

# Экспрессия генов лектина и дефенсина у сортов пшеницы Мироновская 808 и Roazon при инфицировании *Pseudocercospora herpotrichoides*

В. Н. Белава, С. Б. Зеленый<sup>1</sup>, О. А. Панюта, Н. Ю. Таран, П. В. Погребной<sup>1</sup>

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко  
Ул. Владимирская, 64, Киев, Украина, 01033

<sup>1</sup>Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р. Е. Кавецкого НАН Украины  
Ул. Васильковская, 45, Киев, Украина, 03022

v987@ukr.net

---

**Цель.** Исследовать динамику экспрессии генов защитных белков (лектина и дефенсина) разных генотипов озимой пшеницы, пораженных *P. herpotrichoides*. **Методы.** Экспрессию генов определяли при помощи реакции RT-PCR. **Результаты.** Содержание мРНК лектина в контроле и при инфицировании *P. herpotrichoides* у относительно резистентного сорта (Roazon) значительно выше, чем у восприимчивого (Мироновская 808). Характер содержания мРНК дефенсина у исследуемых сортов в контроле и при инфицировании не меняется, но границы колебаний абсолютных значений у восприимчивого сорта шире. **Выводы.** Запасной пул мРНК лектина у резистентного сорта гораздо массивней, чем у восприимчивого, что, вероятно, является одной из составляющих устойчивости сорта. Неспособность поддерживать постоянно высокий уровень экспрессии генов защитных соединений негативно влияет на устойчивость сорта.

**Ключевые слова:** лектины, дефенсины, мРНК, церкоспореллез, пшеница.

---

**Введение.** Биохимические взаимоотношения патогена и растения-хозяина в процессе инфицирования выявляют сложные регуляторные связи между двумя организмами. Исследование таких взаимосвязей на уровнях от организма до клетки свидетельствует о том, что на разных этапах развития болезни активируются различные механизмы атаки патогена и защиты растения. Устойчивость растений к патогенам определяется сложными взаимозависимыми системами, контролируемые генетически. Самыми сложными из механизмов защиты для распознавания и уничтожения отдельных видов атакующих патогенных клеток обладают антимикробные соединения.

Первичными веществами, отвечающими за процесс распознавания чужеродного агента, его связывание, предотвращение или замедление процесса инфицирования, являются низкомолекулярные белки лектины. Они также участвуют в формировании иммунитета растений как начальное звено элиситор-индуцированного запуска сигнальных систем растительной клетки. Гипотезы об участии лектинов в защите растений от болезнетворных агентов подкреплены данными о способности лектинов специфически взаимодействовать с поверхностью бактериальных клеток, спор и гиф грибов [1], что приводит к несовместимому или совместимому взаимодействию организмов, которое соответственно проявляется в индукции или в отсутствии защитной реакции растений на атаку патогена.

С другой стороны, врожденный иммунитет обусловлен наличием (или способностью к быстрому синтезу) определенного количества антимикробных соединений и их активации при действии экзогенного элиситора [2]. Одним из классов таких соединений являются растительные дефенсины – минорные пептиды, в микромолярных концентрациях [3] проявляющие антимикробную активность против широкого спектра фитопатогенных грибов, а также возбудителей болезней человека [4, 5]. Кроме того, они включают сигнальные каскады [6], вызывают морфологические изменения грибных гиф [7, 8].

Экспериментальные данные свидетельствуют об экспрессии генов растительных дефенсинов в ответ на грибную атаку, что, в свою очередь, увеличивает устойчивость растений к вредоносным агентам [9].

Учитывая, что активные реакции на атаку болезнетворного агента обычно связаны с изменением экспрессии генов, кодирующих патоген-индуцируемые белки [10], цель данной работы состояла в исследовании динамики экспрессии генов лектинов и дефенсинов при формировании иммунного ответа разных по уровню устойчивости сортов озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.), пораженных возбудителем церкоспореллеза (*P. herpotrichoides* (Fron) Deighton), на ранних этапах онтогенеза.

