

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ЗАЩИТНОГО ОТВЕТА В ЛИСТЯХ ТРАНСГЕННОГО КАРТОФЕЛЯ ПОСЛЕ ОБРАБОТКИ ГЛИФОСАТОМ

Х. ПАСАЛАРИ¹, А. Н. ЕВТУШЕНКОВ¹

¹Белорусский государственный университет,
пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь

Бактериальный ген *aroA* введен в растения картофеля методом агробактериальной трансформации. Наличие целевого гена и его экспрессия в геноме трансформированных растений подтверждены методом полимеразной цепной реакции. Изолированные листья со стеблей картофеля проявляли устойчивость к обработке глифосатом в концентрации 1,8 г/л. Изучена экспрессия гена *aroA* и генов защитного ответа в трансгенных растениях картофеля, резистентных к глифосату. Отмечена экспрессия гена *aroA* в тканях картофеля методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (RT-PCR). Показано, что обработка трансгенных растений глифосатом индуцирует экспрессию в листьях генов защитного ответа.

Ключевые слова: трансгенный картофель; кПЦР; гены защитного ответа; глифосат.

PR-GENES EXPRESSION IN THE LIVES OF TRANSGENIC POTATO PLANTS AFTER GLYPHOSATE TREATMENT

H. PASALARI^a, A. N. EVTUSHENKOV^a

^aBelarusian State University, Nezavisimosti avenue, 4, 220030, Minsk, Republic of Belarus

The bacteria *aroA* gene has been integrated into cultivated potato (*S. tuberosum*) using *Agrobacterium*-mediated transformation. The transgenic plants contained and expressed *aroA* gene as tested by PCR. The foliar of transgenic plants were resistant to glyphosate treatment in dose 1,8 g/l. It was studied expression of *aroA* gene and pathogenesis related genes in the transgenic potato plants resistant to glyphosate. It was demonstrated expression of *aroA* gene in potato tissue by RT-PCR. We have observed induction of *PR*-genes in leaves after treatment transgenic plants by glyphosate.

Key words: transgenic potato; RT-PCR; *PR*-genes; glyphosate.

Получение трансгенных гербицидустойчивых культур – актуальное направление современной сельскохозяйственной отрасли. Создание растений, устойчивых к широко используемому во всем мире гербициду глифосату (N-(фосфонометил)-глицин), позволит существенно повысить эффективность сельскохозяйственного производства, значительно увеличить урожайность культур. В настоящее время гербицид глифосат широко используется во всем мире, что обусловлено его высокой эффективностью,

Образец цитирования:

Пасалари Х., Евтушенко А. Н. Экспрессия генов защитного ответа в листьях трансгенного картофеля после обработки глифосатом // Вестн. БГУ. Сер. 2, Химия. Биология. География. 2016. № 1. С. 31–35.

For citation:

Pasalari H., Evtushenkov A. N. *PR*-genes expression in the lives of transgenic potato plants after glyphosate treatment. *Vestnik BGU. Ser. 2, Khimiya. Biol. Geogr.* 2016. No. 1. P. 31–35 (in Russ.).

Авторы:

Хосейн Пасалари – аспирант кафедры молекулярной биологии биологического факультета. Научный руководитель – А. Н. Евтушенко.
Анатолий Николаевич Евтушенко – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой молекулярной биологии биологического факультета.

Authors:

Hoseine Pasalari, postgraduate student at the department of molecular biology, school of biology.
Anatoli Evtushenkov, doctor habilitatus of biology, full professor; head of the department of molecular biology, school of biology.
evtushenkov@bsu.by

дешевизной и низкой токсичностью. При этом, однако, природная устойчивость растений к нему встречается достаточно редко. Глифосат ингибирует 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат синтазу (EPSPS) растений – фермент шикиматного пути, локализованный в хлоропластах, определяющий биосинтез ароматических аминокислот [1].

Существует несколько подходов к получению растений, устойчивых к глифосату. Первый заключается в амплификации или модификации собственных растительных генов EPSPS; второй состоит в том, чтобы клонировать ген, кодирующий устойчивый к глифосату фермент, из бактерий или грибов и ввести в растения; третий способ, который стал использоваться относительно недавно, заключается в поиске в природной среде и последующей модификации ферментов, способных расщеплять глифосат до нетоксичных продуктов, и введении таких генов в растения [2, 3]. В устойчивых к глифосату растениях, которые получены первыми двумя способами, глифосат все равно накапливается в меристемах [4, 5]. При использовании третьего подхода остатки глифосата расщепляются до безопасных продуктов, что в конечном счете благоприятно для растений и приводит к уменьшению загрязнения почвы.

