

УДК 632.656:581.1

**ЭКСПРЕССИЯ R-ГЕНОВ ПРИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ И ИНДУЦИРОВАННОЙ
УСТОЙЧИВОСТИ КАРТОФЕЛЯ К ЦИСТООБРАЗУЮЩЕЙ НЕМАТОДЕ
Globodera rostochiensis (Wollenweber, 1923) Behrens, 1975**

© 2015 г. В. В. Лаврова, Е. М. Матвеева, С. В. Зиновьева

Представлено академиком РАН Д.С. Павловым 03.04.2015 г.

Поступило 03.04.2015 г.

Проведено исследование особенностей экспрессии двух генов — *H1* и *Gro1-4*, определяющих устойчивость картофеля к седентарной паразитической нематоде *Globodera rostochiensis* (Wollenweber, 1923), Behrens, 1975 в устойчивом (“Крепыш”) и восприимчивом (“Невский”) сортах при краткосрочном воздействии низких температур. Такая обработка восприимчивых растений на ранних этапах онтогенеза индуцировала экспрессию генов *H1* и *Gro1-4* в корнях и гена *H1* в листьях. Выявлено наличие транскрипционной активности *R*-генов не только в корнях, но и в листьях — ткани, удаленной от места непосредственного поражения нематодой, как при генетической, так и индуцированной устойчивости, что свидетельствует о развитии системной защитной реакции растений в ответ на заражение.

DOI: 10.7868/S0869565215260242

Характер взаимоотношений фитопаразитических нематод с растением-хозяином (развитие заболевания как проявление совместимых взаимоотношений или реакция устойчивости при наличии несовместимых отношений партнеров) во многом определяется способностью растительного организма быстро и специфично изменять активность генов, связанных с развитием защитных реакций в ответ на заражение. Иммунный ответ растения на контакт с нематодой начинается с реакции “узнавания” паразита [1]. Основная роль в этом процессе отводится генам устойчивости — *R*-генам (resistance), кодирующим рецепторные белки, распознающие эффекторы, секретируемые личинками нематод на этапе их внедрения в корни. Это обеспечивает межклеточное узнавание партнеров и индукцию адекватной системы защиты [2, 3], что наблюдается у растений, обладающих генетической устойчивостью, быстро реагирующих на нематодную инвазию [4]. У восприимчивых растений *R*-гены либо отсутствуют, либо находятся в неактивном состоянии, и при внедрении нематоды защитные реакции хозяина

не включаются или запускаются слишком поздно [5, 6].

Наряду с медирированной устойчивостью, контролируемой *R*-генами, существует индуцированная устойчивость (ИУ), которая активизируется под влиянием метаболитов фитопатогенов, а также различных факторов биотической и абиотической природы и отражает адаптивный потенциал организма. Ранее проведенные нами исследования на модельной системе “томаты—галловая нематода *Meloidogyne incognita*” показали, что при ИУ, вызванной элиситорами биогенной природы (хитозаном, салициловой и жасмоновой кислотами), в растениях активизируются те же защитные механизмы, которые действуют при генетически детерминированной устойчивости, но в отличие от последней, степень защиты, как правило, не превышает 30% [7].

Перспективным подходом к формированию ИУ восприимчивых растений к биотическому стрессу является воздействие на защитный потенциал растений часто встречающихся в природе кратковременных температурных флуктуаций [8]. При этом изменение экспрессии *R*-генов при генетической и индуцированной устойчивости к фитонематоде до сих пор остается малоисследованным. Выяснение роли изменений экспрессии *R*-генов в начальный период заражения в механизме нематодоустойчивости растений явилось целью настоящего исследования.

Эксперименты проводили на устойчивом (сорт “Крепыш”) и восприимчивом (сорт “Нев-

Институт биологии Карельского научного центра
Российской Академии наук, Петрозаводск

