

## ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ ЭКСТРАКЛЕТОЧНЫХ РИБОНУКЛЕАЗ В ФИТОПАТОГЕНЕЗЕ У РАСТЕНИЙ НА ПРИМЕРЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ, НЕСУЩИХ ГЕН ЭКСТРАКЛЕТОЧНОЙ РИБОНУКЛЕАЗЫ ЦИНИИ *ZRNaseII*

С.М. Ибрагимова, Е.А. Трифонова, Е.А. Филипенко, А.В. Кочетов

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия, [isola@bionet.nsc.ru](mailto:isola@bionet.nsc.ru)

**Аннотация.** Трансгенные растения картофеля с. Голубизна, несущие ген экстраклеточной рибонуклеазы цинии *ZRNaseII* под управлением сильного конститутивного промотора 35S ВКМЦ, проявляют устойчивость к заражению *P. infestans*, выражающуюся в задержке симптомов развития инфекции, что дает основание предполагать участие S-подобных РНКаз в системе неспецифического ответа на поражение патогенами.

**Ключевые слова:** экстраклеточные рибонуклеазы, фитопатогенез, картофель, трансгенные растения, устойчивость к фитопатогенам

**DOI:** 10.31255/978-5-94797-319-8-913-916

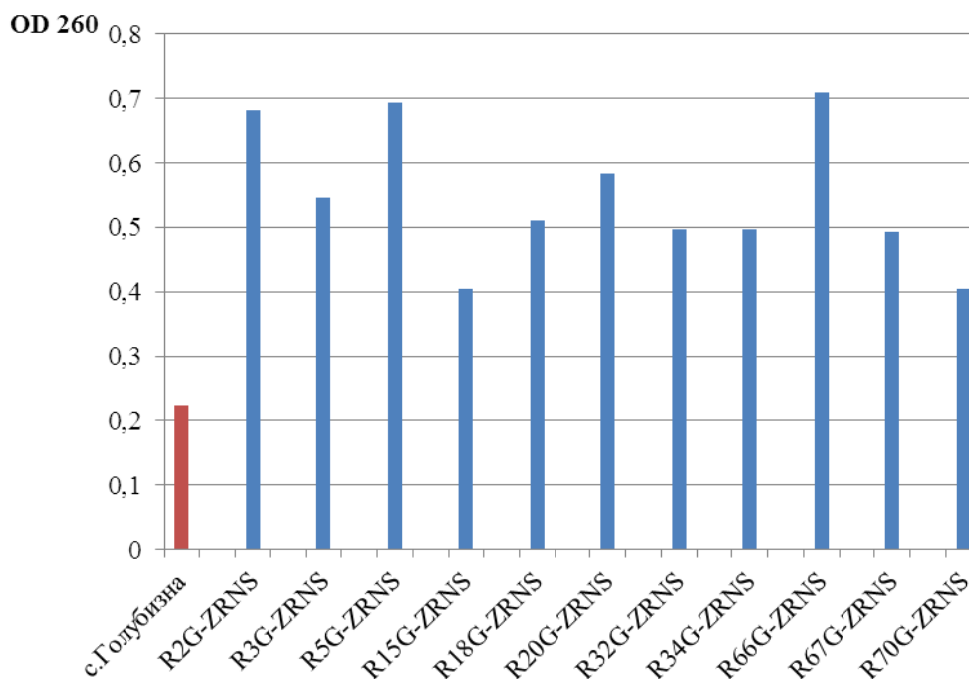
Наряду с системой собственного иммунитета, у растений существует система неспецифического ответа на поражение патогенами, выражающаяся в накоплении различных метаболитов и белков. Особый интерес представляют PR-белки (pathogenesis-related proteins). Функции этих белков связаны с защитными реакциями растений в ответ на заражение, и они были идентифицированы именно в пораженных органах растений. В настоящее время они разделены на 17 семейств, согласно своим структурным особенностям и биологической активности. Представители семейства 4 и 10 имеют глюконазную активность, другие семейства – эндохитаназную, и, надо полагать, что такие биологические свойства позволяют им при взаимодействии с патогенами гидролизовать клеточные стенки, разрушать пул их РНК. Наряду с PR-белками, в механизмах защиты от патогенов могут принимать участие экстраклеточные S-подобные рибонуклеазы. Экспрессия в ответ на поранение и атаку патогенов, и экстраклеточная локализация сближают экстраклеточные S-подобные РНКазы с PR-белками. Известно, что экспрессия генов некоторых экстраклеточных РНКаз индуцируется при повреждении тканей, в стареющих органах, при фосфатном голодании, а также при инфицировании тканей растения. Имеющиеся к настоящему времени данные свидетельствуют о том, что S-подобные РНКазы могут быть задействованы в ряде важных биологических процессов, включая формирование неспецифического ответа при заражении патогенами.

