

**ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ  
ФИТОПАТОЛОГИИ**

*На правах рукописи*

**Шумилина Дарья Владимировна**

**Изучение структуры и свойств  
пептидил-пролил-*цис/транс*-изомеразы MF3,  
индуцирующей устойчивость растений к болезням.**

06.01.11 – защита растений

**Автореферат диссертации  
на соискание ученой степени кандидата  
биологических наук**

Большие Вяземы – 2007

Работа выполнена в лаборатории молекулярной биологии ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии РАСХН в 2002 – 2007 гг.

Научный руководитель: кандидат биологических наук  
Виталий Георгиевич Джавахия

Официальные оппоненты: ведущий научный сотрудник  
Института Биохимии им. А.Н. Баха  
РАН, Москва  
доктор биологических наук  
Наталия Ивановна Васюкова

ведущий научный сотрудник  
Центра "Биоинженерия" РАН, Москва  
доктор биологических наук  
Александр Николаевич Игнатов

Ведущая организация: Российский государственный  
аграрный университет –  
МСХА имени К.А. Тимирязева

Защита диссертации состоится «\_01\_» \_ноября\_ 2007 г. в 10-00 часов  
на заседании диссертационного совета К-006-064-01 при Всероссийском  
научно-исследовательском институте фитопатологии по адресу: 143050,  
Московская обл., Одинцовский район, р.п. Б. Вяземы, ул. Институт, ВНИИФ.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке института и на сайте  
ВНИИФ [www.phytonet.ru](http://www.phytonet.ru)

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » сентября 2007 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
кандидат биологических наук

И. Н. Яковлева

## 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### 1.1. Актуальность темы.

Болезни растений, вызываемые патогенными грибами, бактериями и вирусами продолжают наносить серьёзный ущерб сельскому хозяйству, несмотря на его интенсивное развитие. Современные направления в защите растений от болезней включают в себя методы биологического контроля и индуцированной устойчивости растений к патогенам.

Бактерия *Pseudomonas fluorescens* способна индуцировать устойчивость растений к патогенным грибам и нематодам (Siddiqui and Shaukat, 2002). В процессе исследования защитных свойств *P. fluorescens* во ВНИИ Фитопатологии было показано, что одним из факторов, позволяющим данной бактерии защищать растения от патогенов, является низкомолекулярный (16,9 кДа) термостабильный белок, названный Микробным Фактором 3 (MF3). Выделенный белок индуцировал устойчивость листьев табака к вирусу табачной мозаики. Ген, кодирующий MF3 белок, был клонирован и секвенирован (Dzhavakhia *et al.*, 2005). Для того, чтобы наиболее полно раскрыть механизмы действия данного белка было решено провести его всестороннее изучение как в качестве возможного биопестицида, так и при применении гена *mf3* для создания трансгенных растений цветной капусты и рапса.

### 1.2. Цели и задачи исследований.

Целью наших исследований было изучение защитного действия MF3. Другой целью данной работы был анализ первичной структуры MF3-белка и идентификация аминокислотной последовательности, ответственной за индуцирующую активность. Кроме того, была поставлена цель выяснить способен ли белок обеспечивать устойчивость трансгенных растений, в которых экспрессируется ген *mf3*.

#### Задачи исследований:

1. Создание штамма *E.coli* - суперпродуцента MF3-белка;
2. Оценка способности MF3 защищать растения от вирусных и грибных патогенов;
3. Изучение способности хитозана образовывать комплекс с MF3 и способствовать его проникновению внутрь растительных тканей;

4. Изучение структуры MF3 и определение его фрагмента, достаточного для индуцирования устойчивости;
5. Оценка способности синтетического пептида MF3-29ак индуцировать устойчивость растений в системе табак - ВТМ.
6. Анализ устойчивости к фитопатогенам трансгенных растений, в которых экспрессируется ген *mf3*.

### 1.3. Научная новизна исследований.

1. Впервые была обнаружена гомология между аминокислотной последовательностью MF3 белка и пептидиролил-*цис/транс*-изомеразы FKBP-типа. Впервые показано, что блок, относящийся к этому семейству способен индуцировать устойчивость растений к вирусным и грибным патогенам.
2. Впервые показана способность MF3 образовывать комплекс с хитозаном, в результате чего усиливается защитный эффект данного белка в таких системах растение-хозяин – патоген, как белокочанная капуста – вирус мозаики турнепса, пшеница – *Stagonospora nodorum*.
3. Впервые показано, что MF3 имеет активный центр– пептид PPGLEKALE GKAVGDDLEVAVERPEDAYG (MF3 - 29 ак), определяющий защитные функции данного белка. Показано, что синтезированный химическим путём MF3 - 29ак обладает способностью вызывать устойчивость табака к ВТМ.
4. Впервые показано, что растения рапса, экспрессирующие ген *mf3*, обладают повышенной, по сравнению с нетрансгенными растениями, устойчивостью к вирусу мозаики турнепса и грибу *Plasmodiophora brassicae*.

### 1.4. Практическая значимость работы.

1. Показано, что MF3 белок способен защищать растения от вирусных и грибных патогенов. Данные результаты могут служить предпосылкой для создания средств защиты растений на основе MF3.
2. Создан штамм *E. coli* – суперпродуцент MF3 с продуктивностью 200 мг белка/л. Этот штамм может быть использован в качестве источника MF3 в случае применения данного белка как средства для защиты растений. Разработана простая схема выделения и очистки MF3.

3. При создании препаративных форм биопестицидов на основе белка может быть использован хитозан, образующий комплекс с MF3 и усиливающий защитный эффект последнего. Кроме того, установлено, что применение хитозана совместно с белком позволяет расширить круг защищаемых растений.
4. Поскольку установлено, что фрагмент MF3 (пептид MF3-29 ак) способен защищать растения табака от ВТМ, для разработки биопестицидов и для создания трансгенных растений можно использовать как целый белок, так и его индуцирующую часть.
5. Повышенная устойчивость трансгенных растений рапса к вирусу мозаики турнепса и к грибному патогену *Pl. brassicae* делает растения, несущие ген *mf3* перспективными для использования в дальнейшей селекции сортов с широким спектром устойчивости к вирусным и грибным патогенам.
6. Структура MF3-белка и его защитные функции были защищены международным патентом Dzhavakhia V., Filipov A., Skryabin K., Voinova T., Kouznetsova M., Shulga O., Shumilina D., Kromina K., Pridannikov M., Battchikova N., Korpela T. Proteins inducing multiple resistance of plants to phytopathogens and pests. Patent PCT WO2005/061533 A1, дата публикации 2005-07-07.

### **1.5. Апробация работы и публикации.**

Материалы диссертации были представлены на следующих конференциях и конгрессах:

1. Шестая международная конференция Европейского химического общества, проходившая в Познани (Польша) с 31 августа по 3 сентября 2004 г;
2. Международная конференция «Наука – Бизнес - Образование, Биотехнология – Биомедицина – Окружающая среда», проходившая в Пущино 10-13 мая в 2005 г;
3. Десятый МНТЦ/Корея семинар: «Industrial applications of Russia's new bio-technologies», проходивший в Мокпо (Корея) 14-15 марта 2006 г;
4. Восьмой конгресс “New achievements in biological control of plant diseases”, проходивший в Быдгощи (Польша) 25-26 апреля 2006 г;

5. Восьмая международная конференция «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана», проходившая в Казани 12-17 июня 2006 г;
6. Третья международная конференция «Наука и Бизнес», проходившая в Пущино 19-21 июня 2006 г;
7. Всероссийская научно-практическая конференция «Индукцированный иммунитет сельскохозяйственных культур – важное направление в защите растений», проходившая в Голицыно 15–16 ноября 2006 г;
8. Объединенное международное совещание «PR-Proteins and Induced Resistance against Pathogens and Insects», проходивший в Дорне (Голландия) 10-14 мая 2007 г

По материалам диссертации опубликовано 12 работ и получен один международный патент.