Картофель – наиболее широко распространенная овощная культура в Республике Беларусь. Ранее нами получены трансгенные растения картофеля, устойчивые к глифосату, с бактериальным геном *aroA* [6]. После обработки глифосатом они могут приобретать устойчивость к грибным патогенам при накоплении гербицида в вегетирующих органах, который токсичен для микроорганизмов [5]. Устойчивость растений к патогенам связана с накоплением PR-белков [7] – особого класса защитных белков, которые экспрессируются в ответ на стрессовые воздействия и инфекцию патогена. PR-белки обнаружены у многих видов растений, и в настоящее время описанные белки отнесены к 17 семействам [8]. Связь между накоплением PR-белков и развитием приобретенной устойчивости привела к предположению, что они являются маркерами этой устойчивости. Было показано, что накопление этих белков коррелирует с развитием системной приобретенной устойчивости растений [8].

Цель настоящей работы – определение экспрессии гена *aroA* в трансгенных растениях картофеля и влияния обработки глифосатом на уровень экспрессии генов защитного ответа.

Материалы и методы исследования

Трансгенные растения картофеля выращивали в горшках в условиях климатической камеры при температуре 23 °C и длине светового дня 16 ч. Наличие гена *aroA* в геноме растений анализировали с помощью реакций амплификации с праймерами (таблица), с которыми синтезируется фрагмент размером 750 и 250 п. н. В реакции использовали геномную ДНК растений, а также кДНК, полученную путем обратной транскрипции с мРНК трансгенных растений. Реакционная смесь включала 1 мкл геномной ДНК (или кДНК) каждого образца, по 2 мкмоль/л каждого из праймеров, 2 ммоль/л смеси четырех дезоксинуклеотидтрифосфатов, 5 ед./мкл Taq-полимеразы в однократном реакционном буфере. Общий объем смеси составлял 15 мкл. Программа амплификации: денатурация при 94 °C в течение 4 мин; 30 циклов при 94 °C – по 30 с; 55 °C – 1 мин; 72 °C – 1 мин 30 с; заключительный цикл – 7 мин при 72 °C – для фрагмента размером 750 п. н.; денатурация при 94 °C – 4 мин; 35 циклов при 94 °C – по 15 с; 65 °C – 15 с; 72 °C – 20 с; заключительный цикл – 5 мин при 72 °C – для фрагмента размером 250 п. н. Продукты полимеразной цепной реакции (ПЦР) анализировали при помощи электрофореза в 1,5 % агарозном геле в трис-ацетатной буферной системе.

Праймеры, используемые в работе

Праймеры	Последовательность праймеров
<i>aroAseq2</i> <i>aroAr_ch</i>	CAGGAAACAGCTATGACGCATTAAAGGCGATCTGGTTTC TCAGAGCTCAGCCGTGCTGACTCAGA
<i>nt CTP-f</i> <i>nt CTP-r</i>	GTTTCTAGAAAAATGGCACAGATTAGCAGCATG CAATGAGCTCCATGGTCTGTGCAGTGACCACTGAT
<i>St PR2f</i> <i>St PR2r</i>	CTAATGCGGTGGTACAAGATGG TGACACAACAATTCCTACAGATCC
<i>St PR3f</i> <i>St PR3r</i>	ATAAGCCATCATGCCACAACG GCAGTATTCGGACCCATCC
<i>St PR5f</i> <i>St PR5r</i>	ATCTCCCGTCTCGCATTTGC GGGCCAAACTTGGAACCTTAATG

Праймеры	Последовательность праймеров
<i>St HSR-203j-f</i> <i>St HSR-203j-r</i>	GTAATGATAGTTTCGGTTGATAAGC AGAGGTAGGAAGACGGAAAC
<i>St HIN-1f</i> <i>St HIN-1r</i>	GCAACTGCATTTTCCAAATCATC CACGTAGAAATTGACCTTGTTAGG
<i>St EF1Af</i> <i>St EF1A2r</i>	TTGATGCTCTTGACCAGATTAACG ACGGGCACAGTTCCAATACC

