

УДК 577.21

ЧЖАН ЯНЬ (КНР), Е.А. НИКОЛАЙЧИК, М.А. СТАДНИЧЕНКО, В.Д. ПОЛИКСЕНОВА

### АНАЛИЗ ДЕЙСТВИЯ ХАРПИНОВ НА РАСТЕНИЯ ТОМАТА

We have studied the influence of three harpin proteins secreted by *Pectobacterium carotovorum* and *Erwinia amylovora* on *PR* gene expression and pathogen resistance of tomato (*Solanum lycopersicum*) plants. In harpin treated plants expression of *PR-1* and *PR-2* genes appeared to be induced while expression of the *PR-6* gene was repressed. Harpin treatment increased resistance of tomato plants to biotrophic pathogens *Cladosporium fulvum* and *Phytophthora infestans*, but had no effect on their susceptibility to necrotrophic pathogens *Botrytis cinerea* and *Alternaria solani*.

Устойчивость к возбудителям заболеваний входит в число основных требований к сортам растений и технологиям их возделывания. Однако для многих сельскохозяйственных культур длительная устойчивость к комплексу патогенов за счет селекции до сих пор не достигнута, поэтому с целью получения удовлетворительной урожайности приходится использовать химические средства защиты. Во всем мире ведутся интенсивные исследования, направленные на отказ от биоцидов и переход к методам защиты, максимально активизирующим естественный иммунный потенциал и защитные реакции растений. Индукторами устойчивости может выступать широкий круг веществ абиогенной и биогенной природы, однако особый интерес представляют вырабатываемые самими патогенами.

Фитопатогенные организмы для успешного заражения растений секретируют за пределы своих клеток целый ряд веществ, в том числе и белковой природы. Значительная часть этих белков остается в апопласте растительных тканей, но некоторые могут быть доставлены и непосредственно в клетки растений. Функции секретируемых фитопатогенами белков связаны в основном с разрушением клетки растения или с инактивацией ее защитных систем. Однако эти белки могут распознаваться клеткой растения, в результате чего происходит запуск защитных реакций, противодействующих распространению патогена. Специфическое распознавание белков патогена осуществляют мембранные или цитоплазматические рецепторные киназы клеток растения, активирующие соответствующие сигнальные каскады, что в конечном итоге приводит к развитию характерных реакций, препятствующих дальнейшему распространению патогена. К числу таких реакций можно отнести отложение лигнина

и каллозы в клеточной стенке, синтез различных антимикробных соединений, в том числе патогениндуцируемых белков (PR-proteins), а также активных форм кислорода [1]. При попытке патогена колонизировать устойчивое к нему растение защитные реакции последнего развиваются особенно быстро и приводят к стремительной гибели клеток растения в месте контакта с патогеном – реакции гиперчувствительности (РГ). РГ обычно сопровождается развитием системных защитных реакций в частях растения, не контактировавших с патогеном (системной приобретенной устойчивостью – СПР), что делает растение значительно более устойчивым к последующим атакам патогенов.

Харпины – класс внеклеточных хелперных белков секреторной системы III типа (ССТТ) фитопатогенных бактерий – изначально были охарактеризованы именно как белки, индуцирующие защитные реакции растений, в первую очередь РГ [2]. Это глицинбогатые, не содержащие остатков цистеина термостабильные белки, способные вызывать РГ при введении в относительно высоких концентрациях (более 100 мкг/мл) в апопласт *Nicotiana tabacum* и некоторых других растений. Харпины обнаружены у всех фитопатогенных бактерий, обладающих ССТТ. Некоторые фитопатогены синтезируют несколько харпинов, существенно отличающихся первичной последовательностью и структурой. У *Erwinia amylovora* идентифицированы HrpN и HrpW, у *Pseudomonas syringae* – HrpZ, HrpW, HrpPtoP и HrpPmaH [3].

Некоторые харпины обладают способностью активировать системную устойчивость у обработанных растений, что в перспективе может привести к созданию препаратов биологической защиты от фитопатогенных микроорганизмов. Наиболее изученным в этом плане является описанный первым харпин из *Erwinia amylovora* (HrpN<sub>Еа</sub>) [4–7]. Введение очищенных препаратов харпинов в апопласт листьев растений способно вызвать реакцию, сходную с РГ. Более того, такая инъекция в один лист растения делала все его органы устойчивыми к последующей атаке патогена, т. е. запускала механизм СПР [7, 8].