### 1.6. Структура и объем работы.

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, выводов и списка литературы. Материал изложен на 109 страницах машинописного текста, содержит 16 таблиц и 20 рисунков. Список литературы включает 122 работы.

## 2. СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### 2.1. Материалы и методы.

#### Бактериальные штаммы и плазмиды.

В работе использовали штамм 197 *Pseudomonas fluorescens*. В качестве источника гена *mf3* для трансформации клеток *E. coli* штамма BL21(DE3) была использована плазмида pMF, сконструированная сотрудником лаборатории инженерии белка Института биоорганической химии А.А. Шульгой.

#### Фитопатогенные микроорганизмы.

Грибы *Alternaria longipes* (изолят m18/10/99) и *Plasmodiophora brassicae* (раса W), а также вирус мозаики турнепса (ВМТ) (изолят II) были предоставлены доктором Р. Кремером из Института декоративных растений (Германия). Гриб *Stagonospora nodorum* (изолят В1/3) был получен из коллекции отдела грибных болезней зерновых культур ВНИИ

Фитопатологии. Вирус табачной мозаики (ВТМ) поддерживали на растении табака *Nicotiana tabacum* (сорт Samsun), Y и X вирусы картофеля поддерживали на растениях картофеля (сорт Удача).

**Пептид MF3-29ак** был синтезирован сотрудниками группы инструментальных методов синтеза под руководством М. Б. Бару (Отдел биоинженерии филиала Института биоорганической химии РАН, Пущино).

**Хитозаны** были любезно предоставлены В.П. Варламовым, Центр «Биоинженерия», РАН, Москва.

#### **Методы трансформации клеток *E. coli* и выделения MF3.**

Для трансформации клеток *E. coli* плазмидным вектором рMF использовали методику Kurien Kurien and Scofield, 1995). Трансформированные клетки *E. coli* выращивали в жидкой питательной среде ТВ с добавлением ампициллина. Клетки осаждали центрифугированием, промывали и суспендировали в лизирующем буфере, инкубировали во льду в течение 30 мин. Затем колбу с суспензией помещали на 20 мин в кипящую водяную баню (100°C). Белок MF3, находящийся в надосадочной жидкости, очищали на колонке, заполненной Chelating-Sepharose (Ni<sup>2+</sup>), элюцию осуществляли линейным градиентом имидазола (“Pharmacia”, Швеция).

**Иммуно-ферментный анализ (ИФА)** проводили по стандартной методике. Для определения вирусов использовали диагностические наборы из ВНИИ картофельного хозяйства им. А. Г. Лорха. **Антитела к MF3** были получены Свешниковым П.Г. и Горюцкой С.Б. в отделе гибридных технологий Всероссийского центра молекулярной диагностики и лечения.

**Оценка фитотоксичности** проводилась в вегетационных опытах путём наблюдения за развитием растений после инфильтрации белка в листья табака и проращивания семян пшеницы и ячменя предварительно обработанных растворами MF3.

**Методика оценки способности MF3 оказывать прямое действие на ВТМ** включала в себя инкубацию ВТМ в растворе MF3, очистку вируса от белка дифференциальным ультрацентрифугированием и последующую инокуляцию этим вирусом растений табака.

**Метод оценки способности MF3 и пептидов защищать растения от вирусов** включал натирание половинок листьев табака сорта Xanthu NN белком и водой (контроль) с карборундом, инокуляцию всего листа вирусом

табачной мозаики, спустя сутки или другой промежуток времени, и учёт образовавшихся некрозов спустя 3-4 дня после инокуляции. Для оценки способности индуцировать системную устойчивость белком натирали лист первого яруса растения, а инокулировали ВМТ листья 1, 2 и 3 ярусов спустя сутки и двое после обработки. Для оценки активности MF3 против Y-ВК и ВМТ, растения табака сорта Samsun nn и капусты сорта Krautman опрыскивали белком, нижний лист инокулировали вирусом Y-ВК или ВМТ, а накопление вируса в растительном соке оценивали с помощью ИФА.

**Фунгитоксичность MF3** оценивали по его влиянию на прорастание спор грибов *St. nodorum* и *A. longipes* в растворе белка и по развитию колоний рядом с дисками из фильтровальной бумаги, пропитанными раствором MF3.

**Изучение способности MF3 индуцировать устойчивость листьев пшеницы к *St. nodorum*** проводили по модифицированному методу Пыжиковой и соавторов (Пыжикова и др., 1989).

**Метод оценки влияния MF3 на устойчивость табака к *A. longipes*.**

Изолированные листья табака опрыскивали с нижней стороны раствором MF3. На следующий день верхнюю сторону всех листьев опрыскивали суспензией спор патогена (De Bolle *et al.*, 1996). Через 7 дней подсчитывали количество образовавшихся на листьях некрозов.

**Оценку биологической эффективности MF3 против корневых гнилей пшеницы и ячменя** проводили по методике, описанной в ГОСТ Р 50459-92.

В работе использовали стандартные методы молекулярного анализа трансгенных растений, которые проводили согласно медицинским руководствам Sambrook *et al.*, 2001.

**Методы оценки устойчивости трансгенных растений к патогенам.**

Нижний лист каждого трансгенного растения рапса инокулировали ВМТ. Количество вируса в суммарной пробе с листьев определяли с использованием ИФА.

Проростки рапса и цветной капусты инокулировали *Plasmodiophora brassicae*, внося суспензию спор в почвенную смесь. Степень развития болезни оценивали на 50-й день после инокуляции по 9-ти бальной шкале.

**Статистическая обработка данных** проводилась с использованием дисперсионного анализа и t-критерия Стьюдента, при 5 или 0% уровне значимости.



### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

#### 3.1. Определение количества MF3 в клетках *P. fluorescens* (197).

Для определения количества MF3, синтезирующегося в клетках *P. fluorescens*, бактериальную культуру штамма 197 лизировали в буфере с лизоцимом и, поскольку ранее было показано, что MF3 термостабилен, прогревали суспензию 20 мин при 100°C. Методом ИФА определили, что 1 л культуральной жидкости *P. fluorescens* 197 содержал около 50 мкг MF3.

#### 3.2. Создание штамма *E. coli* - суперпродуцента MF3.

Для трансформации клеток *E. coli* использовали плазмидный вектор, содержащий *mf3*-ген и ген устойчивости к ампициллину (маркерный ген). Трансформированный штамм *E. coli* был способен синтезировать MF3 в количестве до 200 мг/л, что значительно превышало содержание данного белка в культуре *P. fluorescens*.

Была разработана простая схема выделения и очистки белка из штамма-суперпродуцента, в основу которой легла его термостабильность (стр.5).

#### 3.3. Исследование фитотоксичности MF3.

##### Изучение влияния MF3 на растения табака.

После инфильтрации в листья табака сорта Xanthu NN водных растворов с концентрациями MF3 от 1 до 1000 мкг/мл обработанные белком листья внешне не отличались от контрольных на протяжении двух недель эксперимента: не было отмечено некротических пятен, деформации либо изменения цвета листовой пластины.