Полимеразную цепную реакцию в реальном времени – RT-PCR – проводили на амплификаторе ДТ-96 (ДНК-технология) с модулем детекции продуктов в режиме реального времени. Для определения уровней экспрессии генов растений использовали прямой и обратный праймеры (см. таблицу), Taq-буфер и Taq-полимеразу (2,5 ед.). Реакционная смесь объемом 100 мкл содержала каждый праймер в концентрации 0,2 мкмоль/л, дНТФ – по 0,1 ммоль/л, а также интеркалирующий краситель SYBR Green 1 (Sigma) и референсный краситель Rox («Праймтех») в рекомендованных производителем концентрациях. Продукты реакции детектировались в ходе 50 циклов чередующихся температур – 94 °C (10 с) и 60 °C (1 мин). Расчеты уровней экспрессии генов проводили по следующей схеме. Определяли разницу значений (ΔCt), вычитая из конститутивно экспрессирующегося гена *EF-1 α* пороговое значение (*Ct*) *PR*-генов. Статистическую обработку полученных данных и построение графиков проводили с использованием программ Origin Pro 8 и Rest 2009.

Результаты исследования и их обсуждение

Для постановки экспериментов трансгенные растения картофеля выращивали из клубней в горшках в условиях климатической камеры при температуре 22 °C и длине светового дня 16 ч в течение 60 сут. Для выделения ДНК и обработки глифосатом отбирали листья с середины стеблей. Все отобранные листья анализировали методом ПЦР на наличие гена *aroA*. Выросшие растения тестировали на экспрессию гена *aroA* по синтезу кДНК. С этой целью выделяли фракцию мРНК с использованием набора Nucleospin® (Macherey-Nagel) RNA Plant и синтезировали кДНК. С полученной кДНК проводили ПЦР с праймерами к гену *aroA*. Наличие фрагмента ДНК размером 250 п. н. указывало на экспрессию гена (рис. 1).

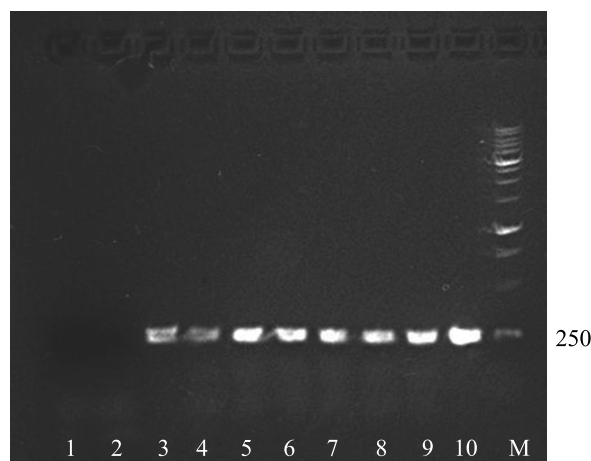


Рис. 1. Экспрессия гена *aroA* в образцах трансгенных листьев картофеля. Дорожки 1, 2 – отрицательный контроль (нетрансгенный картофель); 3 – контроль ПЦР плазмиды с геном *aroA*; 4–10 – образцы кДНК; М – маркерная ДНК (1 kb DNA ladder Mix, Fermentas)

Для определения устойчивости растений к глифосату проводили обработку листьев его раствором с концентрацией 0,45; 0,9 и 1,8 г/л. Листья помещали на увлажненную фильтровальную бумагу в чашки Петри и инкубировали в условиях климатической камеры при температуре 24 °C и 16-часовом световом дне. В качестве контроля использовали листья нетрансгенных растений. Через три дня после обработки глифосатом в концентрации 0,45 г/л наблюдали лишь слабое пожелтение листьев контрольных

растений. Концентрация глифосата 0,9 г/л вызвала более четкое пожелтение листьев контрольных растений. Но максимальное действие глифосата проявлялось при концентрации 1,8 г/л: листья, собранные с контрольных растений, пожелтели и покрылись темными пятнами. Листья трансгенных растений не изменили окраски, что свидетельствует об их устойчивости к глифосату (рис. 2).