**Материалы и методы.** Объектами исследования служили проростки озимой пшеницы (*T. aestivum* L.) восприимчивого к церкоспореллезу сорта Мироновская 808 (украинской селекции) и относительно резистентного сорта Roazon (французской селекции), отобранные на основе литературных данных и предварительно проведенного нами скрининга сортов на устойчивость [11]. Для инфицирования использовали суспензию конидий с исходным титром (5–7)  $10^4$  КОЕ/см<sup>3</sup> [11] (КОЕ – колониеобразующие единицы) высоковирулентного штамма 543 7/1 *P. herpotrichoides* (Fron) Deighton (синоним *Cercospora herpotrichoides*, телеоморфой считается гриб *Tapesia yallundae* (Wallwork & Spooner), синоним *Oculimacula yallundae* [12]), любезно предоставленного лабораторией иммунитета сельскохозяйственных растений против болезней Института защиты растений УААН.

Экспрессию генов лектина *WGA-B* (В-лектина – *TaGLLc*) и дефенсина (*Tad1*) определяли при помощи RT-PCR (полимеразно-цепная реакция с обратной транскрипцией) [13]. Начальный уровень транскриптов определяли через 24 ч с начала первого увлажнения исследуемых семян – в момент инокуляции конидиальной суспензией. Последующие образцы отбирали каждые 1,5 ч (на протяжении 6 ч). Проростки фиксировали в жидком азоте, тотальную РНК выделяли методом кислото-фенольной экстракции по стандартной схеме [14]. Данные о нуклеотидных последовательностях генов лектина и дефенсина *T. aestivum* получены из нуклеотидной базы National Center for Biotechnology Information US (PubMed). Праймеры подбирали при помощи программы «Primer detection» (наиболее подходящими оказались для лектина: 5'-gcatgagcatcttcagctca-3', 5'-ctgtccaagacgacggacta-3'; для дефенсина: 5'-ttccgtttcctttacgtgct-3', 5'-atcagcaggtttgttgaac-3'). Использовали олигонуклеотидные затравки фирмы «Biolabtech». Расчет относительного количества фореграмм осуществляли с применением программы TotalLab. Интенсивность окрашивания фореграмм рассчитывали как количество пикселей, данные фиксировали в условных единицах (у. е.).

Для уверенности в том, что на результаты RT-PCR экспрессии мРНК генов лектина и дефенсина растений при инфицировании не влияют мРНК гриба *P. herpotrichoides*, отдельно выполнены RT-PCR мРНК исследуемых генов *T. aestivum* мицелия и конидий гриба. Отсутствие продуктов PCR с кДНК лектина и дефенсина гриба объясняется тем, что праймеры, подобранные для аминокислотных последовательностей растительных нуклеиновых кислот, не запускают соответствующего синтеза с кДНК гриба.

Результаты обработаны статистически, их считали достоверными при уровне погрешности 5 % по критерию Стьюдента.

**Результаты и обсуждение.** Согласно данным Лепехина и др. [15], во время прорастания семян на ранних этапах развития проростка синтезируется значительное количество лектинов. Кроме того, с использованием ингибитора транскрипции мРНК доказано существование в зародышах пшеницы пула запасных форм лектиновых мРНК [16], что обес-

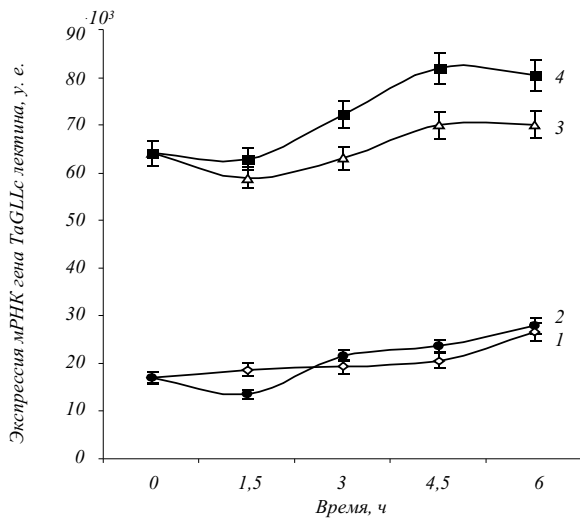


Рис. 1. Изменение экспрессии мРНК гена *TaGLLc* лектина проростков *T. aestivum* при инфицировании *P. herpotrichoides* по результатам RT-PCR: 1, 2 – Мироновская 808 – контроль и инфицирование соответственно; 3, 4 – Roazon – контроль и инфицирование соответственно

печивает быстрое возрастание лектиновой активности за счет синтеза белка *de novo*.