##### Изучение влияния MF3 на растения пшеницы и ячменя.

Инкубация здоровых семян яровой пшеницы и ячменя в водных растворах, содержащих 0,1, 1, 10 или 100 мкг/мл белка не приводила к изменению их всхожести, а также длины корней и листьев проростков по сравнению с соответствующими показателями в контрольном варианте.

### 3.4. Изучение влияния MF3 на вирусные патогены растений.

#### 3.4.1. Вирус табачной мозаики.

##### Определение способности MF3 оказывать прямое действие на ВТМ.

Для того, что бы определить, казывает ли MF3 прямое действие на вирусы, была исследована способность ВТМ инфицировать растения табака после 24-часовой инкубации в растворе белка.

Количество образовавшихся некрозов на листьях табака сорта Xanthu NN, инокулированных интактным препаратом вируса или ВТМ, прошедшим инкубацию с белком, существенно не различалось, в то время как после применения вируса и белка совсем некрозы на листьях не образовывались. В растениях табака сорта Samsun nn, инокулированных вирусом, прошедшим инкубацию в воде или в растворе MF3, содержание ВТМ в соке как инокулированного листа, так и верхних листьев было высоким и между собой статистически не различалось. В то же время, инокуляция растений табака смесью ВТМ и MF3 не приводила к развитию вирусной инфекции в растении.

##### Влияние MF3 на устойчивость листьев табака к ВТМ.

На половинках листьев, обработанных растворами белка с концентрацией от 0 до 1 мкг/мл, после инфицирования наблюдалось снижение количества образовавшихся некрозов. При применении более высоких концентраций MF3 на обработанных половинках некрозы не образовывались, в то же время было отмечено достоверное снижение количества некрозов на контрольных половинках листьев, то есть наблюдался трансламинарный эффект (рис. 1).

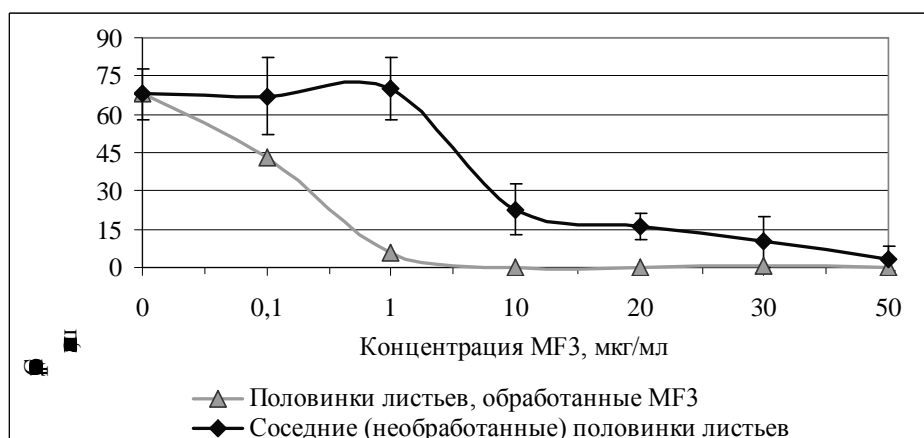


Рисунок 1. Влияние обработки половинок листьев табака раствором MF3 на образование некрозов после инокуляции ВТМ.

### Продолжительность защитного действия MF3 на растения.

Было показано, что однократно обработанные раствором MF3 (1мкг/мл) половинки листьев табака сорта Xanthu NN сохраняли устойчивость к ВТМ на протяжении всего времени эксперимента (три недели), в то же время на контрольных половинках и контрольных листьях некрозы образовывались в большом количестве (рис. 2).

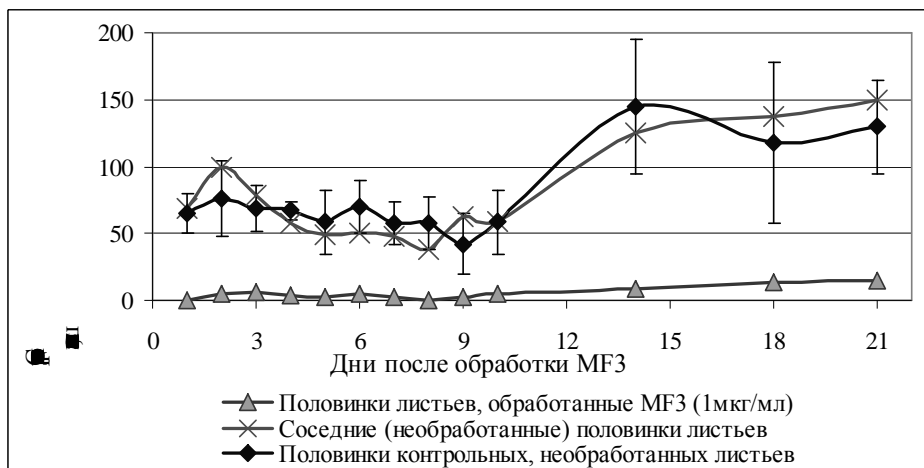


Рисунок 2. Продолжительность защитного действия обработки растений табака сорта Xanthu NN раствором MF3 от ВТМ.

### Исследование способности MF3 индуцировать системную устойчивость к ВТМ у растений табака некрозообразующего сорта.

Один лист первого яруса каждого растения табака сорта Xanthu NN обрабатывали раствором MF3 (100 мкг/мл). После инокуляции ВТМ, на обработанных белком листьях первого яруса некрозы отсутствовали, количество некрозов, образовавшихся на листьях второго и третьего ярусов опытных растений, было существенно меньшим, чем на соответствующих листьях контрольных растений. Уровень защиты растений от ВТМ через сутки и двое после обработки белком существенно не различался.

### Влияние обработки растений табака сорта Samsun nn раствором MF3 на развитие ВТМ.

Растения табака опрыскивали растворами с различным содержанием MF3. Нижний лист, изолированный во время опрыскивания, на следующий день инокулировали ВТМ. Контрольные растения накапливали высокое количество вирусных частиц в соке уже спустя 2 недели после инокуляции. В

то же время на растениях, обработанных даже низкими концентрациями белка (10мкг/мл), развитие болезни значительно задерживалось (рис. 3).

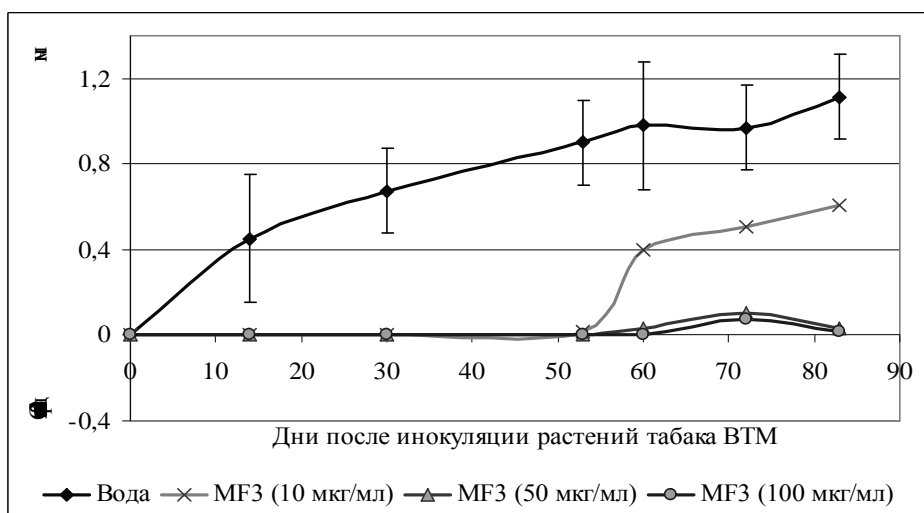


Рисунок 3. Влияние обработки растений табака растворами MF3 на развитие WTМ.