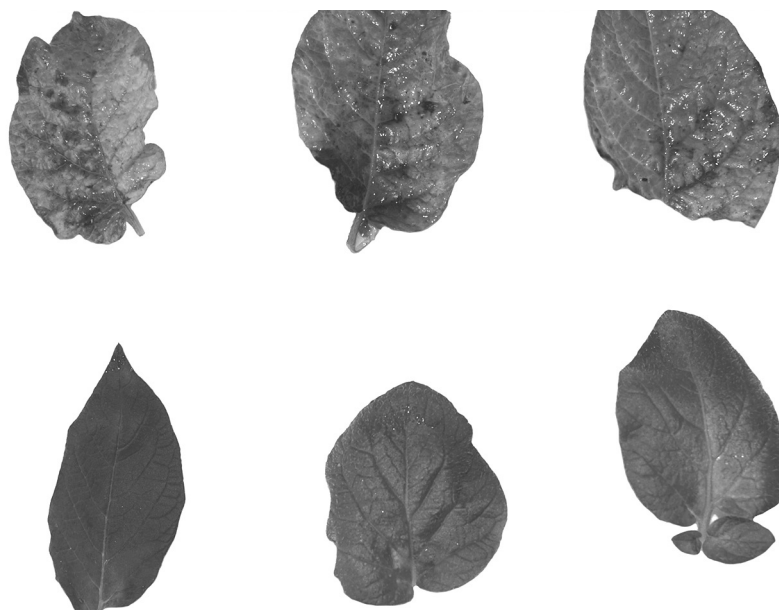


Рис. 2. Листья растений картофеля через три дня после обработки глифосатом в концентрации 1,8 г/л.
Верхний ряд – листья контрольных растений, неустойчивых к глифосату.
Нижний ряд – листья трансгенного картофеля

Индукцию системного ответа растений детектировали методом количественной ПЦР (кПЦР) по уровню экспрессии известных *PR*-генов *S. tuberosum*. Количество полученной кДНК определяли методом кПЦР с интеркалирующим красителем SYBR Green. В качестве референсного гена применяли *EF-1α*. Используемые олигонуклеотидные праймеры представлены в таблице. Развитие системного защитного ответа *S. tuberosum* оценивалось по уровню экспрессии набора *PR*-генов листьев растений через 3 сут после обработки их глифосатом в концентрации 1,8 г/л. В данном эксперименте удалось зафиксировать увеличение уровня экспрессии для всех *PR*-генов (рис. 3).

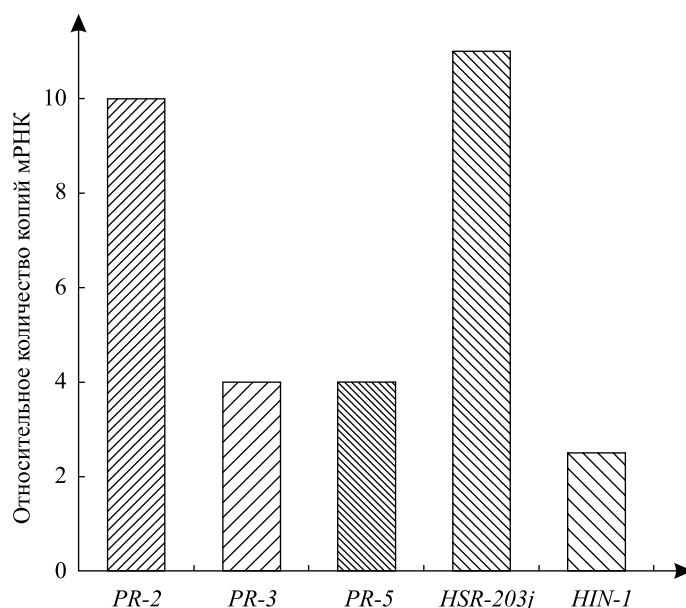


Рис. 3. Экспрессия генов защитного ответа в листьях картофеля после обработки глифосатом

Экспрессия возрастала примерно в 4 раза для генов *PR-3*, *PR-5*, чуть более чем в 2 раза – для гена *hin1*. Наиболее сильной оказалась индукция генов *PR-2* и экспрессия маркера гиперчувствительности *HSR-203j* [9], т. е. обработка растений картофеля глифосатом индуцирует гены защитного ответа, что должно повышать уровень устойчивости растений к инфекции патогенами. Накопление глифосата в тканях листьев также способствует повышению устойчивости к патогенам, даже таким, как *Phytophthora infestans*, которые ингибируются глифосатом. Таким образом, обработка посадок трансгенного картофеля глифосатом будет приводить не только к гибели сорняков, но и повышать уровень устойчивости растений к патогенам.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК (REFERENCES)

