

УДК 632.656:581.1

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ *Mi-1* В РАСТЕНИЯХ ТОМАТА ПРИ ЗАРАЖЕНИИ ГАЛЛОВОЙ НЕМАТОДОЙ И ОБРАБОТКЕ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТОЙ

© 2016 г. В. В. Лаврова¹, Ж. В. Удалова², Е. М. Матвеева¹,
Ф. К. Хасанов^{2,3}, С. В. Зиновьева^{2,*}

Представлено академиком РАН Д.С. Павловым 30.06.2016 г.
Поступило 01.07.2016 г.

Исследовали динамику экспрессии двух гомологичных генов *Mi-1.1* и *Mi-1.2* в корнях устойчивых и восприимчивых растений томата в норме и при заражении галловой нематодой *M. incognita*. Заражение сопровождалось значительным повышением уровня экспрессии обоих генов, однако накопление транскриптов на ранних этапах заражения в период проникновения личинок нематоды в корни происходило только у растений, содержащих ген *Mi-1.2*, что объясняет причину устойчивости томатов к галловой нематоды, обусловленной только этим геном. Выявили изменение активности генов *Mi-1* при действии экзогенной салициловой кислоты, которое способствовало формированию индуцированной устойчивости к галловой нематоды у восприимчивых растений.

DOI: 10.7868/S0869565216330264

Важную роль во взаимоотношениях растений и фитопатогенов играют гены устойчивости (R-гены, от англ. resistance genes). Наиболее распространенными генами устойчивости растений к фитопатогенам являются гены класса NBS-LRR, которые кодируют белки, характеризующиеся наличием сайта связывания нуклеотидов (NBS) и области, обогащенной лейцином (LRR) [1, 2]. Такие белки распознают продукты комплементарных генов авирулентности фитопатогенных организмов внутри клетки растения и участвуют в активации защитных реакций по типу реакции сверхчувствительности [3]. К классу генов NBS-LRR относится ген *Mi-1*, который обеспечивает устойчивость растений томата к ряду вредителей: галловым нематодам рода *Meloidogyne* (*M. arenaria*, *M. incognita*, *M. javanica*) [4], картофельной тле и белокрылкам [5]. Данный ген введен в культурные растения томата *Solanum lycopersicum* L. из дикого вида *Solanum peruvianum* [6] и до сих пор является единственным источником устойчивости к галловой нематоды *M. incognita* в современных сортах. К настоящему времени известны два го-

молога гена устойчивости *Mi-1* – *Mi-1.1* и *Mi-1.2*. Несмотря на гомологию аминокислотных остатков продуктов этих генов, в экспериментах с восприимчивыми растениями, в геном которых вводили *Mi-1.1* или *Mi-1.2*, фенотипическое проявление устойчивости к нематоды (реакция сверхчувствительности) показана только в тех растениях, которые содержали ген *Mi-1.2* [7]. Причина этого до сих пор не ясна, в связи с чем необходимо более детальное исследование, в том числе выявление особенностей экспрессии генов *Mi-1.1* и *Mi-1.2* в восприимчивых и устойчивых растениях в динамике на всем протяжении развития нематод в корнях.

Одной из важнейших составляющих реакций растений на действие неблагоприятных факторов разной природы является повышение содержания в клетках сигнальных молекул, ионов, стрессовых фитогормонов и метаболитов, в частности, салициловой кислоты (СК). Салициловая кислота в настоящее время рассматривается как эндогенный полифункциональный биорегулятор фенольной природы, принимающий участие в клеточном сигналинге, ростовых процессах, формировании адаптивных реакций растений. Она широко используется в качестве индуктора системной индуцированной устойчивости растений [8]. Экзогенная СК включается в сигнальный путь и метаболизм эндогенной СК и индуцирует в растениях все типы устойчивости к биотрофным паразитам, включая реакцию сверхчувствительности и локальную устойчивость, опосредованную R-гена-

¹Институт биологии Карельского научного центра
Российской Академии наук, Петрозаводск

