

The background of the slide is a close-up photograph of several ears of yellow corn. The kernels are bright yellow and arranged in neat rows on the cobs. The lighting is warm, highlighting the texture of the corn.

**Биотехнология
в селекции растений**
Часть 5.
Селекция на устойчивость к
болезням

Большое количество **защитных генов растений**
Большинство кодируют устойчивость лишь к
ограниченному кругу патогенов или даже расам
патогенов

Высокая степень защиты, стабильность в разных
условиях окружающей среды

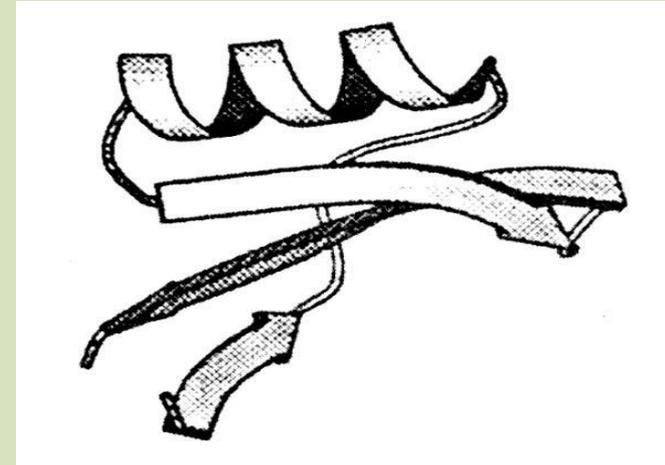
Приоритет – у **генов общей устойчивости**,
обеспечивающих защиту одновременно против
нескольких видов фитопатогенов

Дефензины

Ингибиторы протеолитических ферментов

ДЕФЕНЗИНЫ РАСТЕНИЙ

небольшие (около 5 kD) пептиды
обычно основные
богаты цистеиновыми остатками
связаны дисульфидными мостиками
экспрессируются почти в каждом
органе растения (листья, корни,
клубни, органы цветения, плоды и
семена)



Дефензин Rs-AFP1 редьки

Морфогенные

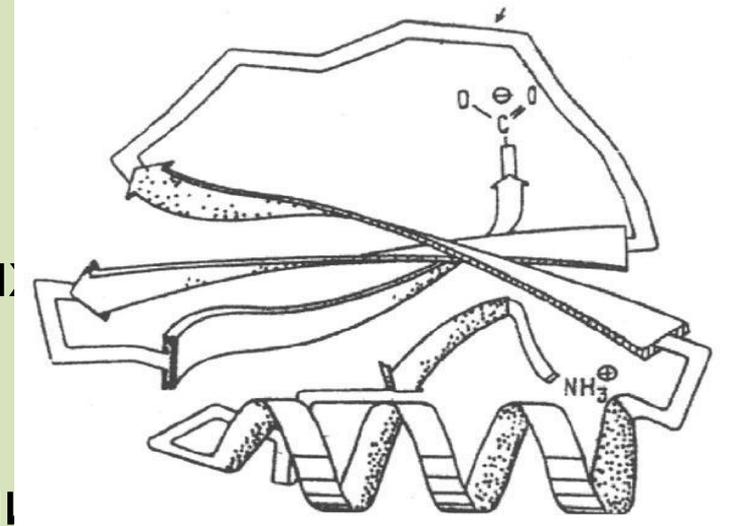
приводят к редукции
роста гифов и
одновременным
увеличением числа
ветвей

Неморфогенные

только замедляют рост
гифов, но не индуцируют
заметных морфологических
изменений

БЕЛКОВЫЕ ИНГИБИТОРЫ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

- локализованы в межклеточном пространстве и клеточной стенке
- являются регуляторами эндогенных протеаз
- широко представлены в различных тканях животных, растений и микроорганизмов



Ингибитор протеиназ CI-2 ячменя

Обнаружены растительные ингибиторы протеиназ, активно действующие на экзогенные ферменты насекомых и патогенных микроорганизмов
Большинство известных и исследованных ИП из растений взаимодействуют с сериновыми протеиназами

Протеолиз является одним из важнейших процессов жизнедеятельности как животных, так и растений.

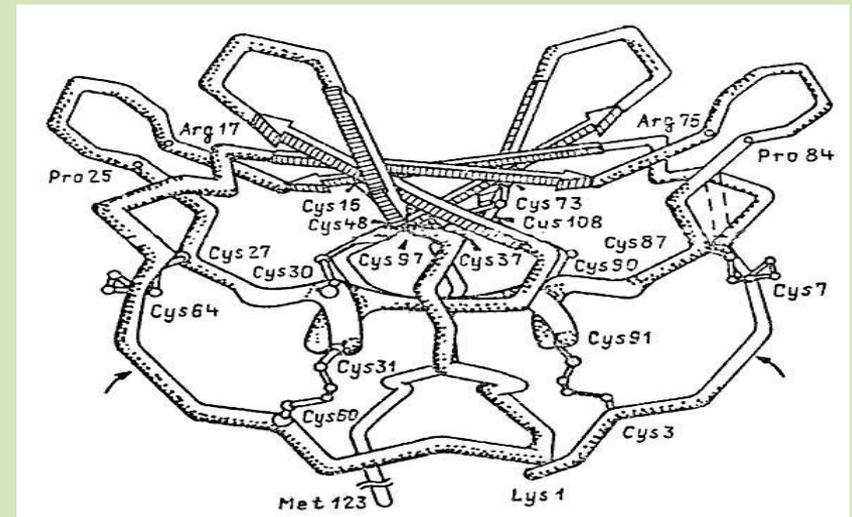
Протеолитические ферменты участвуют в образовании гормонов, ферментов и других жизненно необходимых активных белков и пептидов.

В растениях **протеиназы** участвуют в процессинге и деградации белка при прорастании и созревании семян, в транспорте веществ из вегетативных органов.

Протеиназы играют первостепенную роль в формировании таких физиолого-биохимических свойств растений, как продуктивность, всхожесть и др.

Фитопатогенные микроорганизмы используют протеиназы в качестве атакующего агента.

Растения выработали различные защитные механизмы. Неотъемлемыми компонентами являются разнообразные **вещества белковой природы**, в том числе протеиназы, ингибиторы ферментов, в первую очередь, ингибиторы протеиназ, а также 1,3- β -глюканазы, хитиназы и др.



Ингибитор протеиназ II картофеля

ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ

- участвуют в регуляции внутриклеточных процессов
- играют активную роль в передаче внутриклеточных сигналов и превращениях защитных белков
- являются составной частью патогенного начала грибов и бактерий, помогая им преодолевать систему защиты растений и обеспечивать микроорганизмы необходимыми питательными элементами

В растениях может происходить инициация синтеза **протеолитических ферментов** в ответ на повреждение растительной ткани, например, насекомым или фитопатогеном. При этом транслируемый белок помогает растению противостоять действию патогена.

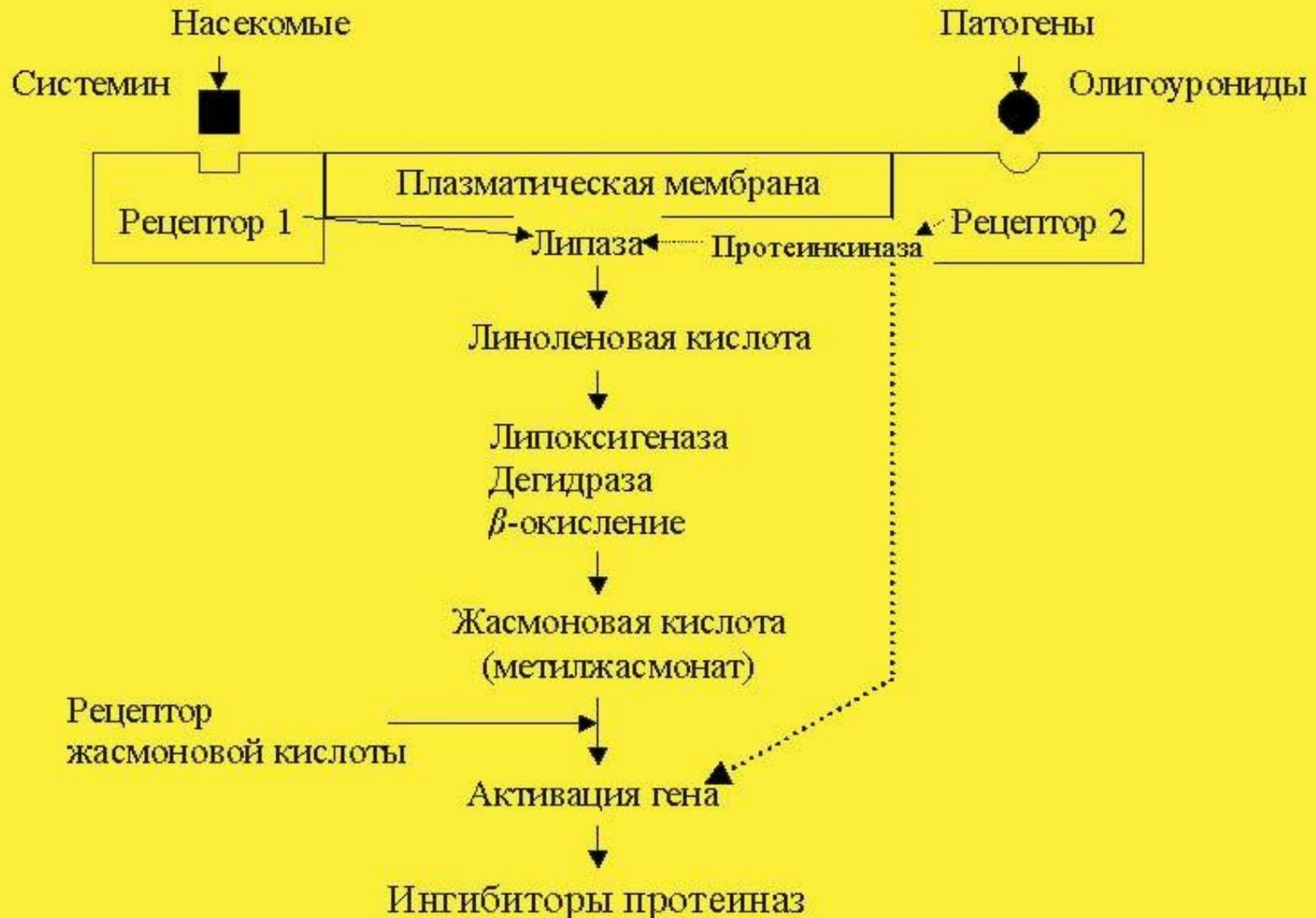
Участие протеиназ в регуляции внутриклеточных процессов