Ранее на модельных растениях табака (*N. tabacum* L.) было показано, что ферменты этого класса способны увеличивать неспецифическую защиту растений от вирусов с РНК-геномами [Сангаев и др., 2007]. В то же время, некоторые экстраклеточные PR-белки с рибонуклеазной активностью обладают противогрибковой активностью, хотя этот феномен остается малоисследованным [Galiana et al., 1997; Hugot et al., 2002]. Существует предположение, что РНКазы могут проникать в цитоплазму грибов и останавливать трансляцию, разрушая мРНК. Представителем этого семейства является экстраклеточная РНКазы *ZRNaseII Zinnia elegans*. РНКазы *ZRNaseII Z. elegans* не детектируется в интактных органах растения, не индуцируется фосфатным голоданием, обработкой перекисью водорода или в ходе старения, но в значительной степени индуцируется через 3-6 часов после поранения. Этот фермент кодируется в виде полипептида длиной 229 аминокислот, включая лидерную

последовательность для экстраклеточной секреции на N-конце [Ye, Droste, 1996].

Картофель – одна из важнейших пищевых культур во всем мире. И одной из главных задач является исследование механизмов устойчивости к такому важному патогену картофеля, как *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, и создание устойчивых сортов путем комбинации традиционных подходов и исследований на молекулярном уровне. Создание генетических моделей, несущих ген экстраклеточной РНКазы, позволит изучать механизмы их фунгицидной активности.

Для конститутивной экспрессии в растениях картофеля ZRNaseII *Zinnia elegans* был использован промотор 35S РНК вируса мозаики цветной капусты (ВМЦК). Этот промотор обеспечивает конститутивно высокий уровень экспрессии. Известно, что в ответ на атаку патогенов уровень экспрессии PR-белков может достигать значительных величин (5-10% суммарного белка). При этом уровень одного только PR-1 белка может составлять 1-2% суммарного белка [Edreva, 2005]. Такое накопление PR-белков оказывается необходимым для достижения ими токсических концентраций в апопласте и развития общего антимикробного эффекта, так как существует корреляция между уровнем накопления PR-белков и развиваемой устойчивостью [Edreva, 2005]. Использование промотора 35S РНК ВМЦК позволяло рассчитывать на эффективное накопление РНКазы ZRNaseII в апопласте, сравнимое с накоплением PR-белков во время защитного ответа.



**Рисунок. Рибонуклеазная активность грубых листовых экстрактов трансформантов картофеля сорта Голубизна, несущих ген экстраклеточной рибонуклеазы циннии ZRNaseII.**

В качестве объекта для проведения генно-инженерных работ был выбран сорт Голубизна, обладающий высокой морфогенетической активностью в культуре *in vitro*. Сорт относится к среднеспелым сортам столового назначения и умеренно восприимчив к фитофторе. В качестве вектора была использована плаزمида pVi121, содержащая ген экстраклеточной РНКазы *Zinnia elegans* под управлением сильного конститутивного промотора 35S РНК ВМЦК [Trifonova et al., 2012]. Было получено 18 трансформантов, устойчивых к канамицину и содержащих T-ДНК инсерцию в геноме. Далее измеряли

РНКазную активность в белковых экстрактах из листьев трансформантов, в результате чего были отобраны 11 растений, уровень нуклеазной активности в апопластах которых в 2-3,5 раза превышал значения, характерные для нетрансгенных растений сорта Голубизна (рисунки).