### 3.4.2. Y- вирус картофеля

Обработку растений табака MF3 и инокуляцию вирусом проводили по методике, описанной ранее для табака и WTМ. Содержание вируса в соке инокулированных листьев контрольных растений спустя 13 дней после заражения было высоким, в то время как в листьях опытных растений, обработанных белком, YВК накапливался в существенно меньших количествах. Динамику развития болезни оценивали еженедельно с помощью ИФА верхних неинокулированных листьев (рис.4).

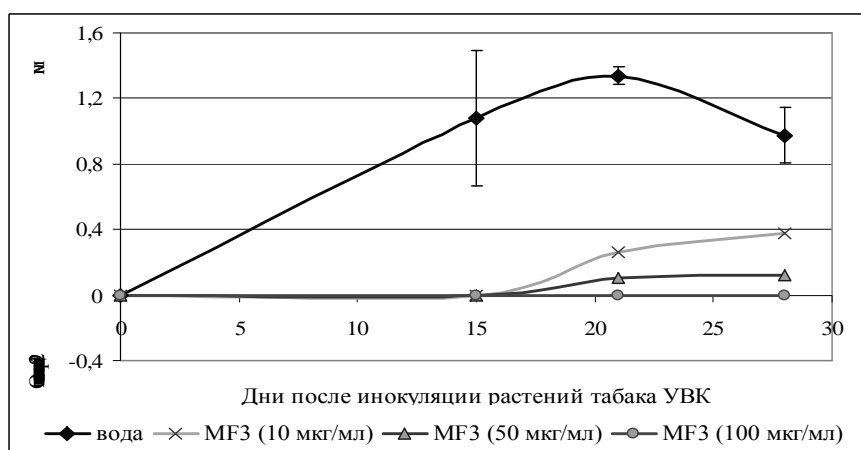


Рисунок 4. Влияние обработки растений табака раствором MF3 на накопление в соке YВК.

К 21-ому дню все контрольные растения были сильно поражены ЮВК, а у растений, обработанных MF3 (10 мкг/мл и 50 мкг/мл), наблюдалась существенная задержка в развитии болезни и полное отсутствие вируса при применении раствора с концентрацией MF3 100 мкг/мл. Таким образом, как и в случае с ВТМ, обработка MF3 вызывала системную устойчивость табака к ЮВК.

### 3.5. Изучение влияния MF3 на грибные патогены растений

#### 3.5.1. Оценка фунгитоксичности MF3 *in vitro*.

Ингибирования прорастания спор *A. longipes* в растворах с концентрациями MF3 0,7; 7 и 70 мкг/мл отмечено не было. Во всех опытах, независимо от использованной концентрации белка, прорастание спор, длина и толщина гиф были сходными между собой и не отличались от контроля. В процессе наблюдений за развитием гриба не было отмечено изменений в скорости роста мицелия в местах внесения белка, цвет и форма колонии не изменялись, следовательно, MF3 не ингибировал рост *A. longipes* и не изменял его культурально-морфологические свойства.

#### 3.5.2. Исследование влияния MF3 на развитие *A. longipes* на растениях табака.

Чтобы исключить прямой контакт между белком и патогеном, опрыскивание растворами MF3 проводили с нижней стороны листьев, а спустя сутки, верхние стороны листьев инокулировали спорами *A. longipes*. Учёт на 10 сутки опыта показал, что на листьях, обработанных растворами белка с концентрацией 7 и 70 мкг/мл, образовалось достоверно меньшее количество некрозов по сравнению с контрольными листьями (рис. 5).

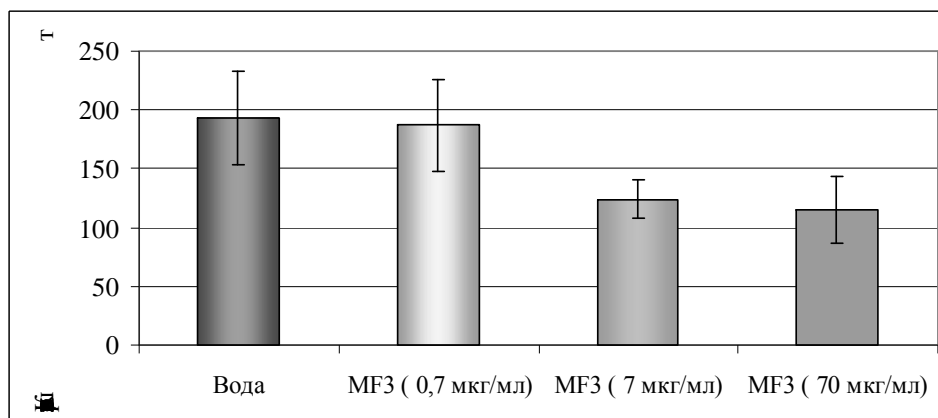


Рисунок 5. Влияние предобработки листьев табака раствором MF3 в различных концентрациях на поражение *A. longipes*.

### 3.5.3. Влияние MF3 на развитие фузариозной корневой гнили пшеницы.

Оценку влияния MF3 на развитие фузариозной корневой гнили (возбудители-виды рода *Fusarium*) осуществляли с помощью рулонного теста. Семена яровой пшеницы сорта Энита, инфицированные в природных условиях, инкубировали три часа в растворах, содержащих 0,1, 1, 10 или 100 мкг/мл MF3. На 10й день проращивания семян в лотках распространённость фузариозной корневой гнили в контроле составила 36,7 %, а развитие болезни 13,2%. В вариантах с обработкой MF3 существенного снижения распространённости и развития фузариозной гнили по сравнению с контролем отмечено не было. Вместе с тем было обнаружено, что замачивание инфицированных семян пшеницы в растворах MF3-белка способствовало развитию нормальной корневой системы у пораженных проростков. Так, корни проростков, выросших из семян, обработанных раствором MF3 с концентрацией 0,1 мкг/мл и выше, были развиты лучше, чем у контрольных растений (рис. 6).

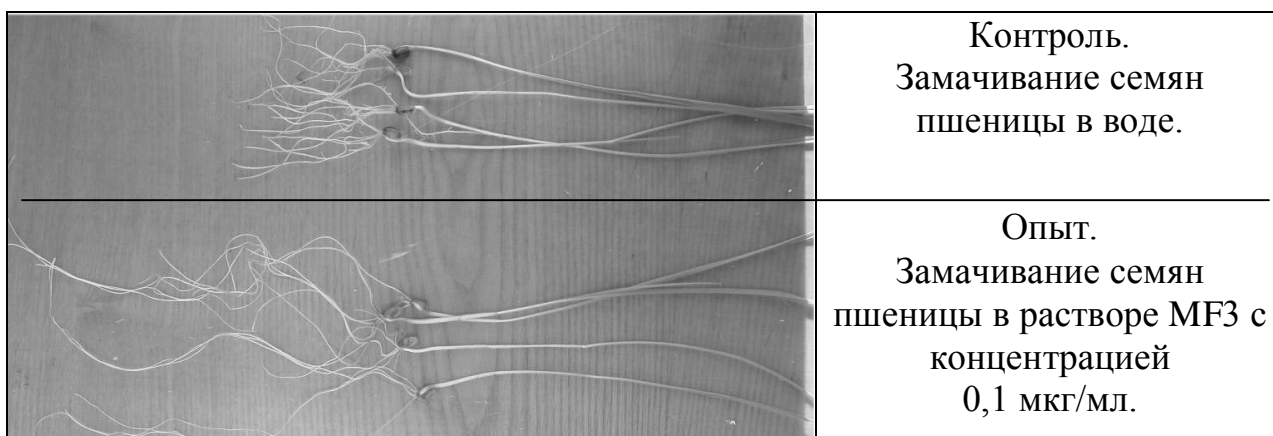


Рисунок 6. Влияние обработки семян пшеницы сорта Энита водой и раствором MF3 на длину корней у развившихся проростков.