Могут играть **активную роль** в передаче внутриклеточных сигналов, процессинге и дальнейших превращениях различных защитных белков, в инициации апоптоза и непосредственно действовать на специфические белки и ферменты насекомых и патогенных микроорганизмов

Большинство защитных белков синтезируется в форме **неактивных предшественников**, которые затем превращаются в активные белки с помощью реакции ограниченного **протеолиза**:

раневой гормон системин
ингибитор сериновых протеиназ I томатов
ингибитор α -амилазы фасоли (*Phaseolus vulgaris*),
хитиназа табака (*Nicotiana tabacum*) и др.

Схема передачи сигнала индукции экспрессии генов ингибиторов протеиназ



Вакуолярная протеиназа – один из ферментов, осуществляющих процессинг запасных белков у ряда растений специфически расщепляет в белках пептидные связи, образованные карбоксильной группой аспарагина - пептиды с различной биологической активностью могут образовываться из единого предшественника

Было показано участие в процессинге предшественников белков **субтилизин-подобных сериновых протеиназ растений**, которые преимущественно гидролизуют пептидные связи, образованные гидрофобными аминокислотами – лейцином, фенилаланином, тирозином

В плазматической мембране листьев томатов присутствует белок, который избирательно связывает пептидный гормон **системин**.

Связывание сопровождается **гидролизом одной из пептидных связей** в молекуле гормона

Появляется **устойчивость к действию протеиназы**, при этом активность гормона на фоне индукции протеиназ в растениях томатов повышается

Участие протеиназ во взаимоотношениях растение-патоген

Была обнаружена **системная индукция синтеза протеолитических ферментов** в ответ на повреждение растительной ткани насекомыми или путем прямого механического воздействия (томаты)

Механическое повреждение одного-двух нижних листьев приводило к многократному увеличению активности **вакуолярной сериновой карбоксипептидазы** в листьях целого растения

К числу ферментов, синтез которых индуцируется при поранении растительной ткани, относятся также **лейцинаминопептидаза** в листьях картофеля и томатов, **цистеиновая протеиназа** в листьях табака и **аспартильная протеиназа** в листьях томатов

Фитопатогенные микроорганизмы наряду с другими ферментами продуцируют активные

экстрацеллюлярные протеазы

Корреляция между активностью экстрацеллюлярных протеаз фитопатогена и интенсивностью заболевания растения **может не наблюдаться**

Протеолитические ферменты играют также важную роль в преодолении защитных барьеров растений.

Протеазы фитопатогенных микроорганизмов способны расщеплять антимикробные белки растений, а также могут играть активную роль в разрушении белков растительной клеточной стенки

Реакция сверхчувствительности при взаимодействии растений с несовместимыми расами фитопатогенных микроорганизмов
Напоминает апоптоз у животных

Гибель клеток сои (*Glycine max*) при окислительном стрессе или при контакте с авирулентным штаммом *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* сопровождалась **индукцией синтеза цистеиновых протеиназ**. Одновременная индукция синтеза ингибитора цистеиновых протеиназ, **цистатина**, не только подавляла активность этих ферментов, но и блокировала процесс гибели клеток.

Процесс запрограммированной смерти клеток у растений может регулироваться соотношением между цистеиновыми протеиназами и их ингибиторами.

Особую группу составляют **сериновые протеиназы**, вовлеченные в защитные механизмы при поражении растений **фитопатогенными микроорганизмами**, а также при **абиотическом стрессе** (обработка растений этиленом и салициловой кислотой)

Один из факторов вирулентности грибных фитопатогенов – секретлируемые грибами **протеазы**
У *Alternaria alternata* и *Fusarium sambucinum*
протеолитические ферменты – **протеиназы серинового типа**

Протеиназы, по-видимому, включаются в целый ряд процессов в ходе заражения при бактериальной и грибной инфекции: обеспечивают питание патогена, облегчают проникновение грибных гиф в ткани хозяина, участвуют в переваривании тканей хозяина

ИНГИБИТОРЫ ПРОТЕИНАЗ РАСТЕНИЙ

Белковые ингибиторы протеолитических ферментов

- являются регуляторами эндогенных протеаз

- широко представлены в различных тканях животных, растений и микроорганизмов,

- контролируют множество внутриклеточных метаболических процессов.

Обнаружены **растительные ингибиторы протеиназ**, активно действующие на экзогенные ферменты насекомых и патогенных микроорганизмов.

Локализация и индукция действия ингибиторов протеиназ растений

Характерной особенностью всех белков, связанных с патогенезом, в том числе ИП, является их обычная **локализация в межклеточном пространстве и клеточной стенке**

Белковый ингибитор **полигалактуроназы** найден в клеточных стенках многих двудольных и некоторых однодольных растений, как зараженных фитопатогенными микроорганизмами, так и незараженных

Секреция ингибиторов протеиназ в **экстрацеллюлярное пространство** происходит в процессе прорастания семян. Так, ингибиторы трипсина и химотрипсина при набухания семян бобовых способны быстро диффундировать в окружающий раствор

В трансгенных растениях томатов **ингибиторы протеиназ I и II** откладываются в стенках клеток эндосперма и секреторных клетках корневого чехлика, а также частично секретируются в окружающую среду, что позволяет осуществлять защиту растущей меристемы корней от проникновения патогенных

Действие грибных и бактериальных протеиназ на растения индуцирует ответ растительной клетки, что, прежде всего, связано с образованием в месте повреждения специфического «раневого гормона», обозначаемого как **PIIF (proteinase inhibitor-inducing factor)**.

PIIF – растворимый богатый остатками уроновой кислоты пектиновый полисахарид с молекулярной массой 5 кД, образующийся в результате разрушения растительной клеточной стенки

Основным механизмом действия **PIIF** является индукция синтеза ингибиторов протеиназ.

Способность к образованию **PIIF** в ответ на повреждение была обнаружена у представителей семейств Fabaceae, Cucurbitaceae и Populus

Кроме самого **PIIF** образование ингибиторов протеиназ может индуцироваться **продуктами деградации PIIF**, а также другими веществами, такими как пектин цитрусовых, производные хитина и хитозана – элиситоры в реакциях синтеза фитоалексинов

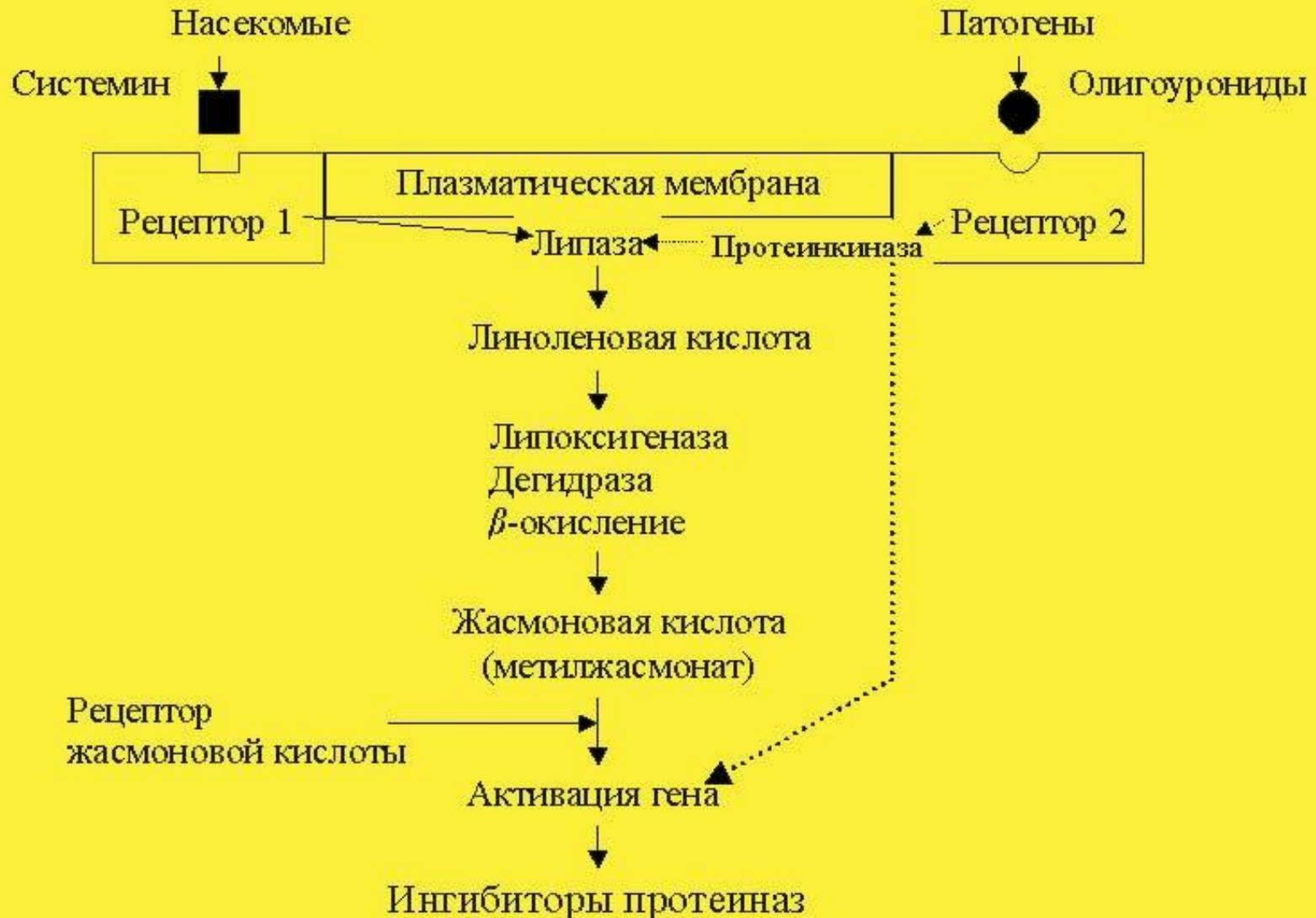
Таким образом, **фрагменты растительных и грибных клеточных стенок**, образующиеся в результате повреждения растений микроорганизмами и насекомыми, могут выступать как **индукторы образования ингибиторов протеиназ**.