E-mail: vvlavrova@mail.ru; matveeva@krc.karelia.ru

Институт проблем экологии и эволюции

им. А.Н. Северцова Российской Академии наук, Москва

E-mail: zinovievas@mail.ru

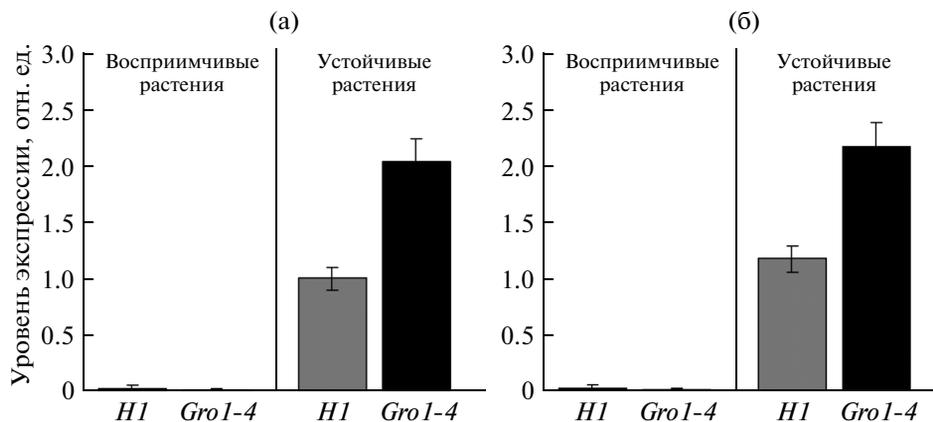


Рис. 1. Экспрессия генов *H1* и *Gro1-4* в корнях (а) и листьях (б) восприимчивых и устойчивых к нематоду растений на ранней стадии онтогенеза. Здесь и на рис. 2 уровень экспрессии генов рассчитан как отношение к уровню актина, принятого за единицу; $M \pm m$, $n = 10$.

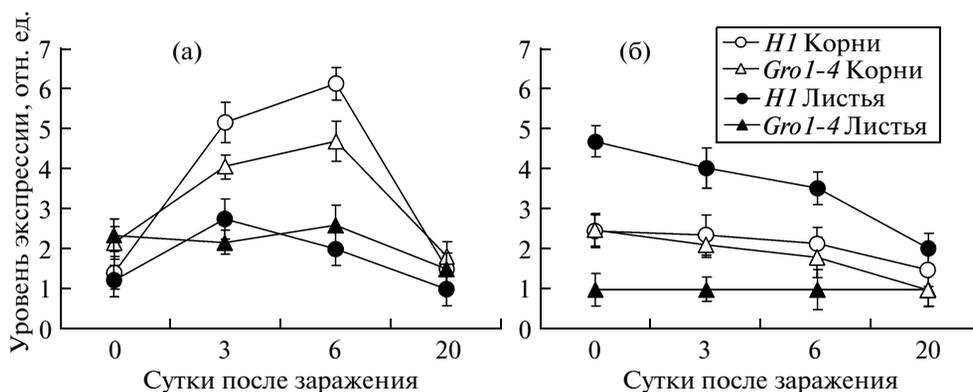


Рис. 2. Изменения экспрессии генов *H1* и *Gro1-4* в корнях и листьях инвазированных растений при генетической устойчивости (а) и устойчивости, индуцированной низкотемпературной обработкой растений на ранних стадиях заражения (б).

ский”) к нематоду растениях, которые выращивали в камере искусственного климата при фотопериоде 16/8 ч, температуре 20–23°C и освещенности 10 клк. Двухнедельные растения заражали узкоспециализированным корневым эндопаразитом – *Globodera rostochiensis* Wollenweber, 1923, Behrens, 1975 (патотип Ro1, доза заражения 10 цист/растение). В качестве индуктора устойчивости картофеля к фитонематоду применяли низкотемпературную обработку восприимчивых растений на ранних этапах онтогенеза до момента заражения по схеме: ежесуточное снижение температуры в течение 6 сут с 23 до 5°C на 2 ч в конце ночного периода. Материал для исследования (корни и листья) отбирали сразу после завершения температурных обработок (“нулевые” сутки) и в периоды проникновения, питания и развития личинок нематоды (3-и, 6-е и 20-е сутки после заражения).

Устойчивость картофеля к нематоду опосредована двумя *R*-генами – *H1* и *Gro1-4* [9, 10]. Наличие генов в генотипе картофеля анализировали

методом аллельспецифической ПЦР. Транскрипционную активность *R*-генов оценивали методом ПЦР в режиме реального времени. В качестве флуорофора для детекции продуктов применяли интеркалирующий краситель SYBR Green. В качестве референсного гена использовали актин.

Эксперимент проведен на оборудовании ЦКП ИБ КарНЦ РАН. При статистической обработке полученных экспериментальных данных использовали пакет программ Statgraphics для Windows 7.0. Результаты представляли в виде $M \pm m$. Достоверными считали различия при $p \leq 0.05$.