### 3.5.4. Исследование влияния MF3 на развитие гельминтоспориозной корневой гнили (*Bipolaris sorokiniana*) ячменя.

Оценку эффективности действия MF3 против гельминтоспориозной корневой гнили проводили на яровом ячмене сорта Зазерский 85. Было выявлено, что инфекционный фон гельминтоспориозной гнили в контроле составил 63,3 % по распространённости и 22,5% по развитию болезни. В вариантах с обработкой веществом максимальное снижение распространённости (до 30% по сравнению с контролем) развития

гельминтоспориоза (до 35% по сравнению с контролем) было отмечено после инкубации семян в растворе с концентрацией MF3 1 мкг/мл. Замачивание семян ячменя в растворах с концентрацией MF3 выше 10 мкг/мл приводило к развитию более длинных корней у проростков по сравнению с контрольными. Длина листьев во всех вариантах опыта различалась незначительно. Кроме того, в варианте с обработкой семян ячменя раствором MF3 в концентрации 0,1 мкг/мл было отмечено увеличение всхожести на 4,5 %.

Обработка заражённых семян растворами MF3, наряду со снижением распространённости и уровня развития гельминтоспориоза при применении белка в концентрации 1 мкг/мл, стимулировала развитие корневой системы у поражённых проростков ячменя и пшеницы, что может указывать на положительное влияние на общий уровень выносливости и устойчивости злаковых растений к корневым гнилям.

### **3.6. Изучение возможности использования низкомолекулярных хитозанов для улучшения проникновения MF3 в растительные ткани.**

Для разработки биопрепаратов на основе белковых элиситоров необходимо учитывать, что для индуцирования устойчивости они должны связаться с рецепторами растений, которые могут находиться как на внешних, так и на внутренних мембранах клеток. (Shiraishi *et al.*, 2001).

Мы предположили, что низкомолекулярный хитозан, благодаря своим положительно заряженным аминогруппам, мог бы образовывать комплекс с отрицательно заряженным MF3 за счёт электростатических связей и способствовать транспорту белка к клеточным рецепторам. Кроме того, применение двух элиситорных веществ разной химической природы, вероятно, могло бы иметь синергетический эффект.

С помощью электрофореза в 10% ПААГ было установлено, что комплексообразование происходит, если MF3 и хитозан присутствуют в соотношении 10 : 3.

### **Изучение способности раствора MF3 в смеси с хитозанами индуцировать устойчивость пшеницы к *St. nodorum***

Для изучения прямого влияния MF3 (100 мкг/мл), хитозана 6 кДа (30 мкг/мл) и смеси этих веществ на развитие *St. nodorum* диски фильтровальной бумаги, пропитанные исследуемыми веществами, помещали по периметру растущей колонии гриба. Было показано, что MF3, хитозан, а так же их смесь

в испытуемых концентрациях при контакте с патогеном не оказывали действия на его рост и развитие (рис. 7). Аналогичные опыты были поставлены с использованием MF3 и хитозанов с молекулярными весами 10 и 17 кДа, а так же смесей белка и этих хитозанов. Ингибирования роста мицелия не было отмечено ни в одном из вариантов опытов.

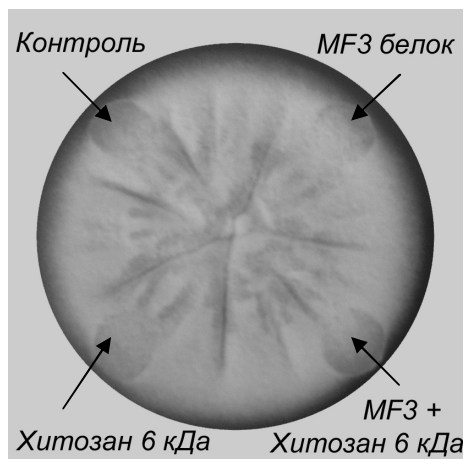


Рисунок 7. Влияние растворов MF3, хитозана и смеси MF3 с хитозаном на развитие мицелия *St. nodorum*.

После того, как было показано, что изучаемый белок, как сам по себе, так и в смеси с хитозанами не оказывает влияния на *St. nodorum in vitro*, были проведены опыты с использованием растений пшеницы. Оказалось, что на участках листьев пшеницы Мироновская 808, обработанных смесями белка с хитозанами, развитие болезни было существенно меньшим по сравнению с контрольными участками листьев (рис. 8). Обработка же листьев растворами индивидуальных веществ, как белком, так и хитозанами, не приводила к подавлению развития болезни. Наилучший эффект был получен при применении белка в смеси с хитозаном 17 кДа, что возможно связано с соответствием их молекулярных масс.

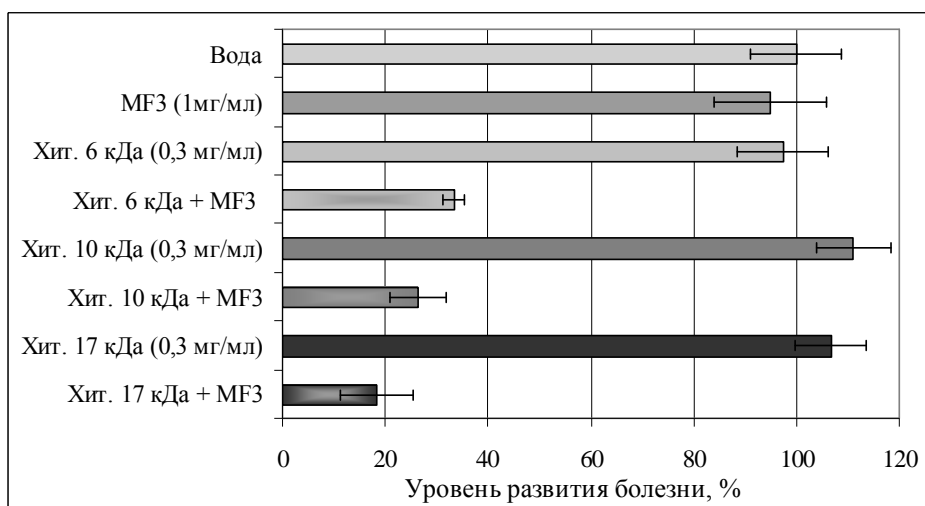


Рисунок 8. Способность раствора MF3 в смеси с хитозанами индуцировать устойчивость пшеницы к *St. nodorum*.



### Влияние обработок растений белокочанной капусты раствором MF3 в смеси с низкомолекулярным хитозаном на заражение ВМТ.

Было показано, что опрыскивание молодых растений белокочанной капусты сорта Krautman раствором белка в смеси с хитозаном не вызывало полного подавления болезни, но накопление в них ВМТ происходило с задержкой, по меньшей мере, на неделю. Развитие вируса на растениях, обработанных чистым белком или хитозаном, происходило столь же быстро, как и в контрольных растениях (рис.9).