Другим полипептидом, индуцирующим синтез ингибиторов протеиназ, является **системин**, выделенный из плодов и листьев томатов. Установлена полная аминокислотная последовательность этого полипептида.

Предполагается, что **системин** представляет собой раневой фитогормон пептидной природы.

Риан и сотр. была предложена схема распространения сигнала индукции биосинтеза ингибиторов протеиназ в ответ на поражение растения насекомыми и фитопатогенными микроорганизмами.

Схема передачи сигнала индукции экспрессии генов ингибиторов протеиназ



Предполагается, что существуют по крайней мере два различных пути распространения сигнала.

Первый путь - при поранении листьев растения насекомыми или при механическом повреждении

Иницируется системином, который быстро транспортируется в клетки по всему растению и взаимодействует со специфическими рецепторами, локализованными на плазматических мембранах клеток.

Рецепторы иницируют каскад реакций, который приводит к образованию жасмоновой кислоты (или метилжасмоната).

Последние, взаимодействуя со специфическим рецептором, активируют **экспрессию генов ингибиторов протеиназ**.

Второй путь реализуется при действии на растение фитопатогенных микроорганизмов

Индукция олигоуруонидами, в том числе и PIIF, которые освобождаются из клеточных стенок патогенов и взаимодействуют со специфическими рецепторами на плазматической мембране клеток

PIIF-рецепторные комплексы способны активировать **протеинкиназы**, которые, в свою очередь, могут активировать **экспрессию генов ингибиторов протеиназ**, а также **синтез фитоалексинов**

Участие ингибиторов протеиназ в регуляции активности внутриклеточных ферментов растений

Ингибиторы протеолитических ферментов принимают участие в регуляции активности **собственных протеиназ растений**

Ингибитор трипсина из латука может подавлять активность собственной трипсиноподобной протеиназы, участвующей в деградации запасных белков в прорастающих семенах

Присутствие **ингибиторов, подавляющих собственные протеиназы**: у коровьего гороха, люпина (сем. Fabaceae), пшеницы, кукурузы (сем. Poaceae), гречихи (сем. Polygonaceae) и др.

Во многих случаях ингибиторы, действующие на эндогенные протеиназы растений, отличаются от ингибиторов трипсина, химотрипсина и протеиназ микроорганизмов, присутствующих в клетках тех же объектов, что было показано на ячмене, маше, кукурузе, люцерне, гречихе и др.

Кроме ингибиторов, регулирующих активность эндогенных ферментов, участвующих в распаде запасных белков семян, в растениях обнаружены **ингибиторы, которые могут действовать и на протеиназы, выполняющие регуляторные функции в растительном организме.**

В покоящихся семенах кукурузы был идентифицирован белок-ингибитор специфической сериновой протеиназы, принимающей участие в ферментативной деградации нитратредуктазы

Ингибиторы протеиназ являются **полифункциональными**

Классический ингибитор **сериновых протеиназ** сои STI способен подавлять активность **цистеиновых протеиназ**

Из семян элевсины (*Eleusine coracana*) был выделен бифункциональный белок, способный подавлять активность как **трипсина**, так и **α -амилазы**

Белки, способные подавлять активность **субтилизина** и эндогенной **α -амилазы**, были выделены из ячменя, пшеницы, ржи (*Secale cereale* L.) и риса (*Oryza sativa* L.)

Ингибиторы, способные подавлять активность **сериновых протеиназ и α -амилаз**, по-видимому, могут играть существенную роль в защите растений от

Ингибиторы протеиназ в системе защиты растений от биотических стрессов

Механизмы действия ингибиторов протеиназ при защите от **фитопатогенов и насекомых** в целом одинаковы.

Однако имеются определенные отличия. Они касаются как механизма передачи сигнала, так и некоторых особенностей ответной реакции растений

Ингибиторы протеиназ в системе защиты растений от насекомых

В середине 60-х годов из семян сои и пшеницы (*Triticum aestivum*) были выделены белки, действующие как специфические ингибиторы **протеолитических ферментов кишечника насекомых рода *Tribolium***

Поражение листьев томатов и картофеля колорадским жуком (*Leptinotarsa decemlineata*) или их механическое повреждение вызывают системную **индукцию синтеза ингибиторов сериновых протеиназ**

Системная индукция ингибиторов протеиназ в ответ на повреждение растительной ткани была наиболее подробно изучена у представителей семейства Пасленовые (*Solanaceae*)

Многие белки растительного происхождения, первоначально описанные как ингибиторы трипсина и химотрипсина, являются эффективными **ингибиторами протеиназ**, содержащихся в кишечнике насекомых, и подавляют их активность, что приводит к задержке роста и развития, а в некоторых случаях к гибели насекомых, что объясняется близостью свойств **сериновых протеиназ** из пищеварительного тракта насекомых и млекопитающих

Модифицированный ген ингибитора ингибиторе трипсина из коровьего гороха (*Vigna unguiculata*) был перенесен в растение табака и приводил к **повышению устойчивости к поражению личинками вредителей табака** *Heliothis virescens* и *Manduca sexta*.

Рост личинок табачного бражника (*Manduca sexta*) сильно **задерживался** и на листьях трансгенных растений табака, экспрессирующих ген ингибитора II из листьев томатов

Трансгенный рис, трансформированный геном ингибитора протеиназ однодольных - цистатина кукурузы (*Zea mays*)

Экстракты из листьев картофеля, содержащего ген оризацистатина I, эффективно **подавляли активность протеиназ колорадского жука**

Ингибиторы протеиназ в системе защиты растений от патогенных микроорганизмов

Многие белки-ингибиторы протеаз растительного происхождения способны подавлять активность **протеолитических ферментов фитопатогенных микроорганизмов**

В 1976 г. было впервые показано **действие ингибиторов типа Баумана-Бирк** из сои и фасоли и **ингибиторов I и II** из картофеля на протеиназы, секретируемые в культуральную жидкость фитопатогенными грибами рода *Fusarium* (*F. solani* и *F. sambucinum*), которые вызывают гниль корней, плодов и семян, а также трахеомикозное сосудистое увядание у растений - представителей различных семейств.

Подавление протеолитической активности может приводить к нарушению способности утилизировать растительные белки и соответственно к угнетению роста и развития фитопатогенных микроорганизмов.

Ингибиторы трипсина и химотрипсина, выделенные из семян фасоли и кукурузы, тормозят рост гиф и прорастание конидий фитопатогенных грибов *F. solani*, *F. culmorum*, *Botrytis cinerea*, *Aspergillus flavus*, *Asp. parasiticus* и *F. moniliforme*

Ингибитор трипсина, выделенный из семян гречихи (*Fagopyrum esculentum*), подавлял активность **протеиназ** гриба *Alternaria alternata*, поражающего многие культурные и дикорастущие растения, а также эффективно тормозил прорастание спор и рост мицелия грибов *Al. alternata* и *F. oxysporum*.

Белковые ингибиторы протеиназ из семян и листьев разных видов люпина подавляли активность протеаз рода *Fusarium*, задерживали рост и развитие фитопатогенного гриба, а также снижали концентрацию X-вирусов в растениях картофеля

В тканях картофеля и томатов присутствуют **ингибитор I** и **ингибитор II**, биосинтез которых кодируется различными негомологичными семействами генов

Ингибитор I эффективно ингибирует химотрипсин: способен подавлять рост и развитие оомицета *Phytophthora infestans*, возбудителя

фитофтороза

Оба ингибитора эффективно подавляют также активность **сериновых протеиназ микроорганизмов**, например, субтилизин и протеиназы некоторых грибов рода *Aspergillus*.

