

РОЛЬ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПЕПТИДНЫХ ЭЛИСИТОРОВ CSP15 И MF3 В УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ ГОРОХА К ОКСИДАТИВНОМУ СТРЕССУ

Филипцова Г.Г.¹, Новик Ю.А.¹, Хоревская Ю.И.¹, Соколов Ю.А.²,
Юрин В.М.¹

¹Белорусский государственный университет, Минск,
filiptsova@bsu.by

²Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск

Ключевым аспектом устойчивости растений к фитопатогенам является их способность к восприятию особых молекул, выделяемых микроорганизмами и обладающих элиситорными свойствами т.е., приводящих к активации сигнальных систем и индукции защитных механизмов. Наиболее известными бактериальными элиситорами являются липополисахариды и гликолипиды внешней мембраны бактерий; флагеллин – основной структурный компонент бактериального жгутика; хитин, хитозан и эргостерол – основные компоненты клеточной стенки и мембраны грибов; бактериальные белки холодного шока (CSP – cold shock proteins); фактор элонгации Tu; микробный фактор MF3 [1, 2, 3]. Особый интерес вызывают элиситоры белковой природы, согласно современным представлениям, они являются важными компонентами иммунной системы растений, проявляют активность в очень низких концентрациях, не чужеродны для окружающей среды, не накапливаются в растениях, а следовательно, могут быть использованы при разработке экологически безопасных технологий защиты растений.

Csp15 представляет собой активный компонент белка холодного шока с молекулярной массой 7,4 кДа, выделенного из *M. lysodeikticum* [4]. В настоящее время установлено, что белки холодного шока характерны для широкого спектра бактерий, они могут конститутивно присутствовать в клетках, либо индуцироваться под действием холода. Элиситорная активность данного белка определяется наиболее консервативным доменом из 15 аминокислотных остатков – VKWFNAEKGFGRITP.

MF3 – низкомолекулярный (16,9 кДа) термостабильный белок, выделенный из *P. fluorescens* [5]. Этот белок относится к семейству ферментов пептидил-пролил-цис/транс-изомераз, обнаруженных у многих живых организмов. Элиситорные свойства MF3 связаны с наиболее консервативным фрагментом, состоящим из 29 аминокислотных остатков – IPRGLEKALEGKAVGDDLEVAVERPEDAYG.

Литературные данные свидетельствуют, что экзогенная обработка растений бактериальными пептидными элиситорами вызывает каскад взаимосвязанных защитных реакций, таких как изменение ионной проницаемости мембраны, повышение уровня активных форм кислорода,

синтез каллозы, активацию MAP-киназ, индукцию экспрессии ряда защитных генов, что в конечном итоге приводит к увеличению неспецифической устойчивости растительных организмов ко многим видам фитопатогенов [2, 5, 6, 7]. Поскольку многие из иммунных реакций организма являются неспецифическими, возникает вопрос о роли данных пептидов в устойчивости растений к оксидативному стрессу (ОС), развивающемуся в ответ на действие любых неблагоприятных воздействий как биотической, так и абиотической природы. Нами было изучено влияние синтетических пептидов Csp15 и MF3 на устойчивость проростков гороха к ОС. Пептиды были синтезированы в Институте биоорганической химии НАН Беларуси методом твёрдофазного пептидного синтеза с использованием автоматического пептидного синтезатора ResPep SL.

Объектом исследования служили проростки гороха, выращенные рулонным методом в водной культуре. Листья 14-дневных проростков опрыскивали водными растворами пептидов (Csp15 в диапазоне концентраций 10^{-9} – 10^{-12} М, MF3 – 10^{-4} – 10^{-7} М). Через 24 часа проростки подвергали оксидативному стрессу, для этого корневую систему погружали в раствор, содержащий 10^{-3} М CuCl_2 , 10^{-3} М H_2O_2 и 10^{-3} М аскорбиновой кислоты. Через сутки раствор заменяли дистиллированной водой, и проростки продолжали расти в течение 7 дней в стандартных условиях, после чего определяли сырую и сухую массу надземной части и корней. Для выявления влияния элиситоров на скорость окислительных процессов было изучено содержание первичных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) методом прямой спектрофотометрии изопропанольных экстрактов из листьев.

Согласно экспериментальным данным, представленным в таблице 1, ОС приводит к снижению массы надземной части проростков гороха на 34%, а корней на 29% по сравнению с контролем, что связано с активацией окислительных процессов и торможением роста растений. Предстрессовая обработка проростков синтетическим пептидом Csp15 минимизирует негативное действие ОС. Максимальное защитное действие пептида выявлено при концентрациях 10^{-9} и 10^{-12} М, в данных вариантах опыта сырая масса надземной части и корней проростков была сравнима с контролем. Очевидно, что обработка проростков гороха синтетическим пептидом Csp15 оказывает элиситорный эффект и приводит к увеличению устойчивости растений к стрессовому воздействию. Для выявления механизма элиситорного действия пептида было изучено его влияние на уровень первичных продуктов ПОЛ в листьях проростков гороха, подвергнутых ОС. Установлено, что обработка проростков гороха пептидом Csp15 в действующих концентрациях вызывает снижение содержания оксодиеновых и триеновых конъюгатов, что свидетельствует об уменьшении скорости окислительных процессов в растениях, подвергнутых оксидативному стрессу.