²Институт проблем экологии и эволюции
им. А.Н. Северцова

Российской Академии наук, Москва

³Институт биологии гена
Российской Академии наук, Москва

*E-mail: zinovievas@mail.ru

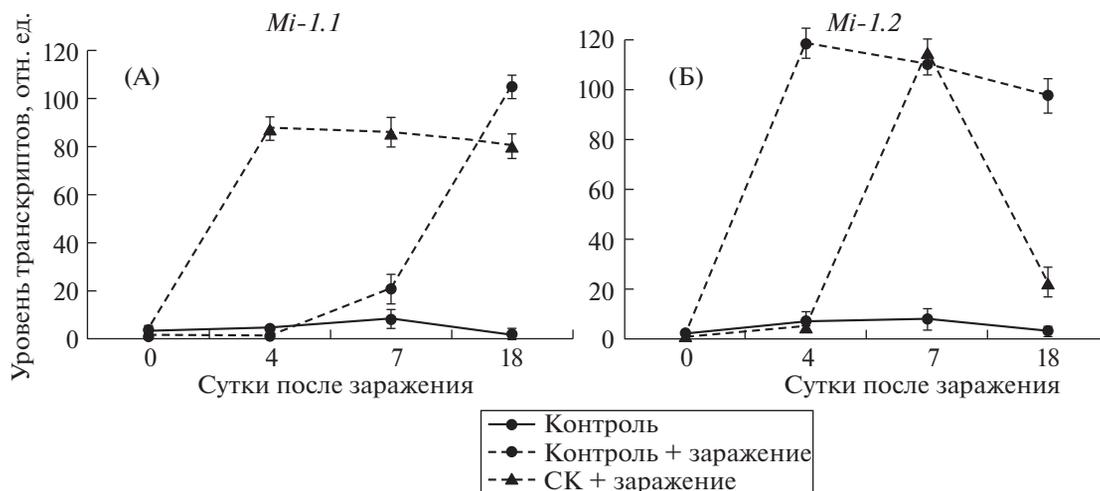


Рис. 1. Экспрессия генов *Mi-1.1* (А) и *Mi-1.2* (Б) в корнях устойчивых к нематод растений томата. Здесь и на рис. 2 уровень экспрессии генов рассчитывали относительно уровня актина, принятого за единицу, $M \pm m$, $n = 10$.

ми, в том числе *Mi*-опосредованную устойчивость к галловым нематодам [9, 10].

Известно, что СК является медиатором гена *Mi-1.2*, определяющего устойчивость томатов к галловой нематод, и является ключевой молекулой, направленной на активацию защитных механизмов при поражении томатов галловой нематодой.

Целью настоящего исследования явилось изучение экспрессии генов *Mi-1.1* и *Mi-1.2* в корнях восприимчивых и устойчивых растений в норме и при заражении галловой нематодой *M. incognita* и роли экзогенной обработки СК в модуляции транскрипционной активности этих генов в ходе развития индуцированной устойчивости.

Эксперименты проводили на гибридах томатов: восприимчивом (F1 Гамаюн) и устойчивом (F1 Шагане) к нематод. Семена перед посадкой выдерживали два часа в воде (контроль) или растворе СК. Через три недели после прорастания часть растений заражали нематодой (3000 личинок на растение). Заражение растений и их выращивание проводили по стандартным методикам [11]. Сбор растительного материала (корни) для анализа проводили на нескольких этапах развития нематоды: три часа после экзогенной обработки листьев здоровых растений СК; на 4, 7 и 18-е сут после заражения – период, охватывающий этапы проникновения личинок в корни растения-хозяина, формирования области питания (“гигантские клетки”), активного питания и развития нематоды. Транскрипционную активность генов оценивали методом ПЦР в режиме реального времени. В качестве флуорофора для детекции продуктов использовали интеркалирующий краситель SYBR Green, в качестве референсного гена – актин.

Эксперименты проводили с использованием оборудования ЦКП ИБ КарНЦ РАН. Данные обрабатывали статистически с помощью пакета программ Statgraphics for Windows 7.0. Достоверными считали различия при $p < 0.05$.

Результаты исследования показали, что в корнях здоровых растений томата, устойчивых и восприимчивых к нематод, гены *Mi-1.1* и *Mi-1.2* экспрессируются на низком уровне (рис. 1, 2). Однако динамика их экспрессии при заражении устойчивых и восприимчивых растений различалась. В период проникновения личинок нематоды в корни устойчивого растения, формирования “гигантских клеток” и по мере питания и развития прижившихся личинок мы наблюдали повышение активности гена *Mi-1.1* с максимальным уровнем экспрессии к 18-м сут (рис. 1, А) и гена *Mi-1.2* с максимумом на 4-е сут с сохранением активности гена вплоть до 18-х сут (рис. 1, Б). Анализ содержания мРНК генов *Mi-1.1* и *Mi-1.2* в корнях восприимчивых растений при заражении показал отсутствие накопления транскриптов, что свидетельствует о низкой активности генов на всех этапах становления и развития отношений в системе растение–нематода (рис. 2, А, Б).

