



ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА ИНГИБИТОРА ПРОТЕИНАЗЫ *TRITICUM AESTIVUM* ПРИ ОБРАБОТКЕ ХИТООЛИГОСАХАРИДАМИ С РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНЬЮ АЦЕТИЛИРОВАНИЯ И ИНФИЦИРОВАНИИ ПАТОГЕНАМИ

А.Р. Ахатова^{1*}, Л.Г. Яруллина²

¹Башкирский государственный медицинский университет
Россия, Республика Башкортостан, 450008 г. Уфа, улица Ленина, 3.

²Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН
Россия, Республика Башкортостан, 450054 г. Уфа, Проспект Октября, 71.

*Email: a.akhatova2017@yandex.ru

Резюме

Выявлена зависимость уровня экспрессии гена ингибитора протеиназы EU 293132.1 пшеницы от степени ацетилирования хитоолигосахаридов и трофности патогена. При инфицировании растений пшеницы гемибактериотрофом *Septoria nodorum* высокий стимулирующий эффект на активность ингибитора протеиназы оказывали хитоолигосахариды со степенью ацетилирования 30%, а при заражении некротрофом *Bipolaris sorokiniana* – хитоолигосахариды со степенью ацетилирования 65%.

Ключевые слова: хитоолигосахариды, *Septoria nodorum*, *Bipolaris sorokiniana*, ген ингибитора протеиназы

Цитирование: Ахатова А.Р., Яруллина Л.Г. Изменение экспрессии гена ингибитора протеиназы *Triticum aestivum* при обработке хитоолигосахаридами с различной степенью ацетилирования и инфицировании патогенами // Биомика. 2020. Т.12(3). С. 380-383. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-27

© Авторы

CHANGES IN THE EXPRESSION OF THE TRITICUM AESTIVUM PROTEINASE INHIBITOR GENE UPON TREATMENT WITH CHITOOOLIGOSACCHARIDES WITH VARYING DEGREES OF ACETYLTATION AND INFECTION WITH PATHOGENS

A. R. Akhatova^{1*}, L. G. Yarullina²

¹Bashkir State Medical University, 3 Lenina Street, 450008 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.

²Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, 71 Pr. Oktyabrya, 450054, Ufa, Russia, *Email: a.akhatova2017@yandex.ru

Resume

The dependence of the expression level of the wheat proteinase inhibitor gene EU 293132.1 on the degree of acetylation of chitoooligosaccharides and the trophicity of the pathogen was revealed. When wheat plants were infected with hemibiotrophus *Septoria nodorum*, high stimulating effect on the activity of proteinase inhibitors was provided by chitoooligosaccharides with a degree of acetylation of 30%, and when infected with necrotrophus *Bipolaris sorokiniana* – chitoooligosaccharides with a degree of acetylation of 65%.

Keywords: chitoooligosaccharides, *Septoria nodorum*, *Bipolaris sorokiniana*, proteinase inhibitor gene

Citation: Akhatova A.R., Yarullina L.G. Changes in the expression of the *Triticum aestivum* proteinase inhibitor gene upon treatment with chitoooligosaccharides with varying degrees of acetylation and infection with pathogens. *Biomics*. 2020. Vol. 12(3). P. 380-383. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-27 (In Russian)

© The Authors

Существенный ущерб урожайности и качеству продукции растениеводства наносится патогенными вирусами, грибами, бактериями. Способность возбудителей болезней к внедрению и распространению в растительных тканях во многом определяется активностью их гидролитических ферментов [1, 2].

Эффективным механизмом, препятствующим проникновению фитопатогенов в растение и распространению по нему, служит процесс подавления активности гидролаз специфическими ингибиторами [3, 4]. Причем, ингибиторы могут инактивировать непосредственно как чужеродные ферменты внедряющегося микроорганизма, так и повышать устойчивость растений опосредованно, за счет снижения интенсивности деградации собственными ферментами [5, 6].

Одним из перспективных и экологически безопасных подходов к снижению повреждающего действия возбудителей грибных болезней на урожайность сельскохозяйственных культур является применение в растениеводстве иммуномодуляторов, стимулирующих естественные защитные механизмы растительного организма. Наиболее эффективными элиситорами являются низкомолекулярные производные хитина – хитоолигосахариды (ХОС) [7,8]. Определенную роль в специфичности проявления биологической активности производных ХОС имеет степень ацетилирования (СА) биополимера. Однако литературные данные о влиянии ХОС на защитный потенциал растений в зависимости от трофности патогена весьма ограничены.