Оценку устойчивости к фитофторозу проводили на отделенных листьях растений, инокулюм в виде суспензии зооспор помещали на нижнюю часть листовой пластинки, после чего листья помещали в камеры с высокой влажностью и оценивали степень поражения на 6-е и 10-е сутки. Для опыта использовали растения № 2, 5, 18, 20 и 66, нуклеазная активность в листьях которых превышала нетрансгенные растения сорта Голубизна в 3.5 раза и трансгенный образец № 18, активность у которого превышала контроль в 2,5 раза. В качестве дополнительного контроля использовали растения исходного сорта Голубизна и трансгенный образец № 32, полученный нами ранее на основе сорта Никулинский, уровень РНКазной активности в листьях которого превышал контрольные значения в 10 раз. Согласно полученным результатам, на 6-ой день после инокуляции симптомы поражения наблюдали только на листьях нетрансгенных растений сорта Голубизна, в то время как на листьях трансформантов выраженные симптомы поражения не наблюдались. Однако к 10-ому дню трансгенные образцы № 2, 5, 18, 20 также имели все признаки поражения (некротические пятна в местах нанесения суспензии, конидиальный налет вокруг некротических пятен), за исключением образца № 66 и образца № 32 с. Никулинский.

На основе полученных нами результатов, можно сделать предварительные выводы: высокий уровень РНКазной активности в апопласте недостаточен для существенного повышения устойчивости к фитофторе, однако может вызывать некоторую задержку в развитии инфекции. Таким образом, гены этой группы не только принимают участие в защите от РНК-содержащих вирусов, но также могут выполнять вспомогательные функции в системе защиты от патогенных грибов.

#### Литература

Сангаев С.С., Трифонова Е.А., Титов С.Е., Романова А.В., Колодяжная Я.С., Комарова М.Л., Сапоцкий М.В., Малиновский В.И., Кочетов А.В. Эффективная экспрессия гена экстраклеточной рибонуклеазы *Zinnia elegans* в растениях табака *Nicotiana tabacum* SR1 // Генетика. – 2007. – Т. 43, № 2. – С. 1002–1005.

Edreva A. Pathogenesis – related proteins: research progress in the last 15 years // Gen. Appl. Physiology. – 2005. – V. 31, No. 1-2. – P. 105–124.

Galiana E., Bonnet P., Conrod S., Keller H., Panabieres F., Ponchet M., Poupet A., Ricci P. RNase activity prevents the growth of a fungal pathogen in tobacco leaves and increases upon induction of systemic acquired resistance with elicitor // Plant Physiol. – 1997. – V. 115. – P. 1557–1567.

Hugot K., Ponchet M., Marais A., Ricci P., Galiana E. A tobacco S-like RNase inhibits hyphal elongation of plant pathogens // Mol. Plant Microb. Interactions. – 2002. – V. 15, No. 3. – P. 243–250.

Ye Z.H., Droste D.L. Isolation and characterization of cDNAs encoding xylogenesis-associated and wounding-induced ribonucleases in *Zinnia elegans* // Plant Mol. Biol. – 1996. – V. 30. – P. 697–709.

Trifonova E.A., Romanova A.V., Sangaeв S.S., Sapotsky M.V., Malinovsky V.I., Kochetov A.V. Inducible expression of the gene of *Zinnia elegans* coding for extracellular ribonuclease in the SR1 *Nicotiana tabacum* plants // Biol. Plantarum. – 2012. – V. 56, No. 3. – P. 571–574.

**STUDY OF THE ROLE OF EXTRACELLULAR RIBONUCLEASES IN  
PHYTOPATHOGENESIS IN PLANTS BY THE EXAMPLE OF TRANSGENIC  
POTATO PLANTS CARRIED WITH THE GENES OF ZRNaseII  
EXTRACELLULAR RIBONUCLEASIS OF ZINNIA**

C.M. Ibragimova, E.A. Trifonova, E.A. Filipenko, A.V. Kochetov

Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences,  
Novosibirsk, Russia, *isola@bionet.nsc.ru*

**Abstract.** Transgenic potato plants cv. Golubizna carrying the gene for extracellular ribonuclease ZRNaseII under the control of the strong constitutive 35S promoter of cauliflower mosaic virus shows some resistance to *P. infestans* infection, manifested in delayed symptoms of infection, suggesting the involvement of S-like RNase in the system of a nonspecific response to pathogen damage.

**Keywords:** *extracellular ribonuclease, phytopathogenesis, potato, transgenic plants, resistance to phytopathogens*