Ингибитор II проявляет активность как по отношению к химотрипсину, так и по отношению к

Кроме того, в клубнях картофеля были обнаружены ингибиторы, действующие также и против **цистеиновых протеиназ**

У растений обнаружены белки, обладающие специфической ингибиторной активностью против **протеиназ микроорганизмов**: у бобовых (фасоль обыкновенная, коровий горох, конские бобы), у бразильской гевеи (*Hevea brasiliensis*) и ряда других растений

Специфические ингибиторы протеиназ микроорганизмов из растений обладают рядом **особенностей первичной структуры белков**, отличающих их от ингибиторов протеиназ животных: значительно более низкое содержание остатков цистеина или даже полное их отсутствие по сравнению с аминокислотным составом ингибиторов протеиназ животных, таких как трипсин и химотрипсин

Белок-ингибитор, действующий на микробные протеиназы и не активный по отношению к трипсину и собственным протеиназам, специфически подавляющий активность щелочных протеиназ *Asp. oryzae*, *Alternaria tenuissima* и *Streptomyces griseus*, был обнаружен в семенах ячменя (*Hordeum vulgare* L.).

Другой высокоспецифичный **ингибитор микробных протеиназ** выделен из семян фасоли: избирательно подавлял активность сериновой протеиназы гриба *Colletotrichum lindemuthianum*, возбудителя антракноза, и совсем не действовал на трипсин и химотрипсин. В то время как ингибиторы трипсина и химотрипсина, выделенные из фасоли, по отношению к данной протеиназе были не активны

Ингибиторы цистеиновых протеиназ из растений также способны подавлять рост и развитие фитопатогенных грибов, например, *Bot. cynerea* и некоторых других

Экспрессия **ингибитора цистеиновых протеиназ** в табаке повышает устойчивость растений к потивирусам, процессинг которых зависит от активности цистеиновых протеиназ

Инфицирование растения дыни (*Cucumis melo*) грибом *Colletotrichum lagenarium* вызывает увеличение ингибиторной активности по отношению к **грибной протеиназе**

Инфицирование плодов яблони грибами *Verticillium dahliae* (с хлопчатника), *Fusarium graminearum* (с пшеницы), *Septoria nodorum* (с пшеницы) и *Fusarium solani* (с клубней картофеля) приводит к активации синтеза **белкового**

Индукция синтеза ингибиторов протеиназ наблюдалась и при **бактериальной инфекции**.

Инокуляция листьев томатов патогенной бактерией *Ps. syringae* pv. *tomato* приводила к накоплению мРНК **ингибиторов сериновых протеиназ I и II**. Но при бактериальном заражении системная индукция ингибиторов протеиназ носила ограниченный характер

Активация синтеза **ингибиторов протеиназ** в ответ на поражение патогенными микроорганизмами обнаружена и у однодольных растений. Поражение проростков кукурузы грибом *F. moniliforme* приводило как к локальной, так и к системной индукции синтеза **ингибитора протеиназ**

Из семян одной из разновидностей проса (*Pennisetum glaucum*) был выделен **ингибитор цистеиновых протеиназ**, который подавлял рост ряда фитопатогенных грибов, относящихся к родам *Claviceps*, *Alternaria*, *Fusarium* и некоторых других.

При этом антигрибная активность не являлась результатом подавления активности протеолитических ферментов грибов, возможно, **ингибиторы протеиназ** способны изменять проницаемость плазматических мембран фитопатогенных грибов.

Аналогичные данные были получены на подсолнечнике (*Helianthus annuus*), где **ингибитор протеиназ** подавлял прорастание оксоспор и рост мицелия гриба *Sclerotinia sclerotiorum*, естественного патогена подсолнечника.

В последние годы появились данные, указывающие на то, что **ингибиторы протеиназ** могут играть существенную роль также в устойчивости растений к вирусным заболеваниям.

Из клеточного сока растения рода *Phytolacca* был выделен **ингибитор**, представляющий собой небольшой (13 кДа) лизин-богатый (12 %)

Ингибитор активности тиоловой протеиназы, кодируемой вирусом мозаики коровьего гороха, приводящий к нарушению процессинга вирусного полибелка

Характеристика белковых ингибиторов сериновых протеиназ гречихи

Большинство известных и исследованных в настоящее время ингибиторов протеиназ из растений взаимодействуют с **сериновыми протеиназами** (трипсином, химотрипсином, субтилизином), которые широко распространены в растительных клетках

При разгоне на колонках белков покоящихся семян гречихи выявляются **фракции ингибиторов трипсина**, подавляющих прорастание спор и рост мицелия гриба *Alternaria alternata*

Было выявлено наличие среди них анионных и катионных ингибиторов протеаз из гречихи

В экспериментах установлено, что аминокислотный составы трех очищенных **анионных ингибиторов протеиназ гречихи** (BWI-1a, BWI-2a и BWI-4a) сходны и характеризуются высоким содержанием **глутаминовой кислоты** и **валина**, а также низким содержанием **изолейцина**, **ароматических** и **серосодержащих аминокислот**.

Остатки цистеина, входящие в состав ингибиторов, либо перекрестно связаны дисульфидными связями, либо образуют смешанные дисульфиды с неким посторонним соединением типа глутатиона.

Анализ аминокислотной последовательности ингибитора **BWI-1a** показал, что она на 65 % идентична последовательности ингибитора трипсина и субтилизина из амаранта *Amaranthus caudatus*, на 50 % - последовательности ингибитора трипсина из тыквы *Cucurbita maxima* и на 49 % - ингибитора глутаминовой протеазы *Streptomyces griseus* из бутылочной тыквы *Momordica charantia*.



BWI-1a относится к хорошо изученному семейству ингибитора протеиназ I из картофеля.

В состав реактивного центра ингибитора входят остатки Arg45-Asp46

Влияние ингибиторов BWI-1a, BWI-2a и BWI-4a на активности различных протеолитических ферментов

Протеиназа	IC ₅₀ , мкг/мкг		
	BWI-1a	BWI-2a	BWI-4a
Трипсин-подобный фермент			
<i>A. alternata</i>	0,15	0,11	0,45
<i>F. oxysporum</i>	0,29	0,21	1,60
Трипсин быка	0,45	0,45	0,50
Трипсин краба	0,50	0,45	3,60
Химотрипсин	2,3	2,5	не инг.

Показано, что BWI-1a и BWI-2a кроме активности **трипсина** ингибируют также активность **химотрипсина**, хотя и с меньшей эффективностью.

Ни один из исследованных ингибиторов не подавлял активности **папаина, пепсина, эластазы, бактериального субтилизина и субтилизин-подобного фермента** из *Macrula prolifera*.

Прединкубация BWI-1a и BWI-2a с химотрипсином снижала ингибирующую активность этих белков по отношению к трипсину не более чем на 13 %, тогда как прединкубация с трипсином полностью устраняла химотрипсин-ингибирующую активность.

По-видимому, BWI-1a и BWI-2a имеют по одному центру связывания ферментов, но их сродство к трипсину значительно выше, чем к химотрипсину.

Изучение влияния исследованных ингибиторов на рост грибов *A. alternata* и *F. oxysporum* выявило **угнетение роста мицелия этих грибов** вокруг лунок с ингибиторами. Спустя двое суток после заражения грибами вокруг лунок наблюдали светлые зоны. Мицелий в этих зонах развивался крайне слабо, был редким и стелился по поверхности среды.

Влияние BWI-1a из семян гречихи на рост мицелия фитопатогенных грибов

Количество ингибитора, мкг	Зона ингибирования роста мицелия, мм	
	<i>A. alternata</i>	<i>F. oxysporum</i>
48	3	4
24	2	4
12	1,5	3
6	1	2,5
3	0	1

Сравнение констант ингибирования сериновых протеиназ ингибиторами протеаз из семян гречихи и других растительных источников (по Цыбиной, 2002)

Ингибитор	P ₁	K _i , М		
		трипсин	химотрипсин	субтилизин
BWI-1a	Arg	$(1,1 \pm 0,09) \times 10^{-9}$	$(6,7 \pm 0,3) \times 10^{-7}$	не опр.
BWI-1c	не опр.	$(3,8 \pm 1,1) \times 10^{-10}$	$(2,0 \pm 0,7) \times 10^{-9}$	не инг.
BWI-2c	Arg	$(4,7 \pm 1,2) \times 10^{-10}$	$(4,8 \pm 1,4) \times 10^{-8}$	не инг.
BWI-3c	Lys	$(4,1 \pm 1,0) \times 10^{-10}$	$(8,4 \pm 2,5) \times 10^{-9}$	$(6,5 \pm 1,9) \times 10^{-9}$
LA-1	Arg	$1,2 \times 10^{-9}$	не инг.	не инг.
MTI-2		$1,6 \times 10^{-10}$	$5,0 \times 10^{-7}$	не опр.
ATSI	Lys	$3,4 \times 10^{-10}$	$4,1 \times 10^{-10}$	$3,7 \times 10^{-10}$

BWI-1a - анионный ингибитор трипсина из гречихи; BWI-1c-3c – катионные ингибиторы сериновых протеиназ из гречихи; LA-1 – ингибитор трипсина семейства тыквенных ингибиторов из люффы *Luffa acutangula*; MTI-2 - ингибитор сериновых протеиназ из семян горчицы *Sinapis alba*; ATSI – ингибитор семейства картофельного ингибитора I из семян амаранта *Amaranthus caudatus*.

ДЕФЕНЗИНЫ РАСТЕНИЙ

Растительные дефензины принадлежат к большому семейству антимикробных пептидов с цистеин-стабилизированным $\alpha\beta$ -мотивом

Достаточно широко представлены у **многоклеточных организмов**, что свидетельствует о важности этих защитных молекул как основных компонентов стратегии защиты от стрессовых факторов.