Работа проводилась на растениях пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта Жница. Для инфицирования растений пшеницы использовали конидии некротрофного возбудителя корневых гнилей *Bipolaris sorokiniana* (Sass.) Shoemaker. и пикноспоры гемибитрофного возбудителя септориоза *Septoria nodorum* Berk. Семена обрабатывали путем замачивания (3 ч) в растворах ХОС со степенью ацетилирования 65% и 30% (10^{-6} М). Для выделения РНК из растений использовали видоизмененный метод Chomezynski [9]. Для получения кДНК на основе мРНК изучаемых образцов проводили реакцию обратной транскрипции с использованием M-MuLV обратной

транскриптазы согласно протоколу фирмы-поставщика. Полимеразно-цепную реакцию (ОТ-ПЦР) проводили в амплификаторе типа ТП4-ПЦР-01-«Терцик». После амплификации фрагменты ДНК фракционировали методом электрофореза в 7% ПААГ в электрофоретической камере S2 («Хеликон», Россия). В качестве положительного контроля использовали ПЦР гена, кодирующего конститутивно экспрессирующийся тубулин. С помощью программы «Primer Select» (DNASStar) были подобраны высокоспецифичные праймеры к гену ингибитора протеиназы EU 293132.1, фланкирующие фрагмент ДНК размером 106 п.н. Эксперименты включали не менее трех биологических повторностей при анализе биохимических показателей и не менее 15 при анализе экспрессии гена. Статистическая обработка результатов проводилась с использованием компьютерных программ фирмы Stat Soft («Statistica 6.0»).

Как видно из рисунка 1А, предобработка ХОС и инфицирование некротрофом *B. sorokiniana* приводили к усилению экспрессии гена ингибитора протеиназы EU 293132.1. Причем, предобработка семян ХОС со СА 65% приводила к усилению экспрессионной активности гена ингибитора протеиназы в 1,5 и более раз, как в неинфицированных растениях, так и при заражении на всем протяжении опыта. Действие ХОС со СА 30% на экспрессию гена ингибитора протеиназы в корнях здоровых и инфицированных растений было не столь значительным. Усиление транскрипционной активности гена ингибитора протеиназы EU 293132.1 коррелировало с повышением активности ингибиторов протеиназ. Интересно, что в усилении экспрессии гена ингибитора протеиназы EU 293132.1 при инфицировании растений пшеницы гемибитрофом *S. nodorum* максимальную эффективность оказывали ХОС со СА 30% (рис. 1Б).

Таким образом, нами выявлено, что ХОС оказывают различный индуцирующий эффект на транскрипционную активность гена ингибитора протеиназы в зависимости от их СА и трофности патогена. При инфицировании гемибитрофом *S. nodorum* более значительным было стимулирующее влияние ХОС со СА 30%, при заражении *B. sorokiniana* – ХОС со СА 65%.

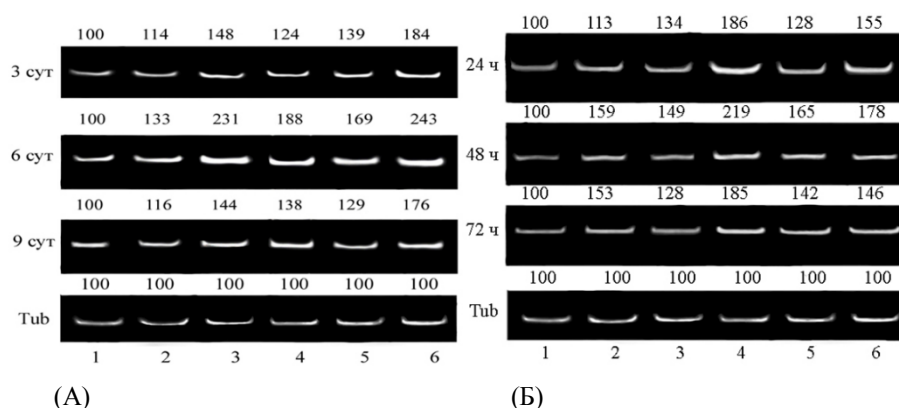


Рис. 1. Влияние ХОС с различной СА на транскрипционную активность гена ингибитора протеиназы EU 293132.1 в растениях пшеницы при инфицировании *B. sorokiniana* (А) и *S. nodorum* (Б). А: 1 – контроль; 2 – ХОС (СА 30%); 3 – ХОС (СА 65%); 4 – инфицирование, 5 – ХОС (СА 30%) + инфицирование; 6 – ХОС (СА 65%) + инфицирование. Б: 1 – контроль; 2 – инфицирование; 3 – ХОС (СА 30%); 4 – ХОС (СА 30%) + инфицирование; 5 – ХОС (СА 65%); 6 – ХОС (СА 65%) + инфицирование. Цифрами представлен нормализованный уровень транскрипционной активности гена ингибитора протеиназы (в % к контролю).

Fig. 1. Effect of ChOS with different CA on the transcriptional activity of the EU 293132.1 proteinase inhibitor gene in wheat plants infected with *B. sorokiniana* (A) and *S. nodorum* (B). A: 1 - control; 2 - ChOS (CA 30%); 3 - ChOS (CA 65%); 4 - infection, 5 - ChOS (CA 30%) + infection; 6 - ChOS (CA 65%) + infection. B: 1 - control; 2 - infection; 3 - ChOS (CA 30%); 4 - ChOS (CA 30%) + infection; 5 - ChOS (CA 65%); 6 - ChOS (CA 65%) + infection. The numbers represent the normalized level of transcriptional activity of the proteinase inhibitor gene (in % of the control).