До недавнего времени эти исследования представляли чисто теоретический интерес из-за трудности индукции защитных реакций путем инъекций харпинов; кроме того, в этих экспериментах использовались очень высокие (в тысячи раз превышающие физиологические) концентрации харпинов. Ситуация принципиально изменилась после опубликования исследования [9], показавшего неожиданную эффективность HrpN<sub>Еа</sub>, примененного в низких концентрациях (15 мг/л) просто для опрыскивания растений *Arabidopsis thaliana*. Несмотря на очевидную невозможность экзогенного харпина контактировать с теми же рецепторами, что и при его естественном (при помощи системы секреции III типа бактериального патогена) или искусственном введении в апопласт листа, использованный «наружно» харпин репрессировал жасмонатный, но индуцировал салицилатный и этиленовый сигнальные пути, причем активация последнего оказалась существенной для индукции устойчивости к насекомым и стимуляции роста растений. Однако полученные результаты никак нельзя экстраполировать на другие растения (и другие гены харпинов), поскольку а) компоненты сигнальных путей, ведущих к индукции РГ, и спектр PR-белков существенно различаются у семейств *Cruciferae* и *Solanaceae* и б) сходство аминокислотных последовательностей харпинов (даже с одинаковым названием) различных видов бактерий минимально, а между такими харпинами, как HrpN, HrpZ, HrpA и HrpG, стандартными методами вообще не детектируется.

У бактерии *Pectobacterium carotovorum* 3-2 ранее были охарактеризованы два харпина – HrpN и HrpW [10, 11]. Инъекция частично очищенных препаратов обоих белков в листья растений табака вызывала индукцию РГ, что свидетельствует о способности этих белков активизировать защитные реакции растения аналогично «классическому» харпину HrpN<sub>Еа</sub>. В этой связи представлялось интересным определить способность этих белков индуцировать защитные реакции при экзогенном применении и сравнить их действие на защитные реакции растений и их устойчивость к патогенам с таковым харпина HrpN<sub>Еа</sub>. Непосредственным объектом в настоящей работе являлись растения томата (*Solanum lycopersicum* L.) – важнейшей сельскохозяйственной культуры и общепризнанного модельного объекта для исследования взаимодействий в патосистеме, для которой информация о действии харпинов минимальна.

#### Материал и методика

Нами были использованы растения томата сорта Доходный, восприимчивого ко всем биотипам основных патогенов. Растения выращивали в условиях 16-часового светового дня при 23 °С без пересадки до фазы формирования 3–4 настоящих листьев.

Для получения препаратов харпинов их гены были введены в клетки штамма *Escherichia coli* BL-21(DE3) RIPL в составе сконструированных нами ранее плазмид рZH437, рLA128 и рLA15 [10, 11]. Бактерии выращивали с интенсивной аэрацией в 50 мл бульона LB с соответствующим антибиотиком при 37 °С до логарифмической стадии (ОП<sub>600</sub>=0,5), после чего синтез харпинов был индуцирован добавлением ИПТГ до 0,5 мМ и инкубация продолжена в течение еще 3 ч. Для получения контрольных

препаратов термостабильных белков аналогичным образом выращивали клетки того же штамма, но содержащие векторные плазмиды без клонированных в них генов харпинов. Оптическую плотность культур уравнивали, одинаковые объемы клеток осаждали центрифугированием, осадок ресуспендировали в 1 мл буфера (25мМ Tris, 1мМ EDTA, 0,5мМ PMSF). Суспензию кипятили на водяной бане в течение 10 мин для разрушения клеток и денатурации клеточных белков; денатурированные белки и обломки клеток удаляли из препаратов харпинов центрифугированием. Полученные таким образом частично очищенные препараты харпинов хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Концентрацию белков в полученных препаратах определяли по методу Брэдфорд, а их чистоту – ДСН-ПААГ-электрофорезом.

Четырехнедельные растения томата опрыскивали растворами харпинов в 5 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,65) с 0,01 % Tween 20 в концентрациях 5, 15 и 45 мкг/мл (4 растения для каждой концентрации). В качестве контрольных использовали растения, обработанные буфером или экстрактами термостабильных белков, концентрацию которых для обработки пересчитывали по оптической плотности исходных культур *E. coli* таким образом, чтобы она соответствовала максимальному содержанию этих белков в используемых в том же эксперименте препаратах харпинов.

Фрагменты листьев массой примерно  $100\pm 150$  мг для выделения РНК отбирали через 1 и 3 дня после обработки, помещали в полипропиленовые пробирки, быстро замораживали в жидком азоте и хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$ . РНК из отобранных образцов листьев томата выделяли горячим фенолом, как описано в [12]; кДНК готовили с помощью обратной транскриптазы М-MLV (Promega) по протоколу изготовителя фермента.