В растениях гены дефензинов могут быть индуцированы как **биотическими**, так и **абиотическими стрессами**, что приводит к их экспрессии в определенных типах клеток.

Структура дефензинов растений

Дефензины растений – это семейство небольших (около 5 kD), обычно основных, пептидов, богатых цистеиновыми остатками, связанными дисульфидными мостиками.

Собственные **дефензины** обнаружены в более чем 20 видах растений: *Hordeum spp.*, *Triticum spp.* (сем. Poaceae), *Aesculus hippocastanum* (сем. Hippocastanaceae), *Clitoria ternatea* (сем. Fabaceae), *Dahlia merckii* (сем. Asteraceae), *Heuchera sanguinea* (сем. Saxifragaceae), *Amaranthus caudatus* (сем. Amaranthaceae), пять видов сем. Brassicaceae и др.

Выделены из **различных органов растений** или идентифицированы через секвенирование клонов cDNA. Сравнение аминокислотных последовательностей показало их относительную гетерологичность

```

A# number      1      10      20      30      40      50      60      70      80      90
* 18557 Rs-AFP1      QKLCERPSGT--WSGVCGNNNA---CKNQCINLEKAR---HGSCNYVFFPAHK-CICYFPC
. 97319 Rs-AFP3      KLCERSSTGT--WSGVCGNNNA---CKNQCIRLEGAQ---HGSCNYVFFPAHK-CICYFPC
  Dm-AFP1      ELCEKASKT--WSGNCGNTGH---CDNQCCKSWEGAA---HGACHVRNGKH-MCFCYFNC
P20230 g-thionin      RICRRRSAG--FKGPCVSNKN---CAQVCMQ-EGWG---GGNCDG--PLRR-CKCMRRC
  o-thionin      RICRGKSQLHHF--PCISDKS---GARNCVS-EH-GAHWTAGYCH---LRR-CTCQREC
P21924 aml inhibit 2  RVMGKSAG--FKGLCMRDQN---CAQVCLQ-EGWG---GGNCDGV--MRQ-CKCIROCW
Z11748 tob FST      RECKTESNT--FPGICITKPP---CRKACIS-EKFTD---GHCSKL--LRR-CLCTKPCVFDEKMIKTGAETLVEEAKTLAA
X53375 sunfl SF18    HGKICEKPSKT--WFGNCKDTDK---CDKRCIDWEGAK---HGACHQREAKHM-CFCYFDCDPQK
X84208 mustard mti-2  DSECLKEYGGDVGFPFCAPRIPTICYTRC-R-ENKGAK--GGRCIWGEGTNVKCLCDY-CNDSPFDQILRGGI
X52874 rape Bp4A     QKKNCPHKIPIK-G-SYCAPTI---CLDMCKKQHGTV---GSCAEKGF---CNCA--CK
X97054 PCP1      QEKKTDNQCNLPLINQSG-T-CAANQ---CQAACVVRHKDGV---GKCTTNPDKKMRCCFCYLCFR
X75595 drosomycin      DCL--SGRYKG-P-CAVWDNET--CRRVCKE-EGRSS---GHCSPSLK---CWCE-GC
          *****          ***          ***
Z11748      ALLEEEIMDN

```

Сравнение последовательностей растительных дефензинов и растительных дефензин-подобных протеинов. Цистеины обозначены рамкой. Цистеин-стабилизирующие отпечатки α -спирали обозначены звездочками внизу и вверху последовательностей. Rs-AFP1 и 3 из *Raphanus sativus*; Dm-AFP1 из *Dahlia merckii*; g-тионин: γ -тионин из ячменя; o-тионин: ω -тионин из ячменя; aml inhibit 2 из сорго; tob FST из табака; sunfl SF18 из подсолнечника; mustard mti2 из *Sinapis alba*; rape Bp4A: белок оболочки пыльцы *Brassica napus*; PCP1: белок оболочки пыльцы *B. oleraceae* и drosomycin из *Drosophila*

При этом были выявлены консервативные положения **восьюми цистеинов, двух глицинов в позициях 13 и 34, серина в позиции 8, ароматического остатка в позиции 11 и глутаминовой кислоты в позиции 29,** которые являются частью цистеин-стабилизированного $\alpha\beta$ -мотива, характеризующегося последовательностями CXXXC, GXС и CXС (где С – остатки цистеина, а Х – любая аминокислота)

Наибольшая **гомология** была найдена между дефензинами с **одинаковой биологической активностью**. Антимикробный пептид Dm-AMP1 из *Dahlia merckii* (сем. Asteraceae), например, идентичен другим антимикробным пептидам Ah-AMP1 из *Aesculus hippocastanum* (сем. Hippocastanaceae) и Ct-AMP1 из *Clitoria ternatea* (сем. Fabaceae) на 68 % и 72 % соответственно, но лишь на 46 % идентичен фунгицидному белку Hs-AFP1 из *Heuchera sanguinea* (сем. Saxifragaceae).

Локализация и предполагаемый механизм действия дефензинов растений

Было показано, что дефензины растений **экспрессируются почти в каждом органе растения**, включая листья, корни, клубни, органы цветения, плоды и семена

В *Arabidopsis thaliana* в результате секвенирования cDNA было идентифицировано **пять генов дефензинов** (*PDF1.1*, *PDF1.2*, *PDF2.1*, *PDF2.2* и *PDF2.3*). При этом показана их дифференцированная тканеспецифическая экспрессия. Так, в здоровых растениях арабидопсиса *PDF1.1* экспрессируется в семенах и стручках, *PDF2.1* в корнях, стручках и семенах, *PDF2.2* во всех органах, кроме стеблей и семян, и *PDF2.3* во всех органах, кроме корней

Методами иммунологической или *in situ*-гибридизации была показана локализация и аккумуляция **конститутивно экспрессируемых дефензинов** растений преимущественно в периферических клеточных слоях.

В семенах редьки наивысшие концентрации дефензинов растений находятся во **внешних клеточных стенках эпидермиса колеоптиля, гипокотыля и эндосперма**

В клубнях картофеля наибольшая степень транскрипции гена дефензина наблюдается в **эпидермисе и листовых примордиях глазков**

В здоровых листьях сахарной свеклы дефензины были преимущественно расположены в **клетках аппарата устьиц**

По крайней мере, на четырех видах растений, а именно в горохе, табаке, редисе и арабидопсисе, было показано, что дефензины индуцируются под действием **грибной инфекции** на вегетативные ткани

У редиса и арабидопсиса показана **системная индукция грибным патогеном**, то есть дефензины могут быть обнаружены не только в инфицированных, но также в неинфицированных листьях

Несколько **конститутивно экспрессируемых генов дефензинов** находятся в состоянии понижающей регуляции под действием грибной инфекции.

Понижающая регуляция этих избирательно экспрессируемых генов может быть результатом секреции патогеном супрессорных молекул

Было установлено, что экспрессию дефензина арабидопсиса *PDF1.2* индуцирует экзогенное применение или **метилжасмоната** (MeJA), или **этилена**.

Измерение уровня жасмоновой кислоты (JA) показало, что ее **эндогенный уровень увеличивался** одновременно с **системным накоплением дефензинов** в листьях растения арабидопсиса, инфицированных *Alternaria brassicicola*

Исследования механизма подавления дефензинами роста грибов показали, что дефензины растений **индуцируют быстрое поглощение Ca^{2+} и отток K^+ через мембрану гриба**, что приводит к подщелачиванию среды

Дефензины редьки Rs-AFP2 и георгина Dm-AMP1 не образовывали ион-проникающих пор в искусственных фосфолипидных мембранах

Растительный дефензин из картофеля не оказывал значительного увеличения проницаемости искусственных фосфолипидных пузырьков для молекул флуоресцирующего красителя

Ингибирующие эффекты дефензинов растений имеют, по всей видимости, рецепторный механизм действия

Один из предполагаемых механизмов действия состоит в том, что мембранный рецептор позволяет растительным **дефензинам встраиваться в мембрану** и образовывать ион-пропускающие поры.

Другой возможный механизм – связывание растительных дефензинов с их рецепторами **активирует эндогенные сигнальные компоненты трансдукции**, которые в свою очередь влияют на активность эндогенных переносчиков

Классификация дефензинов растений

Морфогенные дефензины растений приводят к редукции роста гифов и одновременному увеличению числа ветвей, тогда как **неморфогенные дефензины** растений только замедляют рост гифов, но не индуцируют заметных морфологических изменений.

Дефензин морфогенного типа, выделенный из *Heuchera sanguinea* (сем. Saxifragaceae), вызывает множественное почкование и набухание проростковых трубок и гиф, которые также можно видеть в случае белков, полученных из растений сем. Brassicaceae, типичным представителем которых является Rs-AFP2 из *Raphanus sativus*.

Напротив, дефензины, выделенные из *Dahlia merckii*, *Clitoria ternatea*, *Aesculus hippocastanum*, относящиеся к **неморфогенному типу**, ингибируют элонгацию проростковых трубок, но практически не вызывают их морфологических изменений у *Fusarium culmorum*.

Наличие двух типов дефензинов предполагает различные механизмы ингибирования грибного роста, что косвенно подтверждается различной чувствительностью их антигрибной активности к температуре, а также их способностью ингибировать рост некоторых грам-положительных бактерий. Фунгицидная активность **неморфогенных дефензинов** выше при более низких температурах, антигрибная активность **морфогенных** не нарушалась под действием температуры.

