–645.

29 Druzhinina I.S., Seidl-Seiboth V., Herrera-Estrella A., Horwitz B.A., Kenerley C.M., Monte E., Mukherjee P.K., Zeilinger S., Grigoriev I.V., Kubicek C.P. // *Trichoderma: the genomics of opportunistic success*. *Nature Reviews Microbiology*. 2011. V. 9, I. 10. p. 749-759.

30 Durrant W.E., Dong X. Systemic acquired resistance / // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 2004. – Vol. 42. – P. 185-209.

31 Feussner I., Wasternack C. The lipoxygenase pathway // *Annual Review of Plant Biology*. – 2002. – Vol. 53. – P. 275–297.

He, S.Y. Molecular biology of plant-bacteria interactions // *MSU-DOE Plant Research Laboratory Annual Report*. – 2008. – P.12-22.

32 Grechkin, A.N. Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway // *Prog. Lipid Res.* – 1998.– Vol. 37 – P. 317-352.

33 Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K., VMD - Visual Molecular Dynamics, *J. Molec. Graphics* 1996, 14.1, 33-38.

34 Jorrín-Novoa J.V., Maldonado A.M., Echevarría-Zomeño S.. Plant proteomics update (2007–2008): Second-generation proteomic techniques, an appropriate experimental design, and data analysis to fulfill MIAPE standards, increase plant proteome coverage and expand biological knowledge // Journal of Proteomics. – 2009. – Vol. 72. – P. 285- 314.

35 Katsu T., Kobayashi H., Fujita Y. (1986) Mode of action of gramicidin S on *Escherichia coli* membrane. *Biochim. Biophys. Acta*, 860(3): 608-619.

36 Laloi M., Perret A.-M., Chatre L., Melser S., Cantrel C., Vaultier M.-N., Zachowski A., Bathany K., Schmitter J.-M., Vallet M., Lessire R., Hartmann M.-A., Moreau P. (2007) Insights into the role of specific lipids in the formation and delivery of lipid microdomains to the plasma membrane of plant cells. *Plant Physiology*, 143: 461–472.

37 Levine B., Klionsky D.J. (2004) Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Developmental Cell*, 6: 463–477.

38 Lovell, H.C., Jackson, R.W., Mansfield, J.W., Godfrey, S.A.C., Hancock, J.T., Desikan, R., and Arnold, D.L. 2011. *In planta* conditions induce genomic changes in *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola*. *Molecular Plant Pathology*. 12:167–176.

39 Minibayeva F., Kolesnikov O., Chasov A., Beckett R.P., Lüthje S., Vylegzhanina N., Buck F., Böttger M. (2009) Wound-induced apoplastic peroxidase activities: their roles in the production and detoxification of reactive oxygen species. *Plant, Cell & Environment*, 32: 497–508.

40 Minic, Z. Physiological roles of plant glycoside hydrolases // *Planta*. – 2008. – Vol. 227. – P. 723-740.

41 Morris G.M, Huey R, Lindstrom W, Sanner M.F, Belew R.K, Goodsell D.S, Olson A.J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility, *J. Comput. Chem.* (2009) 30, 2785–2791.

42 Nozu Y., Tsugita A., Kamijo K. Proteomic analysis of rice leaf, stem and root tissues during growth course // *Proteomics*. – 2006. – Vol. 6. – P. 3665-3670.

43 Patel S., Dinesh-Kumar S. (2008) Arabidopsis ATG6 is required to limit the pathogen-associated cell death response. *Autophagy*, 4: 20-27.

44 Proud, C.G. Peptide-chain elongation in eukaryotes // *Molecular Biology Reports*. – 1994. – Vol. 19. – P. 161-170.

45 Regalado A.P., Pinheiro C., Vidal S. The *Lupinus albus* class-III chitinase gene, IF3, is constitutively expressed in vegetative organs and developing seeds // *Planta*. – 2000. – Vol. 210. – P. 543-550.

46 Semis R., Polacheck I., Segal E. (2010) Nystatin-intralipid preparation: characterization and in vitro activity against yeasts and molds. *Mycopathologia*, 169: 333–341.

47 Thevissen K, Ferket K. K.A, François I. E.J.A., Cammue B. P.A., Interactions of antifungal plant defensins with fungal membrane components, *Peptides* (2003) 24, 1705–1712.

48 Sharma M., Manoharlal R., Negi A.S., Prasad R. (2010) Synergistic anticandidal activity of pure polyphenol curcumin I in combination with azoles and polyenes generates reactive oxygen species leading to apoptosis. *FEMS Yeast Research*, 10: 570–578.

49 Smith J.L., De Morales C.M., Mercher M.C. Jasmonate- and salicylate-mediated plant defense responses to insect herbivores, pathogens and parasitic plants // *Pest.Manag.Sci.* – 2009. – Vol. 65. – P. 497-503.

50 Srivastava S., Rahman M.H., Shah S., Kav N.N.V. Constitutive expression of the pea ABA-responsive 17 (ABR17) cDNA confers multiple stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* / // *Plant Biotechnology Journal*. – 2006. – Vol. 4. – P. 529–549.

51 Valitova J.N., Minibayeva F.V., Kotlova E.R., Novikov A.V., Shavarda A.L., Murtazina L.I., Ryzhkina I.S. (2011) Glycoceramide composition following sterol depletion in wheat roots . *Phytochemistry*, 72: 1751–1759.

52 Van Loon L.C. , van Kammen A. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. ‘Samsun’ and ‘SamsunNN’.

II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus // Virology. – 1970. – Vol. 40. – P. 199–211.

53 Wang W., Vignany R., Scali M., Cresti M. A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis // Electrophoresis. – 2005. – Vol. 27. – P. 2782-2786.

54 Wang Z.-Y., Wang Q., Chong K., Wang F, Wang L, Bai M, Jia C. (2006) The brassinosteroid signal transduction pathway. Cell Research, 16(5): 427–434.

55 Watson B.S., Asirvatham V.S., Wang L. Mapping the proteome of barrel medic (*Medicago truncatula*) // Plant Physiol. – 2003. – Vol. 131. – P. 1104-1123.

56 Wyman A.J., C.F. Yocum. Structure and activity of the photosystem II manganese-stabilizing protein: role of the conserved disulfide bond // Photosynthesis Research. – 2005. – Vol. 85. – P. 359-372.