Количество полученной кДНК определяли методом количественной ПЦР (кПЦР) с интеркалирующим красителем SYBR Green или в дуплексных реакциях с гидролизными пробами. В качестве референсного гена использовали *EF1 $\alpha$* . Олигонуклеотидные праймеры и гидролизные пробы представлены в табл. 1. Реакции осуществляли в буфере при концентрации дезоксинуклеотидтрифосфатов 0,1 или 0,2 мМ и ионов магния 1,5 или 5 мМ при детекции продуктов с интеркалирующим красителем или с гидролизными пробами соответственно. Для реакций с SYBR Green специфичность амплификации контролировали по кривым плавления. Каждая реакция содержала праймеры для амплификации как исследуемого, так и референсного генов (в концентрациях 0,1 мкМ), а также гидролизные зонды для каждого гена. Концентрацию гидролизных зондов оптимизировали в пределах  $0,05\pm 0,4$  мкМ для каждой пары генов с целью получения одинакового уровня сигнала. Все реагенты для кПЦР, использованные в работе (гидролизные зонды, праймеры, дезоксинуклеотиды, Taq-полимераза и буферы), произведены компанией «Праймтех». Каждая реакция состояла из 45 циклов по две стадии в каждом (10 с при  $94^{\circ}\text{C}$  и 1 мин при  $60^{\circ}\text{C}$ ).

Таблица 1

## Олигонуклеотиды

Параметры	Нуклеотидная последовательность (5'→3')	Код доступа к матричной последовательности
1	2	3
EF1A2f	TTGAGGCTCTTGACCAGATTAATG	BT013246
EF1A2r	GTTTCAACACGACCGACAGG	
EF1A2p	[Cy5]CCCAAGAGGCCCTCAGACAAGCCC[BHQ2]	
EF1Af	GACAACCTGAAGTCAAGTCTGTTG	BT012707
EF1Ar	CTGGGTCATCCTTGGAGTTTG	
PR1Af4	AGCCAAACTACAACCTATGGTACC	AY050221
PR1Ar5	ATGAAATGAACCACCATCCGTTG	
PR1Ap	[6FAM]TGCAACGAGCCCGACCACAACCT[BHQ1]	
PR1Bf	CGAGAGGCCAAGCTATAACTACG	M69248
PR1Br	GCAAGAAATGAACCACCATCCG	
PR1Bp	[6JOE]TGCAACGTGCCCGACCACAACCT[BHQ1]	
PR2f2	ACCTAATGTAGTGGTACAAGATGG	M80608
PR2r	TGACACAACCTATTCCTACAGATCC	
PR2p	[6JOE]CCTCCTGTTCGATCCATCGCAGCAT[BHQ1]	
PR3f	GGTGATGATACTGCGCGTAAG	Z15139
PR3r	TTTGATTGCCTTCCCTAACAACAAC	
PR3p	[6FAM]CCTCCGGCAAATGGACCATCAGCA[BHQ1]	
PR4f	GAGTAAGTATGGCTGGACTGC	U89764
PR4r	AGCTCCTGTACGTGTATTTGTC	
PR5f	ACTATCGAGGTACGCAACAATTG	AY093595
PR5r	CCATATACGTGCCATCTTAGTGC	

1	2	3
PR5Of	ACAACGTGCCATACACCGTCTG	X66416
PR5Or	CACCATCAAAGTTGCAATTCGTAC	
PR5Op	[5ROX]ACGTGCCATCTTAGTGCCCTCGG[BHQ2]	
PR6f	GGGAAAGAATATGCTCAAGTTATC	SGN-U313509*
PR6r	AATTCTCCATCATCTTCCACTG	
PR8f	TCTCAGGATTTAGCCAACAAAG	SGN-U315895*
PR8r	CTACCAGCAGAGTATTGACATG	
PR10r	TGGACCACCTTCAACAAAGTTC	Y158146
PR10f	TATGAGTCAACAACCACAATTTCCC	
PR11f	CGTTCGCAAACCTTAACTCTC	
PR11r	GCCATGATTCCATAAGCTGTTC	SGN-U322252*
HIN1f	ACTTAAACGGAGCCTATTATGGC	
HIN1r	GAGTGAAGATTATTTGGCAAATGC	BT013168
HSR203f	GTAATGATAGTTTCGGTTGATAAGC	AB022689
HSR203r	AGAGGTAGGAAGACGGAAAC	
HSR515f	TTTAAACCTTATGGGTTCCCTTC	BT012820
HSR515r	CATGGTTTTGAGGAAAATTTGGC	
HSR515p	[6FAM]CCGATCCATCCACGATCTCTCCGC[BHQ1]	

Примечание. В связи с отсутствием на момент дизайна праймеров последовательностей *PR-6*, *PR-8* и *PR-11* в базе данных GeneBank использованы последовательности унигенов (мРНК) геномного проекта томата ([www.sgn.cornell.edu](http://www.sgn.cornell.edu)).