Таблица 1 – Влияние пептидного элиситора Csp15 на морфометрические характеристики 3-недельных проростков гороха, подвергнутых оксидативному стрессу (ОС)

Параметр	Контроль	ОС	Обработка пептидом Csp15 + ОС			
			10 ⁻⁹ М	10 ⁻¹⁰ М	10 ⁻¹¹ М	10 ⁻¹² М
Масса надземной части, г	0,52±0,021	0,34±0,018	0,53±0,032	0,43±0,025	0,48±0,027	0,54±0,023
Масса корней, г	0,49±0,023	0,35±0,014	0,47±0,024	0,41±0,022	0,47±0,025	0,51±0,026

Примечание: Жирным шрифтом выделены данные, достоверно отличающиеся от контроля при уровне значимости P≤0,05.

Элиситорная активность пептида MF3 проявляется в более высоких концентрациях, поэтому нами было осуществлено исследование его влияния на проростки гороха в диапазоне концентраций – 10⁻⁴–10⁻⁷ М. Выявлено, что пептид оказывает защитный эффект на растения, подвергнутые оксидативному стрессу, только в самой высокой из исследованных концентраций. При воздействии стресса на обработанные пептидом MF3 в концентрации 10⁻⁴ М проростки сырая масса надземной части уменьшилась на 10 %, а корней на 12 % по сравнению с контролем, тогда как у необработанных растений данные параметры снизились на 36 и 27 % соответственно (таблица 2). Более низкие концентрации синтетического пептида MF3 не оказывали достоверного влияния на морфометрические характеристики проростков гороха в условиях действия оксидативного стресса.

Таблица 2 – Влияние пептидного элиситора MF3 на морфометрические характеристики 3-недельных проростков гороха, подвергнутых оксидативному стрессу (ОС)

Параметр	Контроль	ОС	Обработка пептидом MF3 + ОС			
			10 ⁻⁴ М	10 ⁻⁵ М	10 ⁻⁶ М	10 ⁻⁷ М
Масса надземной части, г	0,43±0,018	0,32±0,017	0,39±0,024	0,33±0,018	0,31±0,017	0,29±0,019
Масса корней, г	0,41±0,016	0,30±0,015	0,36±0,017	0,32±0,015	0,29±0,018	0,28±0,015

Примечание: Жирным шрифтом выделены данные, достоверно отличающиеся от контроля при уровне значимости P≤0,05.

Аналогичные данные были получены при исследовании действия данного пептида на содержание продуктов ПОЛ. Установлено, что предварительная обработка растений пептидом MF3 в концентрации 10⁻⁴ М приводит к незначительному снижению уровня оксодиеновых и триеновых конъюгатов в

листьях проростков гороха, подвергнутых ОС, тогда как концентрация 10^{-5} М не оказывает достоверного влияния на данный параметр.

На основании представленных данных можно заключить, что бактериальные синтетические пептиды Csp15 и MF3 оказывают элиситорное воздействие на проростки гороха и приводят к увеличению их устойчивости к действию оксидативного стресса. При этом пептид Csp15 проявляет активность в более низких концентрациях и может рассматриваться как возможный компонент экологически безопасных препаратов защиты растений не только от фитопатогенов, но и других стрессовых воздействий.

Литература

1. Albert M. Peptides as trigger of plant defence // *J of Experimental Botany*. 2013. V. 64. P. 5269–5279.
2. Boller T., Felix G. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors // *Annual Review of Plant Biology*. 2009. V. 60. P. 379–406.
3. Соколов Ю.А. Элиситоры и их применение в растениеводстве / Ю.А. Соколов. - Минск: Беларуская навука, 2016. 201 с.
4. Felix G., Boller T. Molecular sensing of bacteria in plants. The highly conserved RNA-binding motif RNP-1 of bacterial cold shock proteins is recognized as an elicitor signal in tobacco // *J of Biological Chemistry*. 2003. V. 278. P. 6201–6208.
5. Shumilina D., Kramer R., Klocke E., Dzhavakhiya V. MF3 (peptidylprolyl cis-trans isomerase of FKBP type from *Pseudomonas fluorescens*) – an elicitor of non-specific plant resistance against pathogens // *Phytopathology Polonica*. 2006. V. 41. P. 39–49.
6. Mishina T.E., Zeier J. Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in *Arabidopsis* // *Plant Journal*. 2007. V. 50. P. 500–513.
7. Macho A., Zipfel C. Plant PRRs and the activation of innate immune signaling // *Molecular Cell*. 2014. V. 54. P. 263–272.