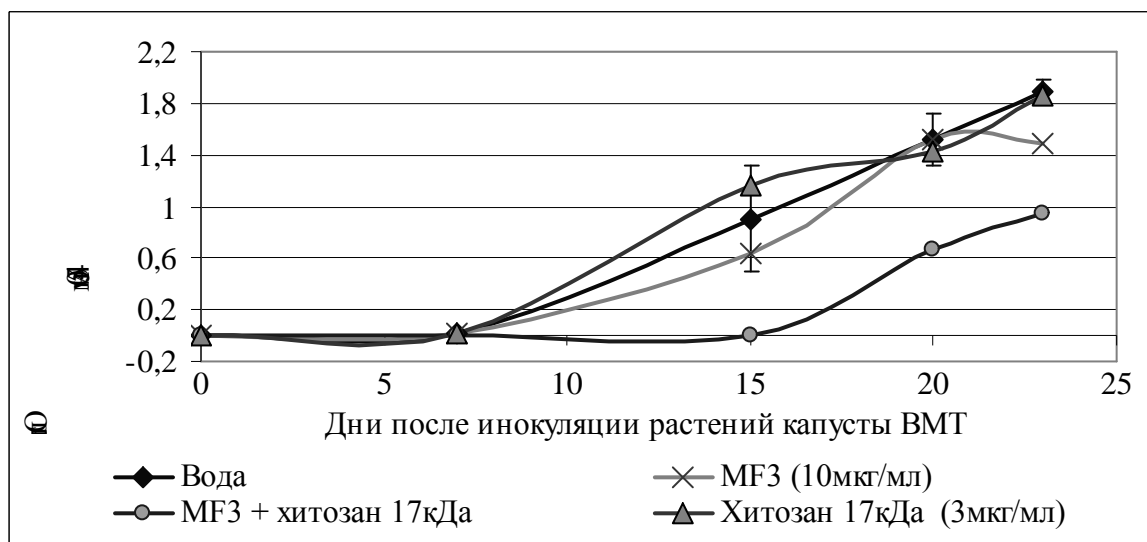


Рисунок 9. Влияние обработки растений белокочанной капусты раствором MF3 в смеси с низкомолекулярным хитозаном на заражение ВМТ.

### 3.7. Анализ нуклеотидной последовательности гена и аминокислотной последовательности белка MF3.

Чтобы определить к какому классу белков принадлежит MF3, проводили поиск гомологичных последовательностей среди имеющихся в GenBank данных, находящихся на сервере NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, Altschul *et al.*, 1987). Последовательность аминокислотных остатков MF3 анализировали с помощью мультисервера ScanProsite (<http://www.expasy.ch/prosite>, Vairoch *et al.*, 1997).

Последовательность аминокислот MF3 оказалась высоко гомологичной последовательностям ферментов пептидил-пролил-*цис/транс*-изомераз (ППИ-аз) FKBP-типа. Самое большое соответствие MF3 наблюдалось с аминокислотными последовательностями ППИ-аз из *Pseudomonas fluorescens* штаммов Pf-5 и PfO-1 (93%). Кроме того, высокая степень гомологии белка

была отмечена и для ППИ-аз из других организмов, например из *Azotobacter vinelandii* (81%) и *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043 (57%).

### Поиск и изучение элиситорного центра MF3 белка.

Для многих белков, индуцирующих устойчивость растений, было показано, что индуцирующей активностью могут обладать не только целый белок, но и его фрагменты. Так растения арабидопсиса специфично распознают N-конец бактериального фактора элонгации Tu (EF-Tu) в результате чего начинается запуск системы защитных ответов. Для активации же этого процесса достаточно пептида elf18, состоящего из 18 аминокислотных остатков (Kunze *et al.*, 2004).

### Поиск консервативных участков MF3 белка.

В процессе изучения MF3-белка нами было выдвинуто предположение, что у MF3 могут существовать последовательности, ответственные за индукцию устойчивости в растениях. В результате проведённого поиска белков, гомологичных MF3, с помощью программы ScanProsite нами было найдено более 45 сходных по составу белков. Следующим этапом работы стал поиск консервативных последовательностей внутри MF3 белка, который привёл к обнаружению в его составе 2-х консервативных областей (рис. 10).



Рисунок 10. Схематическое изображение действия трипсина на MF3 белок. Серым цветом выделены консервативные области, чёрным – наиболее консервативный фрагмент (MF3-29 ак)

Чтобы проверить, не содержат ли данные области последовательность, с которой ассоциирована активность, индуцирующая устойчивость к болезням, был проведён частичный протеолиз белка трипсином, который расщеплял белок на 9 частей, в том числе и внутри консервативных областей (рис. 10).

Потеря или снижение индуцирующей активности MF3 после протеолиза могли свидетельствовать о том, что центр, ответственный за его защитную активность расположен внутри консервативных областей.

#### Проверка биологической активности пептидов - фрагментов MF3.

Активность пептидов, полученных в результате расщепления MF3, проверили с использованием тест системы табак – ВТМ. Было показано, что предобработка листьев табака раствором пептидов, полученных после действия трипсина, не препятствовала развитию на них некроза после заражения ВТМ. То есть, расщепление MF3 внутри консервативных областей лишало его способности индуцировать устойчивость в листьях табака, что свидетельствовало о повреждении той части белка, которая ответственна за индукцию устойчивости.

#### Изучение влияния синтетического олигопептида MF3 - 29 ак) на устойчивость табака к ВТМ.

В состав одной из наиболее консервативных областей входил пептид длиной в 29 аминокислотных остатков PPGLEKALE GKAVGDDLEV AVEREDAYG (MF3 - 29 ак). Этот пептид был химически синтезирован для проверки его способности индуцировать в растениях устойчивость. Опыты были проведены на паре табак- ВТМ. В результате проведённых исследований было показано, что предобработка половинок листьев табака растворами MF3-29ак в трёх различных концентрациях индуцировала устойчивость к ВТМ как обработанных половинок, так и соседних (трансламинарный эффект).

После сравнения эффективностей действия пептида и исходного белка, было показано, что синтетический пептид обладает такими же защитными свойствами, как и целый MF3 белок.

### **3.8. Изучение трансгенных растений, несущих ген MF3 белка.**

#### **3.8.1. Молекулярный анализ трансгенных растений.**

В работе изучалось потомство то самоопыления (T1) трансгенных растений цветной капусты сорта Corso и рапса сорта Westar со вставкой *mf3* гена и гена *nptII* в качестве маркерного. Поскольку в T1 потомстве происходит расщепление растений на трансгенные и нетрансгенные, то выросшие из семян растения анализировали методом ПЦР с генспецифическими праймерами на наличие в них *mf3* гена. Для каждой линии были проанализированы в общей сложности от 30 до 60 растений. Расщепление в T1- потомстве трансгенных растений приведено в таблице 1.

Классическое менделевское расщепление 3:1 было выявлено только у линии рапса T25/3. Возможно, материнское трансгенное растение содержало 1 вставку целевого гена. В остальных случаях расщепление было отличным от классических. В потомстве некоторых трансгенных растений, например T32/6 и 1a1, растения со вставкой гена отсутствовали, что может говорить о том, что материнские растения были химерными, то есть содержали клетки как со вставкой целевого гена, так и без неё.

Таблица 1. Характеристика потомства от самоопыления трансгенных растений.