Реакции осуществляли в амплификаторе PTC200, флуоресценция продуктов регистрировалась детектором Chromo 4. Уровень экспрессии генов томата рассчитывали по формулам

$$\Delta Ct = Ct(EF1\alpha) - Ct(PR\text{-ген}),$$

$$N = 2^{(\Delta Ct - \Delta Ct_{\min})}$$

где  $\Delta Ct$  – разница порогового цикла амплификации гена *EF1\alpha* и *PR*-гена,  $\Delta Ct_{\min}$  – минимальное значение  $\Delta Ct$  в эксперименте,  $N$  – количество копий мРНК.

Тестирование эффективности харпинов в качестве экзогенных индукторов устойчивости проводили путем опрыскивания ими семян томата в фазе 3–4 листьев (по 8 растений) и инокуляцией через сутки широко распространенными патогенами с разным типом трофности – *Botrytis cynerea* Pers., *Alternaria solani* Sor., *Cladosporium fulvum* Cooke (*Fulvia fulva* (Cooke) Ciferri) и *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Заражение осуществляли по стандартным методикам с использованием высокопатогенных биотипов [13]. Степень поражения растений учитывали в динамике (при появлении симптомов заболевания и через 3–5 дней) и оценивали по 5-балльной шкале, показатель развития болезни рассчитывали по соответствующей формуле [14].

### Результаты

Было проведено сравнительное исследование действия трех харпинов на экспрессию *PR*-генов растений томата и уровень их устойчивости к заболеваниям, вызываемым основными патогенами этой культуры.

Для получения препаратов харпинов использовались сконструированные нами ранее плазмиды с клонированными в них генами харпинов *HrpN*, *HrpW* *P. carotovorum*, а также *HrpN* *Erwinia amylovora* (далее эти харпины обозначены соответственно *HrpN<sub>pc</sub>*, *HrpW<sub>pc</sub>* и *HrpN<sub>ea</sub>*). Экспрессию всех белков осуществляли в клетках штамма BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL, поскольку предварительные эксперименты показали низкий уровень экспрессии *HrpN<sub>pc</sub>* в клетках со стандартным набором тРНК. Электрофоретический анализ выявил высокое (50–90 %) содержание харпинов в частично очищенных препаратах, однако в связи с наличием значительного количества термостабильных белков штамма-продуцента для контрольных обработок в последующих экспериментах обязательно использовался препарат термостабильных белков *E. coli*.

Для оценки влияния харпинов полученными препаратами в трех различных концентрациях, приблизительно соответствующих использованным при оценке эффекта других харпинов [9], обрабатывали растения томата, после чего определяли уровень транскрипции известных *PR*-генов, а также оценивали устойчивость растений к различным патогенам.

Первичная оценка эффективности индукции защитного ответа проводилась путем измерения методом количественной ПЦР уровней экспрессии нескольких *PR*-генов томата через 24 и 72 ч после обработки препаратами элиситоров. В качестве индикаторов индукции защитного ответа были взяты известные *PR*-гены томата, а также гомологи охарактеризованных *PR*-генов из других растений.

Индукция защитных реакций растения при контакте с патогенами (или же с препаратами продуцируемых этими патогенами элиситоров) может происходить посредством различных сигнальных путей, что в конечном итоге выражается в изменении уровней экспрессии различных *PR*-генов растения. В этой связи задачей следующего этапа исследований было выявление *PR*-генов растений томата, дифференциально экспрессирующихся в условиях наших экспериментов. Несмотря на значительное количество литературы, в которой описана индукция *PR*-генов томата при контакте с различными патогенами, этот этап работы представлял значительную сложность по целому ряду причин. Томат является культурой, для которой характерно чрезвычайное генетическое разнообразие, обусловленное регулярным использованием в селекционном процессе межвидовой гибридизации. Гены, определяющие устойчивость томата к патогенам, существенно отличаются у различных видов томата, поэтому невозможно с полной уверенностью утверждать, что определенный ген присутствует в геноме конкретного сорта, пока последовательность генома этого сорта не будет определена полностью. На настоящий момент известна лишь частичная геномная последовательность одного сорта (*MoneyMaker*), а также неполный набор последовательностей мРНК сорта *Micro-Tom*. Эта ситуация обуславливает отсутствие гарантий того, что, во-первых, определенный ген вообще присутствует у белорусского сорта *Доходный*, являвшегося основным объектом настоящей работы, а, во-вторых, даже если соответствующий ген и присутствует в геноме, нельзя с уверенностью утверждать, что отличия его последовательности от таковых для гомологичных генов, внесенных в базы данных, не будут мешать нормальной гибридизации праймеров в ходе кПЦР. В этой связи потребовался дизайн и тщательная проверка достаточно большого количества пар праймеров для детекции *PR*-генов. Показательно в этом плане, например, присутствие в базах данных трех существенно различающихся последовательностей гена *EF1 $\alpha$*  – *de facto* стандарта гомеостатического гена с постоянным уровнем экспрессии. Поскольку этот ген планировалось использовать в качестве внутреннего контроля, работоспособность соответствующих праймеров была абсолютно критичной. Первоначальная пара праймеров (на основе последовательности ВТ012707) не давала продукта амплификации с кДНК, приготовленной на образцах РНК из сорта *Доходный*, поэтому использовали другую пару (разработанную на основании последовательности ВТ013246).