Фунгицидная активность дефензинов растений

Анализ антимикробной активности различных дефензинов показал, что область **от cys-27 до cys-47** очень важна для **токсичности против грибов**. Также была продемонстрирована важная роль взаимосвязи типа VI β -поворота с антигрибным действием

Мутационный анализ позволил идентифицировать **два района, важных для фунгицидного действия белка Rs-AFP2** против *Fusarium culmorum*: первый – это домен, включающий позиции tyr-38 - ile-46 и состоящий из специфического β -поворота и первой части β -цепи III; второй – аминокислотные остатки thr-10 и ser-12, связывающие β -цепь I и α -спираль, и соприкасающиеся остатки leu-28 и phe-49 на α -спирали и последняя часть β -цепи III. При этом была отмечена особая роль tyr-38 в активации антигрибной активности дефензинов

При использовании точечного мутагенеза было показано, что **замена нейтральных остатков gly-9 и val-39 заряженным аргинином** (G9R и V39R варианты, соответственно) **увеличивает токсичность** антигрибного протеина Rs-AFP2 для *F. culmorum*, в то время как нейтральный глутамин в положении lys-44 сокращает ее.

На трех грибах (*Fusarium culmorum*, *Nectria haematococca* и *Verticillium dahliae*) **Rs-AFP2/V39R был более активен**, чем Rs-AFP2. С другой стороны, Rs-AFP2/V39R также имел схожую с Rs-AFP2 фунгицидную активность или был менее активен против других грибов. Также подтверждено существование высокоспецифичного механизма узнавания между дефензинами растений и их сайтами-мишенями у грибов

Фунгицидная активность как морфогенных, так и неморфогенных дефензинов растений **уменьшается с увеличением ионной силы** в среде для роста грибов.

Двухвалентные катионы, по крайней мере, на порядок сильнее **ингибируют дефензины**, чем одновалентные Ca^{2+} , Mg^{2+} и Ba^{2+} одинаково эффективно ингибируют фунгицидную активность дефензинов растений

Выявлено, что **антагонистическое действие катионов** сильно зависит от гриба и типа дефензина растения
По относительной активности дефензинов на различных грибах могут наблюдаться заметные различия в спектре их активности

Фунгицидная активность различных пептидов

Грибы	Значения IC ₅₀ (мкг/мл)				
	Ah-AMP1	Ct-AMP1	Dm-AMP2	Hs-AFP1	Rs-AFP2
<i>Botrytis cinerea</i>	25	20	10	6	10
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	0.5	6	3	1	3
<i>Fusarium culmorum</i>	12	10	3	1	1.5
<i>Leptosphaeria maculans</i>	0,5	6	1	25	12
<i>Penicillium digitatum</i>	6	20	2	1	1.5
<i>Trichoderma viridae</i>	>100	>100	>100	15	30
<i>Septoria tritici</i>	0.5	2	1	0.5	1.5
<i>Verticillium albo-atrum</i>	6	2	2	12	12

Бактерицидная активность дефензинов растений

Антибактериальные активности пептидов были измерены на четырех грам-положительных (*Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus faecalis*) и двух грам-отрицательных (*Escherichia coli* и *Proteus vulgaris*) бактериях.

Фунгицидные белки из *Heuchera sanguinea* (сем. Saxifragaceae) и *Raphanus sativus* (сем. Brassicaceae) **не ингибировали рост** никакой из бактерий в дозе 200 мкг/мл, в то время как антимикробные белки из *Aesculus hippocastanum* (сем. Hippocastanaceae), *Clitoria ternatea* (сем. Fabaceae) и *Dahlia merckii* (сем. Asteraceae) **ингибировали рост** только *Bacillus subtilis* при 150, 15 и 100 мкг/мл соответственно, но не нарушали рост других бактерий

Вклад дефензинов в защиту растения-хозяина

Дефензины играют важную роль в защите семян или всходов от **проникновения почвенных грибов**

В экспериментах на редисе было показано, что **дефензины** высвобождаются из семян, когда семенная оболочка повреждена (перфорирована) (как корешком растущего зародыша в естественных условиях, так и искусственно с помощью скальпеля).

Выделенное количество белка достаточно для создания области вокруг семян, в которой **рост гриба подавляется**.

Дефензины играют роль в **защите тканей всходов** во время ранних стадий проявления инфекции и таким образом могут вносить вклад в увеличение количества

Растения табака были протрансформированы химерной генной конструкцией, включающей кодирующую область гена Rs-AFP2 дефензина редьки под контролем конститутивного промотора. T2-поколение растений табака показывало **семикратное уменьшение размеров пораженных участков** под действием инфекции грибного патогена листьев *Alternaria longipes* относительно нетрансформированных растений

Следовательно, при постоянной экспрессии на высоком уровне, по крайней мере, **нескольких генов дефензинов** можно говорить об усиленной устойчивости к определенным (отдельным) микробным болезням.

Болезни картофеля

Картофель относится к числу культур, в сильной степени поражаемых болезнями и вредителями, которые нередко являются основной причиной резкого снижения его урожая. Общие мировые потери клубней от вредителей и болезней составляют более 30 % валового сбора, что оценивается в 3,5...4,5 млрд долл. США

Из вредителей наиболее опасны колорадский жук, картофельная коровка (эпиляхна) и проволочники. Кроме того, картофелю вредят картофельная и стеблевая нематоды.

Болезни поражают картофель как во время вегетации, так и в период хранения. **Возбудителями болезней картофеля являются грибы, бактерии, вирусы и микоплазменные организмы**

Фитофтороз

Возбудитель - гриб *Phytophthora infestans* D.В. Первые признаки - на нижних листьях по краям листа в виде небольших пятен бурого цвета. На нижней стороне листьев по краю пятен, на границе с зеленой тканью заметен нежный серовато-белый мучнистый налет. В сырую погоду пятна мокнут и загнивают, в сухую – пораженные листья засыхают. Заболевание сильно проявляется в начале цветения картофеля. Клубни заражаются в поле во время уборки. На поверхности клубней образуются твердые буровато-серые пятна, вдавленные внутрь ткани. На разрезе клубня через такое пятно видна ржаво-бурая губчатая пораженная ткань.

Ризоктониоз (белая ножка, черная парша клубней)

Возбудитель - гриб *Rhizoctonia solani* Kuhn. На растениях образуются глубокие мокнущие коричневые язвы, верхняя часть растения вместе с точкой роста коричневеет и отмирает. Верхние листья скручиваются вдоль главной жилки. На нижней части растений появляются коричневые мокнущие или сухие язвы. Листья желтеют, скручиваются. Во влажную погоду во второй половине лета у основания стебля возникает серовато-белый войлочный налет (белая ножка). Основание стебля, корни и столоны сгнивают. На клубнях образуются склероции (покоящаяся стадия гриба) в виде черных, твердых наростов различных форм и размера, не отмывающихся водой.

Фузариозное увядание, сухая гниль

Возбудитель - гриб *Fusarium spp.* На растениях нижняя часть стебля буреет, при повышенной влажности загнивает и покрывается розовым или оранжевым налетом, листья принимают желтый/бронзовый цвет. Листья увядают и отмирают. При поражении клубней болезнь проявляется после закладки картофеля на хранение. Вначале на клубне появляются серовато-бурые, слегка вдавленные пятна, покровная ткань немного сморщивается. Мякоть под пятном становится рыхлой, приобретает буроватую окраску.

Парша обыкновенная

Возбудитель - актиномицеты *Streptomyces scabies* Waks et Henr. и другие виды. На поверхности клубней, столонах и корнях образуются коричневые язвы неправильной формы и различной величины. Выделяют паршу плоскую, обычную, глубокую, пуговичную, выпуклую и бородавчатую. Инфекция сохраняется в почве и на семенных клубнях.

Рак картофеля

Возбудитель - гриб *Sinchytrium endobioticum* (Shilb).

Проявляется в виде различного рода разрастании тканей (наростов). Наросты могут возникнуть на всех органах растений картофеля, за исключением корневой системы.

Черная ножка и бактериальная мягкая (мокрая) гниль
Возбудитель - бактерии *Erwinia caratovora. var. atroseptica* и *Erwinia chrysanthemi*. **Черная ножка** проявляется в увядании и загнивании стеблей, а также в поражении клубней. Больные растения или отдельные их стебли увядают, отстают в росте. Доли листа скручиваются вдоль центральной жилки краями вверх, вянут и темнеют. При активном развитии болезни отмечается пожелтение нижних листьев, их дольки свертываются лодочкой. Верхние листья свертываются под острым углом и желтеют. Основание стебля и корневая система загнивают и приобретают интенсивно-черную окраску.

Мягкая бактериальная гниль поражает клубни. В месте прикрепления клубня к столону отмечается размягчение бесцветного или светло-желтого цвета. Позже образуется выгнившая полость. При наличии благоприятных условий зона загнивания увеличивается и приобретает специфический винный запах. Позже появляется неприятный запах.

Кольцевая гниль

Возбудитель - бактерии *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus*. Поражаются растения и клубни. Развитие кольцевой гнили вначале протекает медленно, и симптомы болезни до цветения не проявляются. С момента начала цветения у больных растений отмечаются бурые пятна по краю листьев. При срезании стебля из сосудистого кольца выделяется кремообразная жидкость. На клубнях кольцевая гниль проявляется в виде поражения сосудистого кольца и ямчатой гнили.

Крапчатая (обыкновенная, мягкая) мозаика картофеля

Возбудитель - X-вирус картофеля. Проявляется в виде расплывчатых светло-зеленых пятен на листьях, которые трудно рассматриваются в солнечный день. Слабые признаки лучше заметны на молодых растениях до цветения, затем они ослабевают или исчезают. При поражении сильными штаммами на отдельных сортах отмечается образование некрозов на листьях и верхушках стеблей.