Результаты исследования показали, что у устойчивых растений на ранних этапах онтогенеза гены *H1* и *Gro1-4* экспрессируются на низком уровне как в корнях, так и в листьях (рис. 1а, 1б). При проникновении личинок нематоды в корни растений активность *R*-генов повышается и достигает максимальных значений к 6-м суткам заражения, после чего возвращается к исходному уровню (рис. 2а). Динамика изменения экспрес-

сии генов *H1* и *Gro1-4* сходна. Подобная ситуация отмечена и для листьев, но выражена менее ярко (рис. 2а).

Аллельспецифический ПЦР-анализ показал наличие в генотипе восприимчивых растений генов *H1* и *Gro1-4*. Однако анализ содержания мРНК в корнях и листьях свидетельствует о неактивном состоянии этих генов на ранних этапах онтогенеза (рис. 1а, 1б) и в течение всего периода заражения. Низкотемпературная обработка восприимчивых растений на ранних этапах онтогенеза индуцировала экспрессию генов *H1* и *Gro1-4* в корнях и гена *H1* в листьях. При заражении таких растений высокий уровень экспрессии *R*-генов сохранялся вплоть до 6-х суток и затем постепенно снижался до исходного уровня во всех исследуемых тканях (рис. 2б).

Специфичность паразитарной системы “картофель–нематода” проявляется в том, что *G. rostochiensis* является седентарным эндопаразитом корневой системы растений. При паразитировании нематода секретирует в растительную ткань различные соединения, обеспечивающие проникновение и формирование синцития для дальнейшего питания и развития личинок. При этом корни приобретают для фитогельминта статус биотопа [11]. Растения с генетической устойчивостью к нематоду обладают активными *R*-генами до момента заражения и в начальный период инвазии, когда личинки проявляют наибольшую ферментативную активность. Индуцированная низкотемпературным воздействием устойчивость опосредована активацией системы защиты восприимчивых к нематоду растений. Такие растения уже экспрессируют *R*-гены и способны обнаружить атаку паразита, распознать ферменты личинок нематоды при их проникновении в организм растения и, соответственно, быстро и своевременно запустить каскад защитных реакций.

Полученные данные выявили также наличие транскрипционной активности *R*-генов не только в корнях — местах внедрения нематод, но и в листьях — ткани, удаленной от места непосред-

ственного поражения как при генетической, так и индуцированной устойчивости. Это свидетельствует о развитии системной защитной реакции растений на заражение.

Таким образом, исследование экспрессии *R*-генов, определяющих характер взаимоотношений паразита и растения-хозяина, позволило установить, что низкотемпературная обработка растений на ранних стадиях онтогенеза обеспечивает их подготовку к последующим стрессовым условиям и тем самым способствует развитию ИУ к фитопаразитической нематоду по механизмам, схожим с генетической устойчивостью.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№ 14–34–50851-мол_нр и 15–04–04625_а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yang Y., Shah J., Klessig D.F. // Genes Develop. 1997. V. 11. P. 1621–1639.
2. Hammond-Kosack K.E., Jones J.D.G. // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1997. V. 48. P. 575–607.
3. Gururani M.A., Venkatesh J., Upadhyaya C.P., Nookaraju A., Pandey S.K., Park S.W. // Physiol. and Mol. Plant Pathol. 2012. V. 78. P. 51–65.
4. Bonas U., Lahaye T. // Current Opinion Microbiol. 2002. V. 5. P. 44–50.
5. Hammond-Kosack K.E., Kanyuka K. Encyclopedia of Life Sciences. N.Y.: Wiley, 2007. P. 1–21.
6. Giebel J. // J. Nematol. 1974. V. 6. № 4. P. 175–184.
7. Зиновьева С.В., Васюкова Н.И., Удалова Ж.В., Герасимова Н.Г. // Изв. РАН. Сер. биол. 2013. № 3. С. 332–340.
8. Сысоева М.И., Лаурова В.В., Матвеева Е.М., Шерудило Е.Г., Тончиева Л.В. // Физиология растений. 2011. Т. 58. № 6. С. 853–858.
9. Skupinova S., Vejl P., Sedlak P., Domkarova J. // Ros-tlinna Vyroba. 2002. V. 48. P. 480–485.
10. Gebhardt C., Bellin D., Henselewski H., Lehmann W., Schwarzfischer J., Valkonen J.P.T. // Theor. Appl. Genet. 2006. V. 112. P. 1458–1464.
11. Иешко Е.П., Матвеева Е.М., Груздева Л.И. // Паразитология. 1999. Т. 33. В. 4. С. 340–349.