Экзогенная обработка томата СК не оказала существенного влияния на экспрессию генов *Mi-1.1* и *Mi-1.2* в корнях до инвазии и вызвала изменения их активности при последующем заражении. Так, в корнях обработанных СК устойчивых растений сохраняется тенденция к повышению экспрессии гена *Mi-1.1* со смещением максимального уровня его экспрессии к 4-м сут (рис. 1, А) и экспрессии гена *Mi-1.2* со смещением экспрессии к 7-м сут после заражения (рис. 1, Б). Для обработанных СК восприимчивых растений при заражении отмечено значительное повышение содержа-

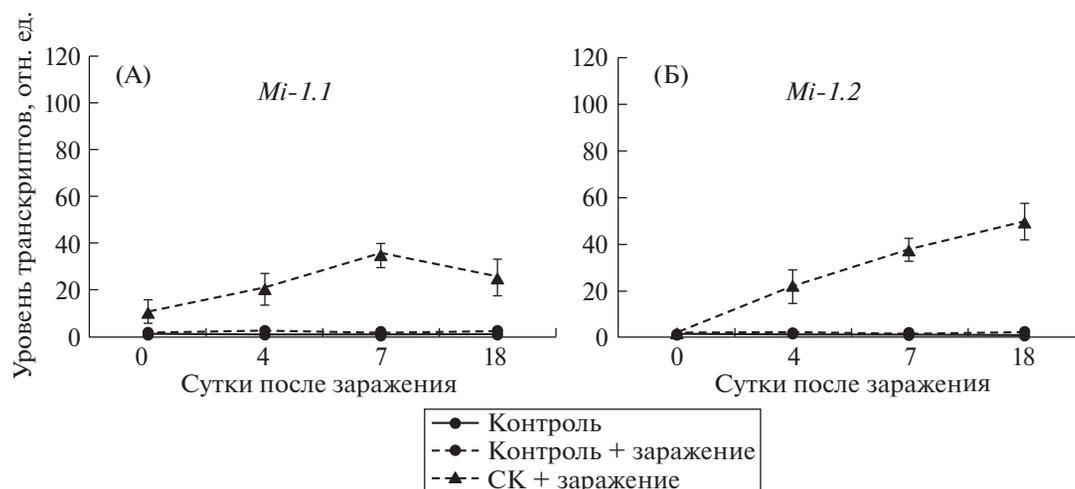


Рис. 2. Экспрессия генов *Mi-1.1* (А) и *Mi-1.2* (Б) в корнях восприимчивых к нематоду растений томата.

ния транскриптов как гена *Mi-1.1*, так и *Mi-1.2* в период проникновения и развития личинок нематоды в корнях (рис. 2, А, Б).

Первичные результаты, полученные в ходе проведенного нами исследования динамики активности генов *Mi-1*, позволяют высказать предположение о причине устойчивости томатов к галловой нематоду, связанной исключительно с геном *Mi-1.2*. Проведенные исследования показали, что в корнях устойчивых растений томата гены *Mi-1.1* и *Mi-1.2* находятся в активном состоянии и экспрессируются на низком уровне в условиях отсутствия инвазии. Заражение растений галловой нематодой *M. incognita* сопровождается значительным повышением уровня экспрессии этих генов, но в разные сроки после заражения растений. Продукты генов устойчивости являются необходимыми в начальный период становления отношений в системе паразит–хозяин на этапе проникновения личинок в корни и формирования области питания так называемых “гигантских клеток”, что позволяет распознать внедрение и локально ограничить распространение нематоды за счет активации сигналинга, направленного на запуск реакции сверхчувствительности. Усиление накопления транскриптов гена *Mi-1.2* на 4-е сут после заражения в период проникновения личинок нематоды в корни позволяет своевременно активировать защитные реакции. В то же время образование мРНК гена *Mi-1.1* происходит на более поздних этапах заражения (18-е сут), когда прижившиеся личинки уже активно питаются, развиваются и способны подавлять иммунные реакции хозяина. В этот период продукт гена *Mi-1.1* не востребован. Выявленные различия в динамике накопления транскриптов генов *Mi-1.1* и *Mi-1.2* могут являться од-

ной из причин устойчивости томатов к галловой нематоду за счет гена *Mi-1.2*.