Морщинистая и полосчатая мозаики. Возбудитель - Y-вирус картофеля. Различают три основных штамма вируса Y^o, Yⁿ, Y^c. Наибольшее распространение имеет штамм Y^o. **Морщинистая мозаика:** листья приобретают мозаичную расцветку и морщинистую поверхность. При сильном поражении края листьев загибаются к низу. **Полосчатость** отмечается при образовании некрозов по жилкам с нижней стороны листа в виде штрихов, полос и пятен.

Скручивание листьев картофеля

Возбудитель - L-вирус картофеля (Вирус скручивания листьев картофеля - ВСЛК). В год заражения отмечаются посветление ботвы и скручивание верхних листьев; в потомстве выявляются хлороз и сильное скручивание долей нижних листьев вверх вокруг средней жилки. Верхние листья сухие и ломкие. Пораженные листья становятся кожистыми и сильно шуршат, нижняя часть их может стать почти серебристой.

Ведьмина метла картофеля

Возбудитель - фитопlasма. Куст становится низкорослым, с большим количеством измельченных тонких, округлого сечения светлоокрашенных побегов. Листья редуцируются и часто имеют простую листовую пластинку или с уменьшенным количеством долей. Клубни мелкие, многочисленные, прорастают нитевидными ростками.

Бронзовость листьев

Возникает при недостаточном поступлении калия в растения. Листья покрываются мелкими точками отмершей ткани, становятся морщинистыми и приобретают цвет окисленной бронзы, в дальнейшем отмечается краевой некроз.

Коричневая пятнистость стеблей и клубней

Причина возникновения - избыточное поступление в растение железа и алюминия. На стеблях, обычно в нижней его части, появляются коричневые пятна отмершей ткани. Растение отстает в росте. На разрезе пораженных клубней красновато-коричневого цвета пятна, не имеющие выхода к периферии.

Картофельная нематода (бледная и золотистая)

Globodera rostochiensis и *Globodera pallida*. На пораженных почвах вырастают малорослые, слабые растения с увядающими листьями. На сильно пораженных растениях часто наблюдаются пятна. На корнях при внимательном рассмотрении можно увидеть бледно окрашенные цисты, которые в период созревания становятся красно-бурыми.

Стеблевая нематода

Ditylenchus destructor. Видимые признаки в период вегетации отсутствуют. Может вызывать деформацию кустов, изогнутость стеблей. На клубнях свинцово-серые пятна, которые часто растрескиваются.

Галловая нематода

Meloidogyne marioni. Пораженные растения отстают в росте и увядают. На корневой системе образуются небольшие утолщения - галлы диаметром 0,5-1,5 мм, которые увеличиваются в размерах, сливаются и вызывают деформацию корней. На клубнях также возникают деформации.

Генетическая инженерия картофеля

В сочетании с **современными технологиями возделывания** различные виды пестицидов способны значительно сократить потери от болезней, сорняков и вредителей

В настоящее время к арсеналу уже известных методов борьбы добавляются и новые **биотехнологические методы**, основанные на достижениях клеточной биологии и генной инженерии.

Применительно к картофелю, который размножают вегетативно, и где обычная селекция подразумевает скрещивание между двумя гетерозиготными тетраплоидными формами, **применение трансгенных технологий особенно актуально**

Картофель, наряду с другим известным представителем семейства Solanaceae *Nicotiana tabacum* был одним из первых растений, подвергшихся генетической трансформации с применением почвенных бактерий *Agrobacterium tumefaciens* и *A. rhizogenes*

Трансгенные растения картофеля удавалось регенерировать из различных типов эксплантов: из молодых клубней, листовых дисков, микроклубней или сегментов стеблей.

Но **спектр генотипов** (сортов), на которых велись эти работы, был **ограничен** несколькими относительно легко трансформируемыми сортами.

Основные факторы, влияющие на эффективность генетической модификации растений

Трансформация	Регенерация	Экспрессия
Генотип растения		
Штамм бактерии (вирулентность и др.) Тип плазмидного вектора Способ кокультивирования	Тип экспланта Возраст и физиологический статус донорного растения Состав питательной среды Способ регенерации (через каллус, прямой органогенез) Условия селекции Физиологические условия Адаптация при переносе в грунт из культуры <i>in vitro</i>	Появление псевдотрансформантов Копийность введенного гена Проблема «замолкания» генов «Химерность» растения Получение фертильного потомства со стабильной экспрессии трансгена

Основным фактором, определяющим эффективность получения трансгенных растений, является **восприимчивость эксплантов конкретного сорта к трансформации и способность к последующей регенерации.**

Подавляющее большинство коммерческих сортов картофеля, включая и основные российские сорта, **не относится к легко трансформируемым.**

Картофель - вегетативно размножаемая культура, а коммерческие сорта являются аутотетраплоидами, что значительно **затрудняет возвратное скрещивание** введенного признака в интересующий исследователя геном

При селекции картофеля в полевых условиях необходимо провести оценку 50-100 тысяч сеянцев, то *in vitro* можно протестировать **20 млн. протопластов** из **9 г листьев**

Защитные реакции (фитоалексины, PR-белки, лигнификация) индуцируются рядом веществ биотической и абиотической природы – **элиситорами**.
Абиотические элиситоры – ионы ртути, полиакриловая и салициловая кислоты
Биотические элиситоры – компоненты клеточных стенок грибов, вещества в культуральных фильтратах

В качестве **селективного агента** используют патотоксины, культуральные

Таблица 4.2

**Применение методов клеточной селекции in vitro
в получении растений, устойчивых к болезням**

Культура	Болезни	Селективный фактор	Примечание
<i>Triticum aestivum</i>	<i>Fusarium graminearum</i>	фузариевая кислота	устойчивые каллусные линии
<i>Hordeum vulgare</i>	<i>Fusarium</i>	фузариевая кислота	устойчивые регенеранты
<i>Triticum durum</i>	<i>Helminthosporium sativum</i>	токсин	устойчивые регенеранты
<i>Hordeum vulgare</i>	<i>Helminthosporium sativum</i>	токсин	устойчивые регенеранты
<i>Alpium graveolens</i>	<i>Septoria apicola</i>	совместное культивирование каллусной ткани и патогена, КФ	устойчивые регенеранты
<i>Licopersicon esculentum</i>	<i>Fusarium</i>	фузариевая кислота	устойчивые каллусные линии
<i>Peach</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>	КФ	устойчивые регенеранты
<i>Triticum aestivum, durum</i>	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	КФ	устойчивые регенеранты
<i>Medicago sativa</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	КФ, фузариевая кислота	устойчивые регенеранты
<i>Nicotiana</i>	<i>Pseudomonas, Alternaria</i>	токсин	устойчивые регенеранты
<i>Brassica napus</i>	<i>Phoma lingam</i>	токсин	
<i>Solanum tuberosum</i>	<i>Fusarium</i>	КФ	устойчивые регенеранты

Использование патогенов в клеточной селекции

Непосредственное культивирование **в присутствии патогена**, если мало известно о патогенном начале или патоген не продуцирует токсины

Необходимо учитывать:

- стадию спороношения
- световой и температурный режимы
- относительную влажность
- pH
- наличие или отсутствие питательных веществ (для прорастания спор)

Инфицирование **некротрофами** требует высокого уровня инокулюма, хорошо растут в культуре

Инфицирование **биотрофами** вызывается отдельными спорами и клетками, плохо растут в культуре

Некоторые грибы **растут очень быстро**, что не позволяет идентифицировать устойчивые клетки

С середины 60-х гг.

Изучение **корреляции устойчивости** *in vitro* и *in vivo*

Совместная культивация каллусных клеток с инокулюмом патогена

Люцерна – *Phytophthora megasperma*

Табак – *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*

Береза – *Peronospora barinosa* f. sp. *beta*

Ткань сильно инфицировалась мицелием и спорами – ингибирование ростовых и морфо-генетических процессов

Использование патотоксинов в клеточной селекции

Большинство штаммов грибов производит **микотоксины** и поражает широкий круг растений

Применение **патотоксинов** удобнее, проще, эффективнее:

- ускоряется процесс отбора благодаря быстрой реакции
- обеспечиваются стандартные условия заражения
- меньшая зависимость от окружающей среды
- контролируется стабильность условий проведения экспериментов

Патотоксины:

1 категория – токсины, не являющиеся определяющими в заболевании, но обладающие неспецифическим токсическим действием по отношению к хозяину и токсичные для широкого круга растений (*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* – бактериальная рябуха табака)

2 категория – токсины, обладающие такой же специфичностью по отношению к растениям, что и патоген, но не ответственные за развитие болезни (Т-токсин *Drechslera maydis* расы Т – гельминтоспориоз кукурузы)

3 категория – токсины, хозяиноспецифичные, вызывающие типичные признаки болезни (10-викторин-токсин *Drechslera victoriae* – гельминтопориоз овса)

Выбор схемы селекции зависит от механизма действия:

Одни патогены поражают клетки, затем выделяют токсины

Други

Таблица 4.3

Токсические и биологически активные вещества, продуцируемые патогенами растений (Сидоров, 1990)

Токсическое вещество	Продуцент	Поражаемые растения
Абсцизовая кислота	<i>Cercospora rosicola</i>	роза
Алтенин	<i>Alternaria kikuchiana</i>	японская груша
Альтернариевая кислота	<i>Alternaria solani</i>	картофель
Цитохалодины	<i>Phoma, Phomopsis</i>	различные растения
Фенилуксусная кислота	<i>Rhizoctonia solani</i>	различные растения
Нофтазорины	<i>Fusarium spp.</i>	различные растения
Тенуазониевая кислота	<i>Alternaria spp.</i>	различные растения
Фузариевая кислота	<i>Fusarium oxysporum</i>	томаты

Получены устойчивые формы гвоздики, томатов, люцерны, клевера к фузариозу путем культивирования изолированных клеток, тканей и органов на **средах с фитотоксичными веществами** рода *Fusarium*.