Линия трансгенного растения	Соотношение растений со вставкой <i>mf3</i> гена и без вставки	Средний уровень экспрессии MF3 в растениях, пг/ мг растительной ткани
Westar нетрансгенный контроль	0/все без вставки	0
1a1	0/все без вставки	0
1a/3	8/3	3
1a/7	Все со вставкой/0	30
T25/3	3/1	33
T25/8	8/1	34
T25/9	Все со вставкой/0	3
T25/12	11/1	26
Korso нетрансгенный контроль	0/все без вставки	0
T32/6	0/все без вставки	0
T32/7	15/1	37

Известно, что в результате трансформации чужеродная ДНК встраивается случайным образом в хромосомы растения, причем в один локус может встраиваться несколько копий гена (Bhat and Srinivasan, 2002). Для того, чтобы определить количество локусов, содержащих целевой ген, некоторые растения из T1- потомства трансгенных линий были проанализированы при помощи гибридизации по Саузерну.

Оказалось, что в большинстве растений содержится более чем одна вставка *mf3* гена. При этом у растений, выросших из семян одного растения, количество локусов с *mf3* геном было как одинаковым (линия T32/7 - 6

локусов, линия 1a3-5 локусов), так и различным (линия T25/3- 1 или 3 локуса, линия T25/1 – один или 2 локуса).

Присутствие целевого гена в геноме растения еще не гарантирует, что данный ген будет экспрессироваться. Поэтому следующим этапом работ стал анализ уровня синтеза целевого белка MF3 в растениях, который проводили при помощи ИФА с антителами к MF3. Было показано (табл. 1), что уровень экспрессии белка в растениях рапса и цветной капусты составлял от 0 до 37 пг на мг сырой растительной ткани.

### 3.8.2. Оценка устойчивости трансгенных растений рапса и цветной капусты к фитопатогенам.

#### Изучение устойчивости трансгенных растений рапса к ВМТ.

Вирусом инокулировали нижний лист трансгенных растений. Кроме того, проводили заражение и растений, у которых ген *mf3* не был обнаружен (эти растения служили контролем). Спустя 2 недели после инокуляции все растения рапса линий T1a3 и T1T25/12 были достоверно меньше поражены вирусом (табл.2).

Таблица 2. Уровень устойчивости трансгенных растений рапса к ВМТ.

Линия	Количество растений, шт	Количество растений с достоверно меньшим развитием вирусной инфекции по сравнению с контролем, %	
		14 день опыта	20 день опыта
T1-1a3	6	100	83,3
T1-1a7	10	50	0
T1-T25/3	6	33,3	16,7
T1-T25/12	5	100	60
Контроль	5	Оптическое поглощение при 450 нм	
		0,91±0,2	2,6±0,11

К 20-му дню эксперимента у некоторых растений вышеуказанных линий было зафиксировано увеличение содержания вируса, но по-прежнему, большая часть трансгенных растений не была поражена ВМТ. В растениях линий T1-1a7 и T1-T25/3 накопление вируса происходило существенно менее интенсивно по сравнению с контрольными растениями. Задержка в развитии вируса составляла около недели. Следует отметить, что не всегда более высокий уровень экспрессии MF3 обеспечивал более высокую степень устойчивости. Так, растения, у которых содержание белка различалось в 8

раз, обладали одинаково высокой устойчивостью к ВМТ. Возможно для приобретения устойчивости растениям рапса достаточно и небольших количеств MF3.

Изучение устойчивости трансгенных растений рапса и цветной капусты к *Plasmodiophora brassicae*.

Для определения влияния экспрессии гена MF3 белка в растениях на уровень их устойчивости к *Pl. brassicae*, так же как и в предыдущем опыте, использовали трансгенные проростки семенного потомства трансформированных растений в качестве опытных, а нетрансгенные проростки в качестве контроля. Анализ развития болезни проводили через 50 дней после инокуляции.

Для каждого семенного потомства был рассчитан процент поражённых растений. Было показано, что лишь растения рапса линии T25/9 интенсивно поражались *Pl. brassicae*, развитие болезни на корнях остальных трансгенных растений было существенно ниже, чем у контрольных растений (рис. 11).

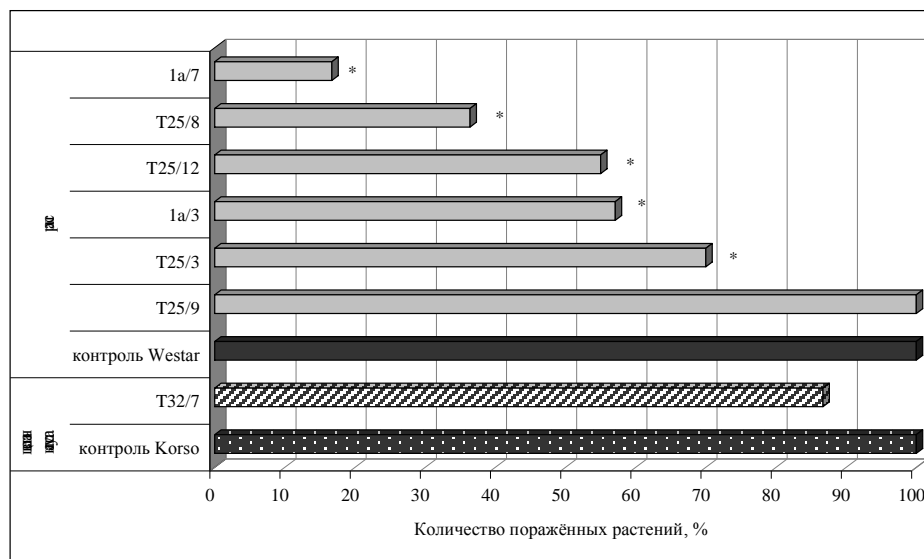


Рисунок 11. Устойчивость трансгенных растений рапса и цветной капусты к *P. brassicae*.

Семенное потомство трансгенной цветной капусты не показало высокого уровня устойчивости к *Pl. brassicae*, что, впрочем, может быть связано с недостаточным количеством испытываемых линий.

Большинство растений рапса, экспрессирующих ген *mf3*, в меньшей степени поражались ВМТ и *Pl. brassicae*, что делает их, несомненно, привлекательными для использования в дальнейшей селекции сорв, устойчивых к вирусным и грибным патогенам.

#### 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

Результаты исследования показали многогранность действия MF3 на растения. MF3 не оказывал фитотоксичного действия на растения табака, ячменя и пшеницы более того, на проростках пшеницы и ячменя заражённых корневыми гнилями, было показано, что обработка белком способствовала развитию нормальной корневой системы. Продемонстрированная способность MF3 индуцировать в растениях устойчивость к ряду вирусных и грибных патогенов без прямого влияния на вредный организм может быть использована для разработки новых средств защиты от болезней. Первым шагом к созданию препаративных форм биопестицидов на основе MF3 может стать использование хитозана, как возможного носителя белка, обеспечивающего его доступ в растительные ткани. Экспериментальным путём удалось подобрать оптимальное соотношение белка и хитозана для формирования активного комплекса. Использование такого комплекса позволило повысить защитный эффект белка и расширить спектр его действия против патогенов.

Сравнительный анализ первичной структуры MF3 позволил отнести данный белок к ППИ-азам FKBP-типа и идентифицировать в нём фрагмент, ответственный за индуцирующую активность данного белка. Изучение защитных свойств синтезированного пептида, являющегося функциональным центром белка, ответственным за индукцию устойчивости, показало, что он не менее эффективно защищал растения табака от ВТМ, чем исходный белок.