Еще один фактор, существенно осложняющий работу, – наличие в базах данных по несколько в разной степени различающихся последовательностей для многих классов *PR*-генов томата. Здесь проблемой является уже другая крайность – в одном геноме может присутствовать сразу несколько генов из одного семейства, причем эти гены могут регулироваться по-разному. В таких случаях мы старались разрабатывать пары праймеров, максимально специфичные для конкретного гена, располагая их таким образом, чтобы близкородственные последовательности имели замены нуклеотидов близко к 3'-концу праймеров, наиболее критичному для их работоспособности. После проверки работоспособности праймеров, рассчитанных на амплификацию фрагментов генов из потенциально мультигенных семейств, для увеличения специфичности детекции кПЦР осуществлялась с использованием гидролизных проб. Эти пробы по возможности разрабатывались таким образом, чтобы взаимодействовать только с одним из потенциально возможных продуктов.

С учетом указанных критериев и на основании анализа доступных последовательностей были созданы пары праймеров для амплификации фрагментов *PR*-генов, а также трех хорошо охарактеризованных маркеров реакции гиперчувствительности (*HSR203J*, *HIN1* и *HSR515*). Из пятнадцати разработанных пар праймеров две (для гена *HIN1* и первая пара для гена *PR-5*) были склонны к неспецифической амплификации при низкой концентрации кДНК искомого гена и поэтому в дальнейшей работе не использовались. Надежно воспроизводимые отличия в уровне экспрессии были выявлены для пяти из тринадцати проверенных генов, экспрессия которых и была оценена более детально.

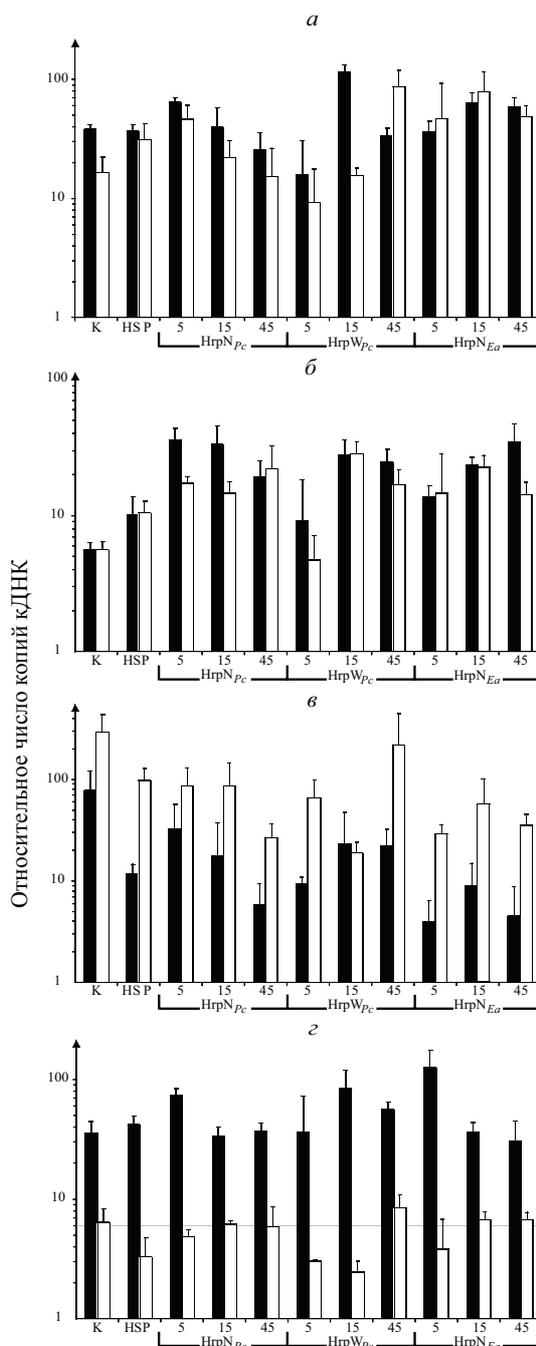
Наибольшее влияние обработка препаратами харпинов оказала на экспрессию гена *PR-2* (рис. 1 *a*). В сравнении с буферным раствором через сутки после обработки препаратами любого из трех харпинов уровень экспрессии этого гена оказался повышен в 5–7 раз. Следует также отметить, что обработка препаратом термостабильных белков сама по себе также вызывала некоторое (приблизительно двукратное) повышение уровня экспрессии *PR-2*, но значительный индуцирующий эффект обработок харпинами очевиден даже на этом фоне. Повышенное количество транскриптов *PR-2* детектировалось и через 72 ч после обработки, хотя в целом уровень экспрессии *PR-2* все же немного снижался к этому времени. Эффект концентраций препаратов несколько отличался для различных харпинов. Так, максимальная индукция *PR-2* наблюдалась при минимальной концентрации  $\text{HrpN}_{Pc}$ , средней  $\text{HrpW}_{Pc}$  и максимальной  $\text{HrpN}_{Ea}$ .