Наши исследования экспрессии гена лектина в здоровых проростках восприимчивого к церкоспореллезу сорта Мироновская 808 показали постепенное накопление мРНК в течение 6 ч эксперимента (рис. 1). Это, вероятно, объясняется тем, что экспрессия генов защитных белков происходит не только в условиях патогенеза или под влиянием элиситоров, а и в ходе нормального онтогенеза растений – прорастания семян, цветения, старения тканей. Индукцию таких достаточно специфических по отношению к фитопатогенам стрессовых молекул, как защитные белки, рассматривают в качестве запуска механизма преадаптации растений к возможному инфицированию, поскольку этот стрессовый фактор значительно снижает жизненный потенциал растений и делает их более чувствительными к патогенной агрессии [17].

При инфицировании картина меняется. На ранних этапах инфекции в условиях развития защитных реакций в растениях возрастает активность ряда ферментов, имеет место синтез *de novo* мРНК и белков [18]. Известно, что супрессоры гриба, угнетающие устойчивость растений к инфицированию, также ингибируют защитную биосинтетическую активность поврежденных тканей [19]. Иммуно-

супрессия является неотъемлемой особенностью паразитизма, а иммуносупрессоры выступают естественными антагонистами элиситоров и индуцируют в растительных тканях восприимчивость к болезням. В исследованиях Медведевой и др. [19] показано, что действие супрессоров направлено на ингибирование новообразования белка. Это определяет активацию тканей, индуцированную распознаванием растением патогена.

Логично предположить, что подобное ингибирование новообразования защитных белков супрессорами гриба также происходит либо непосредственно на уровне транскрипции, либо на уровне сигнальных систем, активирующих транскрипцию. Именно этим можно объяснить существенное уменьшение количества мРНК в инфицированных проростках восприимчивого сорта Мироновская 808 через 1,5 ч с момента инфицирования. Последующее накопление мРНК, по-нашему мнению, обусловлено включением других сигнальных систем, активирующих защитные механизмы, а именно – преодоления растением супрессорного действия гриба.

Для резистентного сорта Roazon исследование динамики количества лектиновой мРНК в здоровых проростках выявило незначительное колебание (в пределах 8 %) этого показателя, что объясняется активными ростовыми процессами и биосинтезом большого количества других белков. Между тем, наблюдается тенденция к постепенному накоплению мРНК.

Изучение динамики количества мРНК в инфицированных проростках резистентного сорта показало незначительное уменьшение содержания мРНК через 1,5 ч. Вероятно, его нельзя рассматривать как ингибирующее действие грибных супрессоров. То есть можно считать, что первые заметные изменения количества лектиновой мРНК отмечаются через 3 ч с начала инфицирования. К этому времени количество лектиновой мРНК составляет 112 % от уровня в момент инфицирования, а через 4,5 ч – уже 128 %. Таким образом, в ответ на действие патогена происходит экспрессия гена лектина и накопление мРНК.

Сравнение результатов исследования накопления мРНК лектина в тканях пшеницы восприимчи-

