

УДК 632.911.2

ПРОТЕОМНЫЙ И ТРАНСКРИПТОМНЫЙ ПОДХОДЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНОВ "УСТОЙЧИВОСТИ" У ГОРОХА

А.М. Егорова

*Казанский институт биохимии и биофизики - структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки "Федеральный исследовательский центр "Казанский научный центр Российской академии наук", Казань, 420111 Россия
egorova@kibb.knc.ru*

Проведен анализ экспрессии генов и синтеза белков, индуцируемых ключевыми факторами фитоиммунитета – салициловой и жасмоновой кислотами в корнях гороха. Показано, что наиболее сильно индуцируемыми белками являются не общепринятые маркерные белки характерные для каждого фитогормона. Салициловая кислота наиболее значительно индуцирует хитиназа-подобные белки в корнях гороха, тогда как жасмонат-зависимыми белками являются ингибиторы протеиназ типа Куница.

Ключевые слова: фитоиммунитет, салициловая кислота, жасмоновая кислота, маркерные гены, устойчивость растений

PROTEOME AND TRANSCRIPTOME APPROACHES FOR THE IDENTIFICATION OF "RESISTANCE" GENES IN PEA

A.M. Egorova

Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences, P.O. Box 30, Kazan, 420111, Russia

Analysis of gene expression and protein synthesis induced by key phytoimmunity factors – salicylic and jasmonic acids in pea roots was carried out. It was shown that the most strongly induced proteins are not the generally accepted marker proteins characteristic of each phytohormone. Salicylic acid most significantly induces chitinase-like proteins in pea roots, while jasmonate-dependent proteins are Kunitz-type proteinases inhibitors.

Keywords: phytoimmunity, salicylic acid, jasmonic acid, marker genes, plant resistance

Фитогормоны участвуют во всех процессах роста и развития растений. Защитные реакции растений в ответ на действие патогенных микроорганизмов, неблагоприятных факторов среды так же регулируются фитогормонами [1]. Стрессовые фитогормоны, включающие этилен, абсцизовую, салициловую и жасмоновую кислоты, участвуют как в процессах нормального роста и развития растений, но их основная роль связана с защитными реакциями растений при действии абиотических и биотических стрессовых факторов. Ключевыми факторами фитоиммунитета в растениях являются салициловая (СК) и жасмоновая кислоты (ЖК). Считается, что СК участвует в реализации защитного ответа при действии биотрофных и полубиотрофных патогенов, питающихся живыми тканями растений, тогда как ЖК участвует, главным образом, в защите от некротрофных патогенов и травоядных насекомых. Атака патогенов приводит к образованию сигнальных молекул и активации сигнальных путей, активируемых тем или иным фитогормоном. В зависимости от того, какой сигнальный путь активируется будет отличаться и ответ растения на патогены. Активация сигнального каскада приводит к изменению экспрессии генов и синтеза белков. Среди этих белков есть как белки с прямым антипатогенным действием, так и участников синтеза защитных соединений.

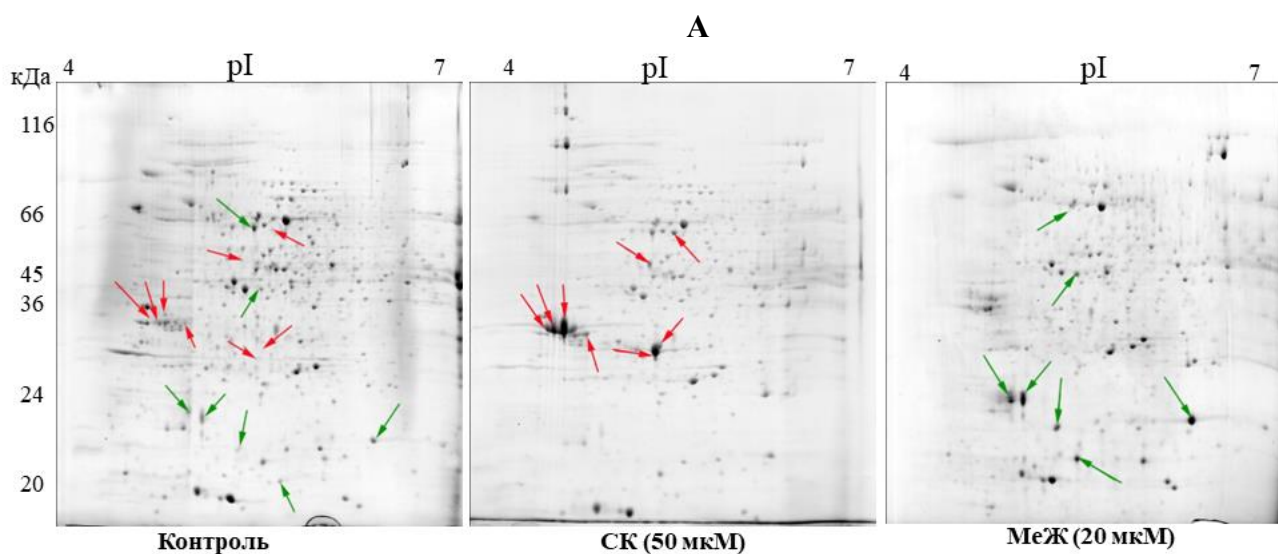
Активация того или иного фитогормон-зависимого сигнального пути в растениях часто оценивается по анализу экспрессии так называемых «маркерных» генов. В основном, эти гены