Менее значительной, но тем не менее существенной оказалась индукция генов из семейства *PR-1*. Характер экспрессии генов *PR-1a* и *PR-1b* был практически не отличим друг от друга. Максимальная разница в уровне экспрессии *PR-1* генов по сравнению с контрольными обработками не превышала трехкратной (рис. 1 б). Эффект различных концентраций препаратов в целом соответствовал таковому для *PR-2*: максимально эффективными через день после обработки оказались концентрации 5 и 15 мкг/мл для *HrpN<sub>Pc</sub>* и *HrpW<sub>Pc</sub>*, хотя для *HrpN<sub>Ea</sub>* концентрация 15 мкг/мл оказалась более эффективной.

Обработка харпинами негативно повлияла на экспрессию гена *PR-6* (рис. 1 в), однако экспрессия этого гена ингибировалась (в меньшей степени) и препаратом термостабильных белков. Максимальный эффект наблюдался через сутки после обработки: для каждого из использованных харпинов при определенных концентрациях уровень экспрессии *PR-6* снижался более чем в 10 раз. *HrpN<sub>Ea</sub>* проявлял наибольший ингибирующий эффект во всех концентрациях.

Характер экспрессии маркера гиперчувствительности *HSR515* отличался от такового для *PR*-генов прежде всего тем, что абсолютно для всех растений вне зависимости от использованного для обработки раствора на третий день эксперимента уровень экспрессии этого маркера гиперчувствительности был ниже приблизительно в пять раз (рис. 1 г). К сожалению, отсутствие образцов необработанных растений не позволяет сделать вывод о том, является ли такая разница в экспрессии результатом стресса, испытанного растениями при обработке, или реакцией растений на не учтенные в ходе эксперимента изменения условий культивирования. Тем не менее даже на фоне столь существенной разницы экспрессии данного гена в первый и третий день эксперимента эффект от обработок препаратами харпинов все-таки заметен. Так, через 24 ч после обработки уровень экспрессии ни в одном из случаев не был ниже контроля, а для четырех концентраций препаратов (5 мкг/мл *HrpN<sub>Pc</sub>*, 15 и 45 мкг/мл *HrpW<sub>Pc</sub>*, а также 5 мкг/мл *HrpN<sub>Ea</sub>*) в 2–4 раза его превышал. В то же время через 72 ч после начала эксперимента у обработанных препаратами харпинов растений не было зафиксировано существенных отличий от контрольных по уровню экспрессии *HSR515*.

Таким образом, обработка растений томата препаратами харпинов оказала определенное влияние на экспрессию *PR*-генов, т. е. на степень устойчивости растений к патогенам. Для проверки этого предположения растения томата были обработаны препаратами харпинов в концентрациях, оказавших наибольшее влияние на экспрессию *PR*-генов (5, 15 и 45 мкг/мл для *HrpN<sub>Pc</sub>*, *HrpW<sub>Pc</sub>* и *HrpN<sub>Ea</sub>* соответственно), а через сутки после обработки растения были искусственно заражены тремя грибными и одним оомицетным патогеном. В этих экспериментах не удалось выявить существенных различий между обработанными препаратами харпинов и конт-



Относительное число копий кДНК генов *PR-2* (а), *PR-1b* (б), *PR-6* (в) и *HSR515* (г), обработанных препаратами харпинов (5, 15 и 45 мкг/мл), термостабильных белков *E. coli* (HSP) или буферным раствором (K) через один и три дня после обработки (соответственно черные и белые столбики). Приведены средние значения измерений для трех растений со стандартной ошибкой

рольными растениями по уровню поражения *Alternaria solani* и *Botrytis cinerea*, тогда как для двух других патогенов некоторые отличия были зафиксированы (табл. 2).