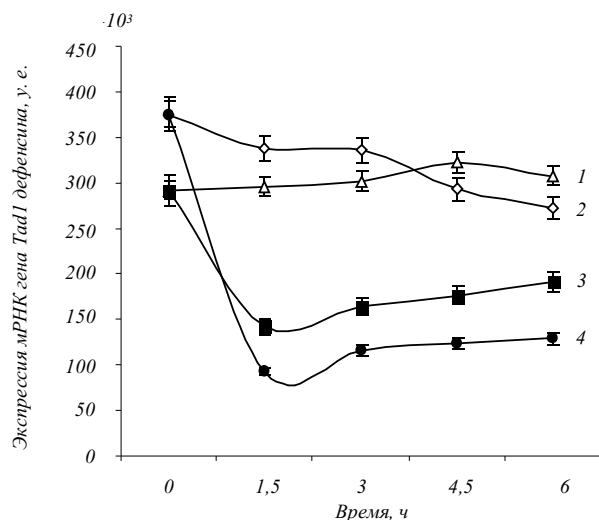


Рис. 2. Изменение экспрессии мРНК гена *Tad1* дефенсина проростков *T. aestivum* при инфицировании *P. herpotrichoides* по результатам RT-PCR: 2, 4 – Мироновская 808 – контроль и инфицирование соответственно; 1, 3 – Roazon – контроль и инфицирование соответственно

вого и относительно резистентного сортов показывает, что и в контроле, и при инфицировании этот показатель для сорта Roazon значительно превышает показатель для сорта Мироновская 808: в 2,6–3,8 раза в контроле и в 2,9–4,7 раза при инфицировании. Это означает, что запасной пул мРНК лектина у резистентного сорта гораздо массивнее, чем у восприимчивого. Последнее, вероятно, является одним из звеньев устойчивости сорта.

Изучение динамики экспрессии гена дефенсина в проростках восприимчивого и относительно резистентного сортов пшеницы при инфицировании *P. herpotrichoides* выявило иную картину. В контрольных проростках восприимчивого сорта Мироновская 808 на протяжении эксперимента наблюдалось уменьшение количества дефенсиновой мРНК, что не противоречит данным о наличии ДНК-производных транскриптов в дозревающих и спелых семенах и о практически полном их отсутствии в здоровых неинфицированных листьях [9] (рис. 2).

С момента инфицирования наблюдается значительный спад (в 4 раза) количества мРНК дефенсина в проростках восприимчивого сорта уже через 1,5 ч, а далее – его постепенное увеличение. Но даже через 6 ч после инфицирования оно в 3 раза ниже начального. Вероятно, это объясняется ингиби-

рующим действием иммуносупрессоров патогена на экспрессию генов дефенсина.

Анализ изменения содержания мРНК дефенсина в проростках резистентного сорта Roazon показал, что в контроле снижения количества транскриптов за время эксперимента не происходит, а, наоборот, отмечается незначительное повышение. По-нашему мнению, это согласуется с данными Террас с соавт. [9] о том, что во время прорастания семян происходят эвакуация дефенсинов в окружающее пространство и формирование собственной микросреды, в которой угнетается рост грибов. Скорее всего, именно для такого преадапционного синтеза защитного белка и формирования микросреды в это время в тканях проростков резистентного сорта на высоком уровне поддерживается экспрессия генов дефенсина и, возможно, формируется запасной пул мРНК.

При инфицировании в проростках резистентного сорта наблюдается уменьшение количества мРНК вдвое, но темпы восстановления уровня мРНК выше, чем для восприимчивого сорта, в 2 раза. Вероятно, скорость восстановления способности к экспрессии генов защитных белков является одним из показателей, определяющих степень устойчивости сорта.

Сопоставление результатов исследования накопления мРНК дефенсина в тканях пшеницы восприимчивого и относительно резистентного сортов свидетельствует о том, что и в контроле, и при инфицировании характер изменения этого показателя для разных по устойчивости сортов сохраняется. Но границы и соответственно колебания абсолютных значений для восприимчивого сорта шире, чем для относительно резистентного. Другими словами, в данном случае неспособность поддерживать постоянно высокий уровень экспрессии генов защитных соединений негативно влияет на устойчивость сорта.

**Выводы.** На основании результатов исследования динамики экспрессии генов лектина и дефенсина в проростках разных по уровню устойчивости сортов озимой пшеницы, инфицированных *P. herpotrichoides*, установлено, что стрессорное действие фитопатогена изменяет содержание и соотношение в растительных тканях изучаемых нами

транскриптов генов антимикробных веществ – лектинов и дефенсинов. Выявлено, что в неинфицированных проростках исследуемых сортов наблюдается повышение экспрессии лектиновой мРНК. В тканях проростков пшеницы резистентного сорта этот показатель значительно выше, чем у проростков восприимчивого, как в контроле, так и при инфицировании. То есть запасной пул мРНК лектина у резистентного сорта гораздо массивнее, чем у восприимчивого, что, вероятно, является одной из составляющих устойчивости сорта.