1. Linda A. Castle, Daniel L. Siehl, Rebecca Gorton, Phillip A. Patten, Yong Hong Chen, Sean Bertain, Hyeon-Je Cho, Nicholas Duck. Discovery and directed evolution of a glyphosate tolerance gene // *Science*. 2004. Vol. 304. P. 1151–1154 [Linda A. Castle, Daniel L. Siehl, Rebecca Gorton, Phillip A. Patten, Yong Hong Chen, Sean Bertain, Hyeon-Je Cho, Nicholas Duck. Discovery and directed evolution of a glyphosate tolerance gene. *Science*. 2004. Vol. 304. P. 1151–1154 (in Engl.)].
2. Wang H. Y., Li Y. F., Xie L. X., Xu P. Expression of a bacterial *aroA* mutant, *aroA-M1*, encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase for the production of glyphosate-resistant tobacco plants // *J. Plant. Res.* 2003. Vol. 116. P. 455–460 [Wang H. Y., Li Y. F., Xie L. X., Xu P. Expression of a bacterial *aroA* mutant, *aroA-M1*, encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase for the production of glyphosate-resistant tobacco plants. *J. Plant. Res.* 2003. Vol. 116. P. 455–460 (in Engl.)].
3. Pedotti M., Rosini E., Molla G., Moschetti T., Savino C., Vallone B., Pollegioni L. Glyphosate resistance by engineering the flavoenzyme glycine oxidase // *J. Biol. Chem.* 2009. Vol. 284. 36415–36423 [Pedotti M., Rosini E., Molla G., Moschetti T., Savino C., Vallone B., Pollegioni L. Glyphosate resistance by engineering the flavoenzyme glycine oxidase. *J. Biol. Chem.* 2009. Vol. 284. 36415–36423 (in Engl.)].
4. Gougler J. A. Uptake and distribution of N-phosphonomethylglycine in sugar beet plants // *Plant. Physiol.* 1981. Vol. 68, № 3. P. 668–672 [Gougler J. A. Uptake and distribution of N-phosphonomethylglycine in sugar beet plants. *Plant. Physiol.* 1981. Vol. 68, No. 3. P. 668–672 (in Engl.)].
5. Pline W. A., Wilcut J. W., Duke S. O., Edmisten K. L., Wells R. Tolerance and accumulation of shikimic acid in response to glyphosate applications in glyphosate resistant and non glyphosate resistant cotton (*Gossypium hirsutum* L.) // *J. Agric. Food Chem.* 2002. Vol. 50. P. 506–512 [Pline W. A., Wilcut J. W., Duke S. O., Edmisten K. L., Wells R. Tolerance and accumulation of shikimic acid in response to glyphosate applications in glyphosate resistant and non glyphosate resistant cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *J. Agric. Food Chem.* 2002. Vol. 50. P. 506–512 (in Engl.)].
6. Пасалари Х. М., Третьякова О. М., Евтушенков А. Н. Устойчивость к глифосату трансгенного картофеля с геном *aroA* // Тр. Белорус. гос. ун-та. Сер. Физиол., биохим. и мол. основы функционирования биосистем. 2015. Т. 10, ч. 1. С. 123–126 [Pasalari H. M., Tratsiakova O. M., Evtushenkov A. N. Glyphosate tolerance transgenic potato plants containing *aroA* gene. *Proc. Belarus. State Univ. Ser. Physiol., Biochem. Mol. Biol. Sci.* 2015. Vol. 10, part 1. P. 123–126 (in Russ.)].
7. Loon L. C. van. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins // *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 1999. Vol. 55, № 2. P. 85–97 [Loon L. C. van. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 1999. Vol. 55, No. 2. P. 85–97 (in Engl.)].
8. Loon L. C. van. Significance of inducible Defense-related proteins infected plants // *Annu. Rev. Phytopathol.* 2006. P. 135–162 [Loon L. C. van. Significance of inducible Defense-related proteins infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2006. P. 135–162 (in Engl.)].
9. Pontier D., Tronchet M., Rogowsky P., Lam E., Roby D. Activation of *hsr203*, a plant gene expressed during incompatible plant-pathogen interactions, is correlated with programmed cell death // *Mol. Plant-Microbe Interact.* 1998. Vol. 11, № 6. P. 544–554 [Pontier D., Tronchet M., Rogowsky P., Lam E., Roby D. Activation of *hsr203*, a plant gene expressed during incompatible plant-pathogen interactions, is correlated with programmed cell death. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 1998. Vol. 11, No. 6. P. 544–554 (in Engl.)].

Статья поступила в редколлегию 19.11.2015.
Received by editorial board 19.11.2015.