Таблица 2

**Влияние обработки харпинами растений томата восприимчивого сорта  
Доходный на степень поражения патогенами (развитие болезни, %)**

Раствор для обработки	<i>Alternaria solani</i>		<i>Cladosporium fulvum</i>		<i>Phytophthora infestans</i>	<i>Botrytis cinerea</i>		
	1-й учет	2-й учет	1-й учет	2-й учет	1-й учет	1-й учет	2-й учет	3-й учет
Буфер	16,7	20,8	9,4	68,8	73,3	25,0	57,3	86,5
HrpN <sub>Рс</sub>	14,3	17,6	12,5	37,5	46,7	20,8	54,2	94,8
HrpW <sub>Рс</sub>	15,6	15,6	21,9	43,8	33,3	18,8	50,0	83,3
HrpN <sub>Еа</sub>	9,4	21,9	6,3	50,0	46,7	22,9	50,0	77,1

Несмотря на то что обработка препаратами харпинов не обеспечила полной защиты растений томата от *Phytophthora infestans* и *Cladosporium fulvum*, развитие этих патогенов оказалось заметно меньшим: на обработанных растениях процент развития фитофтороза был ниже в 1,6÷2,2 раза, кладоспориоза – в 1,4÷1,8 раза по сравнению с контролем. Максимальный эффект повышения устойчивости к *Ph. infestans* был достигнут при обработке растений HrpW<sub>Рс</sub>, а к *C. fulvum* – при обработке HrpN<sub>Рс</sub>.

### Обсуждение результатов

Растения томата не являются естественным хозяином для бактерий *P. carotovorum* штамма 3-2 и при контакте с этим патогеном обычно способны быстро инициировать каскад защитных реакций, ведущих к развитию гиперчувствительности в зоне первичного контакта, а также системного ответа во всех частях растения. Последний легко обнаружить по резко повышенной экспрессии ряда *PR*-генов в частях растения, непосредственно с патогеном не контактировавших. В ходе проделанной ранее работы мы установили, какие из известных *PR*-генов томата индуцируются при контакте с *P. carotovorum* штамма 3-2 [15]. Индукция этих генов, скорее всего, происходит в результате детекции растением одной или, вероятнее, нескольких молекул, секретируемых патогеном или расположенных на поверхности его клеток. Харпины принадлежат к классу секретируемых факторов вирулентности и поэтому служат удобной мишенью для распознавания организмом растения. Если эти белки действительно являются молекулярными сигналами, которые растение распознает при естественном развитии заболевания, можно ожидать, что обработка препаратами харпинов приведет к индукции тех же *PR*-генов, что и при контакте растений непосредственно с патогеном. Тем не менее зафиксированная в настоящей работе реакция растений томата на обработку препаратами харпинов существенно отличается от их ответа на контакт с патогеном, во-первых, по спектру генов, экспрессия которых значительно менялась в каждом из случаев. При заражении растений бактериями *P. carotovorum* шесть из семи проверенных генов меняли свою экспрессию, причем исключительно в сторону увеличения, тогда как в случае обработки препаратами харпинов детектировалась индукция экспрессии трех генов (*PR-1a*, *PR-1b* и *PR-2*) и репрессия одного (*PR-6*) гена. Интенсивность транскрипции генов из семейств *PR-3* и *PR-5*, индуцируемых при контакте с бактериями *P. carotovorum*, практически не изменялась после обработки харпинами. Во-вторых, индукция *PR*-генов при контакте с патогеном была значительно сильнее. Так, максимальное усиление экспрессии *PR*-генов растений томата, которое нам удалось зафиксировать, было шестикратным (в случае *PR-2*). При контакте же растений с бактериями *P. carotovorum* экспрессия *PR-2* увеличивалась в 15 раз, а для других генов (например, *PR-5*) достигала 50 раз. Таким образом, можно заключить, что реакция растения на контакт с патогеном и с одним из его факторов вирулентности существенно различается.

Обработка растений томата харпинами не оказала существенного влияния на поражение некротрофным патогеном *Botrytis cinerea* и более близким к нему по типу трофности *Alternaria solani*, но несколько снизила пораженность растений патогенами с высоким уровнем биотрофности – *Cladosporium fulvum* и *Phytophthora infestans*. Известно, что биотрофные и некротрофные патогены индуцируют различные сигнальные пути: салицилатный в первом случае, а жасмонатный – во втором [16], причем активация одного пути во многих случаях приводит к репрессии другого [7]. *PR-1* и *PR-2* считаются генами, активируемыми преимущественно через салицилатный путь, поскольку именно они индуцируются в первую очередь при контакте с биотрофными патогенами [18, 19]. В то же время известно, что активация *PR-6* зависит от жасмонатного пути [20]. Обработка харпинами в наших экспериментах четко индуцировала только *PR-1* и *PR-2*, что, скорее всего, является следствием активации салицилатного пути. Репрессия *PR-6* может быть следствием ингибирования синтеза жасмоновой кислоты после активации салицилатного сигнального пути.