выявлены и охарактеризованы на модельных растениях - Арабидопсисе, рисе, сое и в основном, на надземных органах. Но не всегда результаты, полученные на модельных растениях, могут безоговорочно применяться относительно всех видов растений. В этой связи, выявление особенностей, характерных для того или иного вида растения, причем наиболее важно это в отношении сельскохозяйственных культур, может предоставить дополнительную информацию об особенностях их защитных реакций.

Анализ и идентификация белков, изменяющихся под влиянием фитогормонов позволяет расшифровать механизм и защитную стратегию растений. Ключевыми подходами для анализа изменения экспрессии генов является транскриптомный подход, позволяющий проанализировать всю совокупность экспрессирующихся в растении генов и изменение их экспрессии при изменении условий. Другим мощным инструментом анализа белков является протеомный подход, позволяющий проанализировать изменение содержания белков и провести их идентификацию.

В последние годы все большее внимание уделяется процессам, происходящим в ризосфере, от которых зависит урожай сельскохозяйственных растений. Отмечается скудная информация о взаимоотношениях населения ризосферы с корнями, с выделяемыми ими соединениями, в том числе с антипатогенными. Так, в нашей лаборатории активно изучается влияние ключевых факторов фитоиммунитета – салициловой, жасмоновой кислот, и других участников фитоиммунитета – азелаиновой кислоты и NO на изменение экспрессии генов и содержания белков. Основное внимание уделяется корням растений, поскольку по сравнению с надземными органами их реакция и защитные ответы менее изучены. Кроме того, корни находятся в постоянном контакте с обитателями почвы, отличающимися от «надземных» патогенов, что может являться причиной различий в реализации защитных ответов в листьях и корнях [2]. Объектом наших исследований является горох, поскольку он занимает значительные площади посевов в регионе, кроме того, является важным источником белка как для корма животных, так и в рационе людей. Был идентифицирован целый ряд белков.

Салицилат-зависимые защитные реакции характеризуются активацией белков, связанных с патогенезом (PR proteins). Показано, что гены относящиеся к PR1, PR2 PR5 являются СК-зависимыми и их экспрессия регулируется СК. PR1 охарактеризован как цистенин-обогащенный как секреторный белок [3], PR2 белки – это β -1,3-глюканазы, относящиеся к гликозид гидролазам сем. 17 [4] к PR5 относится к тауматинам [5]. Так же к числу СК-индуцируемых белков относятся хитиназы, разрушающие хитин клеточных стенок патогенных грибов и бактерий.