Полученные данные вносят вклад в понимание молекулярных механизмов естественного и индуцированного иммунитета. Изменение баланса активности протеиназ и их ингибиторов в растительных тканях является одним из механизмов повышения устойчивости к возбудителям грибных болезней пшеницы с различным типом трофности. Наиболее перспективным в этом плане является использование препаратов на основе сигнальных молекул, таких как ХОС, приводящих к длительной индукции активности ингибиторов гидролитических ферментов в растениях.

Литература

1. Кудрявцева Н.Н., Софьин А.В., Ревина Т.А., Гвоздева Е.Л., Иевлева Е.В., Валуева Т.А. Секреция протеолитических ферментов тремя фитопатогенными микроорганизмами // Прикладная биохимия и микробиология. 2013. Т. 49. С. 513-521.
2. Silva T.M., De Lima Damásio A.R., Maller A., Michelin M., Squina F.M., Jorge J.A., Teixeira M. Polizeli purification, partial characterization, and covalent immobilization-stabilization of an extracellular α -amylase from *Aspergillus niveus* // Folia Microbiologica. 2013. Vol. 58. Pp. 495-502.
3. Ревина Т.А., Кладницкая Г.В., Герасимова Н.Г., Гвоздева Е.Л., Валуева Т.А. Белок ингибитор трипсина из клубней картофеля // Биохимия. 2010. Т. 75. С. 46-51.

4. Kalve N.D., Lomate NP.R., Hivrale V.K. A proteinaceous thermo labile α -amylase inhibitor from *Albizia lebbek* with inhibitory potential toward insect amylases // Arthropod – Plant Interactions. 2012. V. 6. P. 213-220.
5. Valencia-Jiménez A., Arboleda V., Grossi de Sá M.F. Activity of α -amylase inhibitors from *Phaseolus coccineus* on digestive α -amylases of the coffee berry borer // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2008. V. 56(7). P. 2315-2320.
6. Gatehouse J.A., Prospects for using proteinase inhibitors to protect transgenic plants against attack by herbivorous // Current Protein and Peptide Science. 2011. V. 12(5). P. 409-416.
7. Максимов И.В. Биологическая активность хитина и сферы его применения // Известия УНЦ РАН. 2013. №2. С. 38-61.
8. De Jonge R., Van Esse H.P., Kombrink A., Tomonori S., Desaki Y., Bours R., Van der Krol S., Shibuyan N. Conserved fungal LysM effector ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants // Science. 2010. V. 329. P. 953-955.
9. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // Anal. Biochem. 1987. V. 162. P. 156-159.

References

1. Kudrjavitseva N.N., Sofin A.V., Revina T.A., Gvozdeva E.L., Ievleva E.V., Valueva T.A. Sekrecija

- proteoliticheskikh fermentov tremja fitopatogennymi mikroorganizmami. *Prikladnaja biohimija i mikrobiologija*. 2013. T. 49. S. 513-521. [Secretion of proteolytic enzymes by three phytopathogenic microorganisms] (In Russian)
2. Silva T.M., De Lima Damásio A.R., Maller A., Michelin M., Squina F.M., Jorge J.A., Teixeira M. Polizeli purification, partial characterization, and covalent immobilization-stabilization of an extracellular α -amylase from *Aspergillus niveus*. *Folia Microbiologica*. 2013. V. 58. P. 495-502.
 3. Revina T.A., Kladnickaja G.V., Gerasimova N.G., Gvozdeva E.L., Valueva T.A. Belok ingibitor tripsina iz klubnej kartofelja. *Biohimija*. 2010. T.75. S. 46-51. [Protein trypsin inhibitor from potato tubers] (In Russian)
 4. Kalve N.D., Lomate NP.R., Hivrale V.K. A proteinaceous thermo labile α -amylase inhibitor from *Albizia lebbek* with inhibitory potential toward insect amylases. *Arthropod – Plant Interactions*. 2012. V. 6. P. 213-220.
 5. Valencia-Jiménez A., Arboleda V., Grossi de Sá M.F. Activity of α -amylase inhibitors from *Phaseolus coccineus* on digestive α -amylases of the coffee berry borer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008. V. 56(7). P. 2315-2320.
 6. Gatehouse J.A., Prospects for using proteinase inhibitors to protect transgenic plants against attack by herbivorous. *Current Protein and Peptide Science*. 2011. V. 12(5). P. 409-416.
 7. Maksimov I.V. Biologicheskaja aktivnost' hitina i sfery ego primeneniya. *Izvestija UNC RAN*. 2013. No2. S. 38-61. [Biological activity of chitin and its applications] (In Russian).
 8. De Jonge R., Van Esse H.P., Kombrink A., Tomonori S., Desaki Y., Bours R., Van der Krol S., Shibuyan N. Conserved fungal LysM effector ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants. *Science*. 2010. V. 329. P. 953-955.
 9. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem*. 1987. V. 162. P. 156-159.