Белки из семейства PR-2 обладают  $\beta$ -1,3-глюканазной активностью, что определяет их ингибирующее действие по отношению к грибным и оомицетным патогенам [19], содержащим большое количество  $\beta$ -1,3-глюканов в клеточных стенках. Белки из семейства PR-1 продемонстрировали активность против оомицетных патогенов [21]. Таким образом, специфическое подавление развития именно биотрофных патогенов хорошо коррелирует с активацией салицилатзависимых PR-генов и их специфической антигрибной и антиоомицетной активностью.

Таким образом, можно заключить, что обработка растений томата препаратами харпинов за счет стимуляции естественного иммунитета повышает их устойчивость к биотрофным патогенам (к числу которых относятся наиболее экономически значимые патогены этой культуры), но является неэффективной против некротрофных патогенов. Дальнейшая оптимизация условий обработки харпинами может повысить иммуностимулирующий эффект.

Работа выполнена при финансовой поддержке БРФФИ (грант № Б08-161).

1. Jones J.D.G., Dangl J.L. // Nature. 2006. Vol. 444. № 7117. P. 323.
2. Wei Z.M., Laby R.J., Zumoff C.H. et al. // Science. 1992. Vol. 257. № 5066. P. 85.
3. Alfano J.R., Collmer A. // Annu. Rev. Phytopathol. 2004. Vol. 42. P. 385.
4. Jang Y., Sohn S., Wang M. // Planta. 2006. Vol. 223. № 3. P. 449.
5. Reboutier D., Frankart C., Briand J. et al. // Mol. Plant-Microbe Interact. 2007. Vol. 20. № 7. P. 94.
6. Fontanilla M., Montes M., De Prado R. // Commun. Agric. Appl. Biol. Sci. 2005. Vol. 70. № 3. P. 41.
7. Dong H., Delaney T., Bauer D., Beer S. // Plant J. 1999. Vol. 20. № 2. P. 207.
8. Strobel N., Ji C., Gopalan S. et al. // Ibid. 1996. Vol. 9. № 4. P. 431.
9. Dong H., Peng J., Bao Z. et al. // Plant Physiol. 2004. Vol. 136. № 3. P. 3628.
10. Николайчик Е.А., Лагоненко А.Л., Валентович Л.Н. и др. // Докл. НАН Беларуси. 2007. Т. 51. № 3. P. 81.
11. Лагоненко А.Л., Николайчик Е.А., Евтушенков А.Н. // Там же. 2006. Т. 50. № 1. P. 70.
12. Присяженко О.К., Николайчик Е.А., Евтушенков А.Н. // Там же. 2007. Т. 51. № 5. P. 85.
13. Поликсенова В. Микозы томата: возбудители заболеваний, устойчивость растений. Мн., 2008.
14. Хохряков М., Потлайчук В., Семенова А., Элбакян М. Определитель болезней сельскохозяйственных культур. Л., 1984. С. 41.
15. Николайчик Е., Присяженко О., Валентович Л., Поликсенова В. // Генетика и биотехнология XXI века. Фундаментальные и прикладные аспекты: Материалы междунар. науч. конф. Мн., 2008. P. 16.
16. McDowell J., Dangl J. // Trends Biochem. Sci. 2000. Vol. 25. № 2. P. 79.
17. Thaler J., Fidantsef A., Bostock R. // J. Chem. Ecol. 2002. Vol. 28. № 6. P. 1131.
18. Hoegen E., Stromberg A., Pihlgren U., Kombrink E. // Mol. Plant Pathol. 2002. Vol. 3. P. 329.
19. Hennig J., Dewey R., Cutt J., Klessig D. // Plant J. 1993. Vol. 4. P. 481.
20. Zhang H., Xie X., Xu Y., Wu N. // Plant Physiol. Biochem. 2004. Vol. 42. № 5. P. 437.
21. Niderman T., Genetet I., Bruyere T. // Plant Physiol. 1995. Vol. 108. P. 17.

Поступила в редакцию 01.12.09.

**Чжан Янь** – аспирант кафедры молекулярной биологии. Научный руководитель – Е.А. Николайчик.

**Евгений Артурович Николайчик** – кандидат биологических наук, доцент кафедры молекулярной биологии.

**Марина Алексеевна Стадниченко** – ассистент кафедры ботаники.

**Валентина Дмитриевна Поликсенова** – кандидат сельскохозяйственных наук, доцент, заведующая кафедрой ботаники.