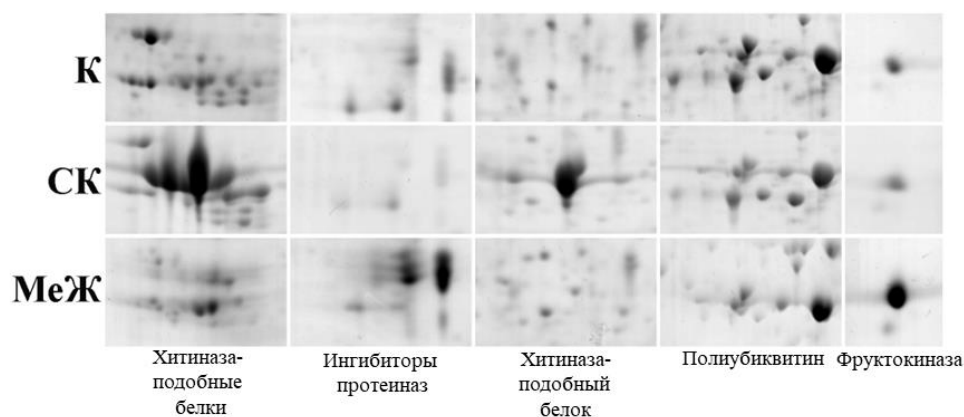


Рис. 1. Двумерные электрофореграммы растворимых белков корней гороха (А) контрольного, обработанных салициловой кислотой (50 мкМ, 72 ч) и метилжасмонатом (20 мкМ, 72 ч). Стрелками указаны белки, содержание которых наиболее значительно изменяется под влиянием фитогормонов. (Б) – фрагменты двумерных электрофореграмм с выделенными салицилат- и жасмонат- индуцируемыми белками. Разделение белков по изоэлектрической точке проводилось на стрипах с иммобилизованным градиентом pH 4-7 (BioRad, США). Разделение по молекулярным массам проводилось в 12,5% ДДС-ПАГЭ, на стрипы нанесено 550 мкг белка.

Проведенный нами протеомный анализ растворимых белков корней гороха обработанных СК (50 мкМ) позволил выявить группу белков, содержание которых наиболее значительно повышалось в корнях гороха (Рис. 1). Эти белки были идентифицированы как хитиназа-подобные белки. На двумерных электрофореграммах выявлено повышение содержания четырех изоформ хитиназа-подобных белков. По сравнению с активными хитиназами они не способны расщеплять хитин (статья в печати). Транскриптомный анализ показал, в корнях гороха повышается экспрессия пяти генов, кодирующих хитиназа-подобные белки, кодируемых генами Psat1g147600, Psat1g147560, Psat1g149120, Psat1g149040, Psat1g148600. Именно эти белки являются наиболее сильно индуцируемыми при действии СК в корнях гороха. В контрольном варианте хитиназа-подобные белки практически не экспрессируются, и их экспрессия повышается в тысячи раз уже через 12 ч действия СК (Рис.2). Активация у растений гороха хитиназа-подобных белков может являться одним из способов «обхитрить» патогены и иметь в своем арсенале дополнительный защитный механизм, поскольку в отношении активных хитиназ патогены выработали способы их инактивации [6]. Структурная схожесть хитиназа-подобных белков с активными хитиназами позволило ускорить приобретение этого нового механизма и их индукция под влиянием одного из ключевых факторов фитоиммунитета – СК, может говорить об их роли во взаимоотношениях с патогенными микроорганизмами.

Кроме того, в корнях гороха мы не обнаружили значительного повышения содержания активных хитиназ, β -1,3-глюканаз повышение содержания которых характерно для листьев гороха [7]. В тоже время, транскриптомный анализ показал, что мажорная хитиназа, аннотированная как эндохитиназа и относящаяся к гликозид гидролазам 19 сем. повышается в первые 12 часов действия СК. К третьим суткам действия СК уровень ее экспрессии возвращается к контрольным значениям. Таким образом, один лишь протеомный подход не всегда позволяет выявить изменение содержания белка, если не проводить анализ в динамике. Так же и транскриптомный подход наиболее информативен при изучении нескольких временных точек для выявления более целостной картины.

Кроме того, протеомный анализ показал изменение содержания белков, участвующих в метаболизме белков, нуклеиновых кислот, сигналинге, фенольном метаболизме [7].