Результаты исследования семенного потомства трансгенных растений рапса и цветной капусты дают основание заключить, что экспрессия гена MF3 не оказывала негативного влияния на морфологию и развитие растений. Трансгенные растения рапса показали повышенный уровень устойчивости к грибному (*Plasmodiophora brassicae*) и вирусному (вирус мозаики турнепса) фитопатогенам. Это означает, что данные растения могут быть включены в процесс селекции новых сортов, устойчивых к этим патогенам.

Таким образом, MF3 может быть использован для контроля ряда болезней растений как в качестве основы для разработки новых экологически безопасных биопестицидов, так и для создания устойчивых трансгенных растений.

## 5. ВЫВОДЫ.

1. Создан штамм *E. coli* - суперпродуцент MF3 и оптимизирована схема выделения и очистки данного белка.
2. Показано что у MF3 отсутствуют:
  - фунгитоксичность по отношению к *St. nodorum* и *A. longipes*,
  - прямое влияние на инфекционность ВТМ,
  - фитотоксичность по отношению к табаку и злаковым растениям.
3. Показана способность MF3 защищать растения табака от ВТМ, Y-ВК и *A. longipes* а так же растения ячменя от *B. sorokiniana*.
4. Обнаружено стимулирующее действие MF3 на развитие корневой системы у растений пшеницы и ячменя, заражённых фузариозной и гельминтоспориозной корневыми гнилями.
5. Впервые показана способность MF3 образовывать комплекс с хитозаном, что усиливает защитный эффект данного белка в таких системах растение-хозяин – патоген, как белокачанная капуста – вирус мозаики турнепса, пшеница – *St. nodorum*.
6. Найдена гомология между MF3 и пептидипролил-*цис/транс*-изомеразами FKBP-типа.
7. В результате анализа первичной структуры MF3-белка идентифицирована последовательность, состоящая из 29 аминокислотных остатков, ответственная за способность MF3 индуцировать устойчивость табака к ВТМ.
8. Установлено, что трансгенные растения рапса обладают повышенной устойчивостью к патогенному грибу *Pl. brassicae* и вирусу мозаики турнепса.



## 6. СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

1. **Shumilina D.V.**, Voinova T.M., Battchikova N.A., Korpela T., Dzhavakhiya V.G. Elicitor activity of MF-3 protein from *Pseudomonas fluorescens* and combination MF3-protein with chitosan in different host-pathogen pairs. Euchis '04, 6th International Conference of the European Chitin Society, Poznan, Poland, August 31 – September 3, 2004.- P. 39.
2. **Shumilina D.V.**, П'ина A.V., Kulikov S.N., Dzhavakhiya V.G. Elicitor activity of MF-3 protein from *Pseudomonas fluorescens* and combination of MF3-protein with chitosan in different host-pathogen pairs. "Advances in Chitin Sciences" Poznan, Poland, 2005 vol. VIII.- P.275-278.
3. **Шумилина Д.В.**, Кромина К.А., Джавахия В.Г. Индуктор неспецифической устойчивости растений – Микробный Фактор 3 (MF3) – выделенный из ризосферной бактерии *Pseudomonas fluorescens* может быть использован как высокоэффективный биопестицид широкого спектра действия // Материалы 2-ой Международной конференции Наука – Бизнес – Образование, Биотехнология – Биомедицина – Окружающая среда». 1013 мая 2005, Пущино. – С. 151-152.
4. **Daria Shumilina**, Vitaly Dzhavakhiya A New Approach to Development and Practical Application of Biopesticides Based on the *Pseudomonas fluorescens* Protein - Inductor non Specific Plant Resistance to Fungal, Viral and Bacterial Disease. The 10 ISTC/Korea workshop: Industrial applications of Russia's new biotechnologies, March 14-15, 2006.- P.64-67
5. **Daria Shumilina**, Maria Kuznetsova and Vitaly Dzhavakhiya Studing the elicitor activity of mf3 protein from pseudomonas fluorescens in different host - pathogen pairs XIII Conference "New achievements in biological control of plant diseases", Bydgoszcz, Poland, 25-26 April 2006.- P. 79-82.
6. Куликов С.Н., Чирков С.Н., Ильина А.В., Лопатин С.А., **Шумилина Д.В.**, Джавахия В.Г. Использование хитозана для защиты растений от вирусных инфекций. Материалы восьмой международной конференции Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана, Казань 1217 июня 2006.- С.330-332
7. **Daria Shumilina**, Ksenia Kromina, Vitaly Dzhavakhiya A New Approach to Development and Practical Application of Bio-pesticides Based on the bacterial proteins – Inductors of Non Specific Plant Resistance to Fungal, Viral and Bacterial Pathogens. Материалы 3-ей Международной конференции «Наука и Бизнес». – 2006. - 19-21 июня. - г. Пущино. – С. 161-164.
8. **Шумилина Д.В.**, Воинова Т.М., Джавахия В.Г.. Микробный фактор3-база для создания новых биопестицидов. Защита и карантин растений- №10.- 2006 .- С. 20-21.
9. Куликов С.Н., **Шумилина Д.В.**, Джавахия В.Г., В.П. Варламов, К.Г. Скрыбин Изучение комплексообразования между MF3-белком из *Pseudomonas fluorescens* и низкомолекулярным хитозаном и исследование элиситорных свойств оптимизированного комплексного препарата. «Индукцированный иммунитет сельскохозяйственных культур – важное направление в защите растений» 15 –16 ноября 2006, ВНИИФ Голицыно.- С. 26-28

10. **Shumilina D.**, Kramer R., Klocke E., Dzhavakhiya V.. MF3 (peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase of FKBP type from *Pseudomonas fluorescens*) – an elicitor of non-specific plant resistance against pathogens. *Phytopathol. Pol.*, 2006. V.41.- P. 39-49.
11. **Daria V. Shumilina**, Alla V. Ilyina, Valery P. Varlamov, Vitaly G. Dzhavakhiya Studing the protection activity of MF3 protein from *Pseudomonas fluorescens* in different host - pathogen pairs. Joint International Workshop on: PR-P roteins and induced resistance against pathogens and insects Doorn, the Netherlands, May 10-14, 2007.- P.104.
12. **Д.В. Шумилина**, В.Г. Джавахия Изучение способности MF3 (пептидил-пролил цис-транс изомеразы FKBP типа) из *Pseudomonas fluorescens* повышать устойчивость растений табака к вирусным и грибным патогенам. *Агро 21 век* в печати 27.02.2007

**Патент:**

Dzhavakhia V., Filipov A., Skryabin K., Voinova T., Kouznetsova M., Shulga O., **Shumilina D.**, Kromina K., Pridannikov M., Battchikova N., Korpela T. Proteins inducing multiple resistance of plants to phytopathogens and pests. Patent PCT WO2005/061533 A1, дата публикации 2005-07-07.

Автор выражает глубокую благодарность своему научному руководителю Виталию Георгиевичу Джавахия за поддержку в ходе выполнения работы, а также Ларе АлександровнеЩербаковой за внимательное чтение рукописи диссертации и обсуждение результатов работы. Т.Б. Костальевой и Н. В. Гирсовой автор благодарен за помощь при проведении дифференциально центрифугирования ВТМ, Л. Л. Дорофеевой - за помощь в проведении рульных тестов, В.П. Варламову и С.Н.Куликову - за предоставление препаратов хитозанов и консультации при работе с ним.

Особую благодарность автор ~~вырает~~ К.А. Кроминой М.В. Приданникову и всем сотрудникам лаборатории молекулярной биологии ВНИИФ за поддержку, советы и дружеское участие, а так же тем, кто стал его учителем во время стажировки в Институте декоративных растений (Германия), а именно: Эвелин Клоке, Мартине Малони и Элке Зьяба.