Изучение динамики экспрессии мРНК гена дефенсина в неинфицированных проростках показало, что в то время как у восприимчивого сорта этот показатель уменьшается, у резистентного сорта – наоборот, несколько увеличивается. При инфицировании характер изменений этого показателя для разных по устойчивости сортов сохраняется. Но границы и соответственно колебания абсолютных значений для восприимчивого сорта шире, чем для относительно резистентного. В данном случае неспособность поддерживать постоянно высокий уровень экспрессии генов защитных соединений негативно влияет на устойчивость сорта.

Выявленные изменения и отличия в содержании мРНК защитных минорных белков лектина и дефенсина в тканях разных по устойчивости сортов пшеницы при инфицировании возбудителем церкоспореллеза, безусловно, характеризуют эти белки как важную составляющую в формировании адаптивных реакций к патогенезу. Ингибирующее действие иммуносупрессоров патогена на экспрессию генов защитных белков определяет степень индуцированной резистентности растений озимой пшеницы к патогену в зависимости от уровня накопления мРНК минорных защитных белков – лектинов и дефенсинов.

V. N. Belava, S. B. Zeleniy, O. O. Panyuta, N. Yu. Taran,  
P. V. Pogribniy

Expression of lectin and defensin genes in Mironovskaya 808 and Roazon wheat cultivars infected with *Pseudocercospora herpotrichoides*

Summary

**Aim.** The dynamics of expression of protective proteins (lectin and defensin) genes of different genotypes of the winter wheat, affected by *P. herpotrichoides*, was investigated. **Methods.** RT-PCR was

used for gene expression analysis. **Results.** We established that the lectin mRNA content in control and infecting plants of the resistant cultivar is considerably higher than in the susceptible one; the character of defensin mRNA accumulation in the investigated cultivars, control and infecting plants, does not change. **Conclusion.** The spare pool of lectin mRNA in the resistant cultivar is more substantial, than in the susceptible one, that is, possibly, one of the factors of the plant resistance. Inability to support constantly a high level of the protective genes expression seems to influence negatively on the cultivar resistance.

Keywords: lectin, defensin, mRNA, eyespot, wheat.

V. N. Belava, S. B. Zeleniy, O. O. Panyuta, N. Yu. Taran,  
P. V. Pogribniy

Експресія генів лектину та дефенсину у сортів пшениці Миронівська 808 та Roazon за інфікування *Pseudocercospora herpotrichoides*

Резюме

**Мета.** Дослідити динаміку експресії генів захисних білків (лектину та дефенсину) різних генотипів озимої пшениці, уражених *P. herpotrichoides*. **Методи.** Експресію генів визначали за допомогою RT-PCR. **Результати.** Вміст мРНК лектину у контролі та за інфікування *P. herpotrichoides* у відносно резистентного (Roazon) сорту вищий, ніж у сприйнятливого (Миронівська 808). Характер накопичення мРНК дефенсину у досліджуваних сортів у контролі та за інфікування не змінюється, але межі коливання абсолютних значень у сприйнятливого сорту ширші. **Висновки.** Запасний пул мРНК лектину у резистентного сорту набагато масивніший порівняно зі сприйнятливим, що, можливо, є однією із складових стійкості сорту. Нездатність підтримувати постійно високий рівень експресії генів захисних сполук негативно впливає на стійкість сорту.