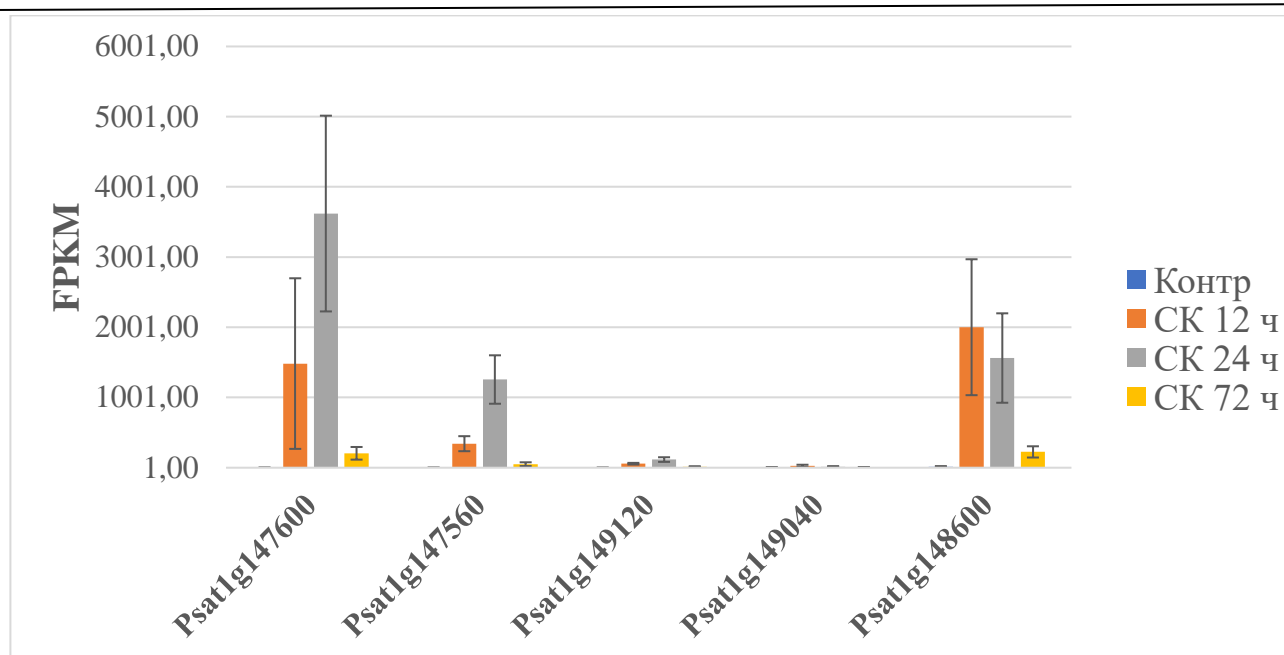


Рисунок 2. Транскриптомный анализ экспрессии генов хитиназа-подобных белков в корнях гороха при действии СК (50 мкМ) в течение 12 ч, 24 ч и 72 ч. FPKM – выровненные значения экспрессии генов (количество фрагментов на килобазу на миллион отображенных фрагментов).

Маркерными белками, характерными для активации жасмонатного сигналинга являются дефенсины (PDF1.2), вегетативные запасные белки (VSP1). Протеомный анализ белков корней гороха обработанных метилжасмонатом (МЖ) – производным ЖК показал, что ответ корней отличается от той картины, которая наблюдалась при действии СК (Рис. 1). Обработка метилжасмонатом (МЖ) приводила к повышению содержания ингибиторов протеиназ, ингибитора трипсина типа Куница, дефенсина, фруктоиназы [8].

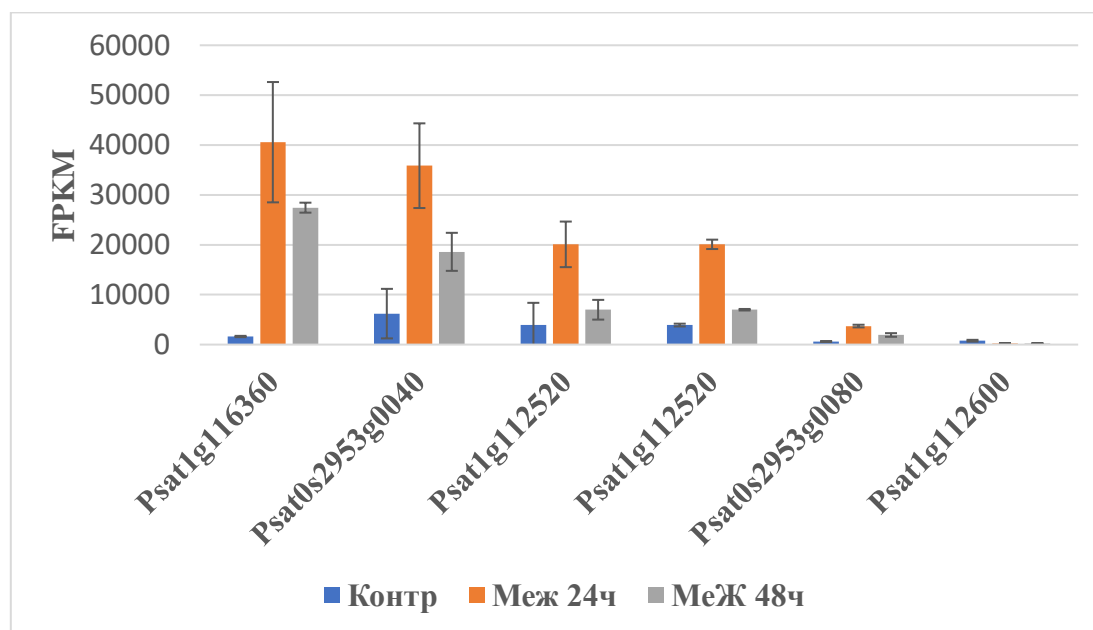


Рисунок 3. Транскриптомный анализ экспрессии генов ингибиторов протеиназ типа Куница в корнях гороха при действии МЖ (20 мкМ) в течение 24 ч и 72 ч. FPKM – выровненные значения экспрессии генов (количество арагментов на килобазу на миллион отображенных фрагментов).