В здоровых восприимчивых растениях уровень экспрессии генов *Mi-1.1* и *Mi-1.2* гораздо ниже, чем у устойчивых растений. Кроме того, при заражении таких растений галловой нематодой не происходит каких-либо изменений активности этих генов, т.е. отсутствует накопление транскриптов на этапе становления отношений паразит–хозяин (при проникновении личинок и начальных этапах развития нематоды). В этом случае не происходит развития своевременной защитной реакции, и нематода может проникнуть в корни томатов.

Экзогенная обработка устойчивых растений СК до момента заражения модулирует активность гена *Mi-1.1* таким образом, что динамика его экспрессии становится схожей с таковой гена *Mi-1.2* при заражении нематодой (в варианте без обработки СК).

В обработанных СК восприимчивых растениях после инвазии отмечено повышение уровня экспрессии генов *Mi-1.1* и *Mi-1.2* уже на ранних этапах заражения растений нематодой. Это дает возможность восприимчивым растениям своевременно и адекватно реагировать на заражение активацией сигнальных и защитных систем, как это наблюдалось в устойчивых растениях. Поскольку наряду с экспрессией гена *Mi-1.2* на ранних этапах после заражения при обработке растений СК повышается активность и гена *Mi-1.1*, можно предположить участие *Mi-1.1* в формировании индуцированной устойчивости растений к нематоду.

Таким образом, исследование динамики экспрессии генов *Mi-1.1* и *Mi-1.2* в корнях устойчивых и восприимчивых растений томата в норме и при заражении позволило выявить роль гена *Mi-1.2*

в развитии устойчивости томатов к *M. incognita* за счет повышенного накопления транскриптов на этапе становления отношений паразит–хозяин. При действии экзогенной СК мы выявили модуляцию активности генов *Mi-1*, что доказывает участие СК в формировании индуцированной устойчивости к галловой нематоды у восприимчивых растений.

Учитывая современные данные о существовании общих механизмов устойчивости у растений при действии стресс-факторов разной природы [12, 13], а также стресс-протекторных функциях СК и ее роли в трансдукции сигнала на геном [14], полученные результаты об экспрессии генов устойчивости растений томатов при действии СК могут представлять интерес с точки зрения повышения устойчивости растений томатов не только к *M. incognita*, но и другим паразитам или даже абиотическим факторам по принципу кросс-адаптации.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 15–04–04625_а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шамрай С.Н. // Журн. общ. биологии. 2003. Т. 64. № 3. С. 195–214.
2. Takken F.L.W., Albrecht M., Tameling W.I.L. // Curr. Opin. Plant Biol. 2006. V. 9. P. 383–390.
3. Williamson V.M., Kumar A. // Trends Genet. 2006. V. 22. P. 396–340.
4. Messeguer R., Ganai M., de Vicente M.C., Young N.D., Bolkan H., Tanksley S.D. // Theoretical Applied Genetics. 1991. V. 82. P. 529–536.
5. Nombela G., Williamson V.M., Muñiz M. // Mol. Plant Microbe Interact. 2003. V. 16. № 7. P. 645–649.
6. Smith P.G. // Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 1944. V. 44. P. 413–417.
7. Milligan S.B., Bodeau J., Yaghoobi J., Kaloshian I., Zabel P., Williamson V.M. // The Plant Cell. 1998. V. 10. P. 1307–1319.
8. Branch C., Hwang C.F., Navarre D.A., Williamson V.M. // Mol. Plant–Microbe Interact. 2004. V. 17. P. 351–356.
9. Molinari S., Fanelli E., Leonetti P. // Mol. Plant Pathol. 2014. V. 15. P. 255–264.
10. Зиновьева С.В., Васюкова Н.И., Удалова Ж.В., Герасимова Н.Г. // Изв. РАН. Сер. биол. 2013. № 3. С. 332–340.
11. Zinovieva S.V., Ozeretskoykaya O.L., Iliinskaya L.I., Yasyukiva N.I., et al. // Rus. J. Nematol. 1995. V. 3. № 1. С. 65–67.
12. Кузнецов В.В. // Вестн. Нижегород. ун-та им. Н.И. Лобачевского. Сер. Биология. 2001. № 1. С. 65. http://e-library/vestnik/9999-0191_west_bio.
13. Деревинская А.А., Деревинский А.В. // Актуальныя пытанні Сучаснай Навукі. Мінск. 2015. С. 263–267.
14. Тарчевский И.А. Сигнальные системы клеток растений. М.: Наука, 2002. 294 с.