Ключові слова: лектини, дефенсини, мРНК, церкоспорелоз, пшениця.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Etzler M. E. Are lectins involved in plant – fungus interactions? // *Phytopathology*.–1981.–**71**, N 7.–P. 744–746.
2. Boman H. G. Peptide antibiotics and their role in innate immunity // *Annu. Rev. Immunol.*–1995.–**13**.–P. 61–92.
3. Lay F. T., Anderson M. A. Defensins – components of the innate immune system in plants // *Curr. Protein Pept. Sci.*–2005.–N 6.–P. 85–101.
4. Terras F. R., Schoofs H. M., De Bolle M. F., Van Leuven F., Rees S. B., Vanderleyden J., Cammue B. P., Broekaert W. F. Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds // *J. Biol. Chem.*–1992.–**267**, N 22.–P. 15301–15309.
5. Butaye K. M., Goderis I. J., Wouters P. F., Pues J. M., Delaure S. L., Broekaert W. F., Depicker A., Cammue B. P., de Bolle M. F. Stable high-level transgene expression in *Arabidopsis thaliana* using gene silencing mutants and matrix attachment regions // *Plant J.*–2004.–**39**, N 3.–P. 440–449.
6. Aerts A. M., Francois I. E., Bammens L., Cammue B. P., Smets B., Winderickx J., Accardo S., De Vos D. E., Thevissen K. The antifungal activity of RsAFP2, a plant defensin from *Raphanus sativus*, involves the induction of reactive oxygen

- species in *Candida albicans* // FEBS Lett.–2006.–**580**, N 7.–P. 1903–1907.
7. Kovalyova V. A., Gout R. T., Gout I. T. Production of Scots pine recombinant 1 and its antifungal activity // Biopolym. cell.–2008.–**24**, N 5.–P. 377–384.
  8. Kovalyova V. A., Gout I. T., Gout R. T. Characterization of defensin-like proteins from Scots pine seedlings // Biopolym. cell.–2006.–**22**, N 2.–P. 126–131.
  9. Terras F. R., Eggermont K., Kovaleva V. Raikhel N. V., Osborn R. W., Kester A., Rees S. B., Torrekens S., van Leuven F., Vanderleyden J., Cammue B. P. A., Broekaert W. F. Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense // Plant Cell.–1995.–**7**, N 5.–P. 573–588.
  10. Tarchevsky I. A. Pathogen-Induced Plant Proteins // Appl. Biochem. and Microbiol.–2001.–**37**, N 5.–P. 441–455.
  11. Belava V., Panyuta O., Taran N. Model system of infection and level of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) resistance estimation to eyespot agent (*Pseudocercospora herpotrichoides* (Fron) Deighton) // Karantyn i Zakhyst Roslyn.–2008.–N 7.–P. 25–28.
  12. Wallwork H., Spooner B. *Tapesia yellundae* – the teleomorph of *Pseudocercospora herpotrichoides* // Transact. Brit. Mycol. Soc.–1988.–**91**, N 44.–P. 703–705.
  13. Bartlett J., Stirling D. PCR Protocols, 2<sup>nd</sup> ed.–Totowa: Humana Press, 2003.–556 p.
  14. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual.–New York: Cold Spring Harbor Lab. press, 1982.–545 p.
  15. Lepekhin E. A., Yalovoi A. I., Rybak V. I. Activity and specificity carbohydrates in lectins of germinating maize grains // Russ. J. Plant Physiol.–1986.–**33**, N 2.–P. 390–394.
  16. Peumans W. J., Stinissen H. M., Carlier A. A genetic basis for the origin of six different isolectins in hexaploid wheat // Planta.–1982.–**154**, N 6.–P. 562–567.
  17. Shakirova F. M. Nonspecific resistance to stressful factors and its regulation.–Ufa: Gilem, 2001.–160 p.
  18. Yamamoto H., Tani T., Naito N. Changes in protein contents of oat leaves during the resistant reaction against *Puccinia coronata avenae* // Phytopathology.–1975.–**82**, N 2.–P. 138–145.
  19. Medvedeva T. E., Chalenko G. I., Vasyukova N. I., Ozeretskovskaya O. L. Influence of suppressor of the potato late blight causal agent on wounding repair of potato tubers // Dokl. Akad. Nauk SSSR.–1985.–**280**, N 3.–P. 764–767.

УДК 581.1:632.4:577.113  
Надійшла до редакції 10.02.09