Наиболее сильно активировалось несколько изоформ ингибиторов протеиназ типа Куница, их содержание повышалось в 4-9 раз при действии МЖ. Ингибиторы протеиназ являются защитными белками, проявляющими антибактериальную и антигрибную активности, но не

являются маркерными белками для действия жасмоната [9]. Транскриптомный анализ показал, что в корнях гороха экспрессируется шесть изоформ ингибиторов протеиназ, кодируемых генами Psat1g116360, Psat0s2953g0040, Psat1g112520, Psat0s2953g0080, Psat0s2953g0080, Psat1g112600. Экспрессия пяти из них повышалась через 24 ч и 72 ч действия МеЖ (Рис. 3).

Таким образом, приведенные в работе данные позволяют заключить, что не всегда маркерные гены являются теми же самыми генами, которые непосредственно участвуют в реализации защитного ответа, опосредованного тем или иным фитогормоном. Маркерный ген позволяет оценить активацию фитогормон-зависимого сигнального пути. Использование транскриптомного и протеомного подходов позволяет выявить активируемые фитогормонами защитных гены и белки, характерные для конкретного вида и, соответственно, участвующие в реализации защитного ответа при атаке патогенов. Эти особенности могут быть использованы в селекции этих видов в качестве маркеров устойчивых сортов, при разработке подходов для их защиты уже с учетом особенностей реализации защитного ответа и других агробιοтехнологических мероприятиях.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке гранта Академии наук Республики Татарстан и РНФ № 24-26-20123

Библиографический список

1. Pieterse C.M., Van der Does D., Zamioudis C., Leon-Reyes A., Van Wees S.C. Hormonal modulation of plant immunity // *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 2012. V. 28. P. 489-521.
2. Chuberre C., Plancot B., Driouich A., Moore J.P., Bardor M., Gügi B., Vitré M. Plant immunity is compartmentalized and specialized in roots // *Front Plant Sci.* 2018. V. 9. 1692.
3. Gibbs G.M., Roelants K., O'Bryan M.K. The CAP superfamily: cysteine-rich secretory proteins, antigen 5, and pathogenesis-related 1 proteins—roles in reproduction, cancer, and immune defense // *Endocrine Reviews.* 2008. V. 29. P. 865–897.
4. Higa-Nishiyama A., Ohsato S., Banno S., Woo S.H., Fujimura M., Yamaguchi I., Kimura M. Cloning and characterization of six highly similar endo-1,3- β -glucanase genes in hexaploid wheat. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2006. 44, P. 666–673.
5. Petre B., Major I., Rouhier N., Duplessis S. Genome-wide analysis of eukaryote thaumatin like proteins (TLPs) with an emphasis on poplar. // *BMC Plant Biology.* 2011. V. 11. 33.
6. Han L.B., Li Y., Wang X., Wang W.Y., Liu J., Wu J.H., Zhong N.Q., Wu S.J., Jiao G.L. Wang H.Y., Xia G.X. The cotton apoplastic protein CRR1 stabilizes chitinase 28 to facilitate defense against the fungal pathogen *Verticillium dahlia* // *Plant Cell.* 2019. V. 31. 520-536.
7. Тарчевский ИА., Яковлева ВГ., Егорова АМ. Салицилат-индуцированная модификация протеомов у растений // *Прикладная биохимия и микробиология.* 2010. Т. 46. №3. С. 263-275.
8. Яковлева ВГ., Егорова АМ., Тарчевский ИА. Протеомный анализ влияния метилжасмоната на корни проростков гороха // *Доклады Академии наук* 2013. Т. 449. №2. С. 236.
9. Bonturi C.R., Silva Teixeira A.B., Rocha V.M., Valente P.F., Oliveira J.R., Filho C.M.B., Fátima Correia Batista I., Oliva M.L.V. Plant Kunitz inhibitors and their interaction with proteases: current and potential pharmacological targets // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. N 9. 4742.