Таблица 4.4

Примеры клеточной селекции
на устойчивость к патотоксинам

Патоген	Хозяин	Устойчивый материал
<i>Leptosphaeria maculans</i>	<i>Brassica napus</i>	Клеточные линии, регенеранты, потомство
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Tabaci</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	Клеточные линии, регенеранты, потомство
<i>Alternaria alternata</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	Клеточные линии, регенеранты, потомство
<i>Alternaria solani</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Клеточные линии
<i>Drechslera sativum</i>	<i>Triticum aestivum</i>	Клеточные линии
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Phaseolica</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Клеточные линии, регенеранты
<i>Helminthosporium sacchari</i>	<i>Saccharum officinarum</i>	Клеточные линии, регенеранты, потомство
<i>Fusarium coeruleum</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Клеточные линии, регенеранты
<i>Helminthosporium maydis</i>	<i>Zea mays</i>	Клеточные линии

Для ряда культур отбор с использованием селективного фактора **фузариевой кислоты** (5-н-бутил-2-пиридин-карбоновая кислота), продуцируемого различными фузариумами.

Японские ученые на томатах: **70 мкМ** достаточно, чтобы убить практически все клетки. После культивации на содержащих и не содержащих токсин средах терялась способность к пролиферации.

Немецкие ученые на ячмене: при **0,8 мМ** гибло около 80 % каллусов. После культивирования были получены зеленые растения и альбиноссы.

ВНИИ льна – лен-долгунец –
изолированные пыльники и
каллусная ткань – **высокая
комплексная устойчивость к
фузариозу и ржавчине**, также
превосходство по семенной
продуктивности, массе волокна и
технической части стебля

Картофель – **кольцевая гниль**

Corinebacterium sepedonicum

Грубо очищенный токсин

Были отобраны стабильно

устойчивые клоны и получены

растения

Были обнаружены **соматклоны**,

устойчивые к токсину и патогену

Использование культурального фильтрата патогена в клеточной селекции

Следует учитывать:

- способ получения КФ
- агрессивность штаммов
- питательная среда
- сохранение инфекционных свойств в культуре

1980 г. – Бенке – КФ *Phytophthora infestans* – картофель

Способы отбора клеток на селективных средах:

- быстрый (разовый) отбор
- прямой ступенчатый
- многоступенчатый
- прерывистый

Фузариоз на томатах

ступенчатый отбор – $2n=48$, $2n=64$,

прямой отбор – $2n=32$

Клевер, люцерна (10 % КФ), картофель (40 % КФ)

ВНИИ льна – гипокотильные сегменты и каллусная
ткань – 2,5-5 %-ный КФ

Тополь – септориоз – изолированные листья –
регенерации не было

На 9 сортах **пшеницы** сравнивали КФ и токсин
«миланин»: КФ имеет большее токсическое действие

Сельдерей – септориоз – каллусные и суспензионные культуры из молодых черешков

Важно изучение корреляции устойчивости к патогену у растений и культивируемых клеток

Гвоздика – фузариум – прямая корреляция

Клевер луговой – рак – у растений устойчивость от 1 до 70 %

Томат Талалихин-186 – альтернариоз – КФ получали при кокультивации с каллусной тканью – больше экзометаболитов

РГАУ-МСХА:

Пшеница – септориоз, морковь – альтернариоз, картофель – ризоктониоз, подсолнечник – фомопсис

Таблица 4.5

Клеточная селекция на устойчивость растений к КФ патогенов

Патоген	Хозяин	Полученные результаты
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	клеточные линии, регенеранты, потомство
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	клеточные линии, регенеранты, потомство
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Medicago sativa</i>	клеточные линии, регенеранты, потомство
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	<i>Hordeum vulgare</i>	клеточные линии, регенеранты, потомство
<i>Alternaria solani</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	клеточные линии, регенеранты, потомство
<i>Fusarium</i>	<i>Medicago sativa</i>	клеточные линии, регенеранты, потомство
корневые гнили	<i>Hordeum vulgare</i>	регенеранты
корневые гнили	<i>Triticum aestivum</i>	клеточные линии
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Trifolium pratense</i>	клеточные линии
<i>Sclerotinia trifolium</i>	<i>Trifolium pratense</i>	клеточные линии, регенеранты, потомство
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Linum usitatissimum</i>	регенеранты

Участие фитогормонов в клеточной селекции

Под действием факторов биотической природы происходит быстрый синтез и интенсивное накопление **стрессовых фитогормонов**: абсцизовая кислота, этилен, жасмоновая кислота, салициловая кислота, брассиностероиды, системин
Они вызывают синтез защитных соединений:
местная/локальная и системная устойчивость

РГАУ-МСХА: существенные **различия по содержанию фитогормонов** в клетках суспензионной культуры моркови в стандартных и стрессовых условиях (*Alternaria radicina*)

Таблица 4.6

Содержание гормонов (мкг/г сух. масса) в суспензионной культуре моркови, культивируемой на среде с содержанием селективного фактора, I пассаж

Генотип	Конц. КФ, %	ФИТОГОРМОНЫ			
		ИУК	ЦК	АБК	ГК
Линия 906	Контроль	0,0846	261,65	-	0,3995
	20	0,1083	287,91	-	0,4733
	40	0,029	6,51	-	1,7905
Сорт Rondo	Контроль	0,0397	13,75	-	2,6311
	20	0,0528	346,98	-	2,9412
	40	0,0130	7,48	-	3,1268

Синтез эндогенной **ГК** увеличивается с увеличением концентрации КФ, **ИУК** и **цитокининов** – снижается (более крупные и вытянутые клетки)

Процесс **адаптации к стрессу** – увеличение синтеза **ауксинов** и **цитокининов**

Таблица 4.7

Содержание гормонов (мкг/г сух. масса) в суспензионной культуре моркови линии 906 при культивировании ее в стандартных и стрессовых условиях на разных пассажах

№ пассажа	Вариант	ФИТОГОРМОНЫ			
		ИУК	ЦК	АБК	ГК
I	Контроль	0,0846	261,65	-	0,3995
	КФ 40%	0,029	6,51	-	1,7905
IV	Контроль	0,0138	128,33	-	0,2701
	КФ 40%	0,102	90,69	-	0,8397
VIII	Контроль	0,0083	8,91	-	0,0952
	КФ 40%	0,126	92,05	-	0,8759

Таблица 4.8

Содержание гормонов (мкг/г сух. масса) в суспензионной культуре моркови сорта Rondo при культивировании ее в стандартных и стрессовых условиях на разных пассажах

№ пассажа	Вариант	ФИТОГОРМОНЫ			
		ИУК	ЦК	АБК	ГК
I	Контроль	0,0397	13,75	-	2,6311
	КФ 40%	0,013	7,48	-	3,1268
IV	Контроль	0,0154	6,84	-	0,5390
	КФ 40%	0,018	4,26	1,029	0,3251
VIII	Контроль	0,0106	4,92	-	0,7781
	КФ 40%	0,0209	16,24	0,72	2,1055

Полученные в результате селекции растения имели больше ауксинов, гиббереллинов и цитокининов

Таблица 4.9

Содержание гормонов (мкг/г сух. массы)
в растениях-регенерантах

Генотип	Вариант	ФИТОГОРМОНЫ			
		ИУК	ЦК	АБК	ГК
Линия 906	Контроль	0,1936	572,77	-	39,965
	В результате селекции	0,2306	2274,58	-	550,346
Сорт Rondo	Контроль	19,960	28,09	-	186,764
	В результате селекции	23,264	6027,39	-	439,258

В адаптации играют роль **АБК** и **цитокинины** (синтез стрессовых белков), в процессах репарации – и **ИУК**
Модификационные изменения в виде **изменения гормонального баланса** культуры клеток

Устойчивость против проникновения фитопатогенов

Накопление и отложение **лигнина** в местах внедрения патогена.

Лигнифицированные ткани устойчивы к ферментативному разрушению, препятствуют диффузии токсинов, создают физический барьер.

Цитокинины способны **усиливать лигнификацию** клеточных стенок.

Цитокинины повышают активность растительной хитиназы, играющей важную роль в защите растений от фитопатогенных грибов.

Изменение гормонального статуса растения будет определять дальнейший ход патогенеза. Например, проростки пшеницы – **стабилизация баланса ИУК/АБК, увеличение ЦК** – накопление лигнина,

Таблица 4.10

Содержание фитогормонов (мкг/г сухой массы) в суспензионной культуре различных генотипов картофеля, культивируемой в стандартных условиях

Сорт	№ пассажа	ФИТОГОРМОНЫ			
		ИУК	ЦК	ГК	АБК
Удача	I	1,05	5,48	1,98	0,36
	IV	0,56	8,73	1,00	0,54
	VIII	0,14	0,90	1,05	0,35
Дезире	I	0,48	1,18	0,33	0,34
	IV	0,42	1,13	1,93	0,31
	VIII	0,40	0,99	2,64	0,31
Невский	I	0,22	2,41	2,10	1,78
	IV	0,72	6,03	13,64	1,69
	VIII	0,58	1,36	14,74	1,02
Жуковский ранний	I	0,61	5,23	1,77	1,59
	IV	0,43	4,40	1,28	1,70
	VIII	0,37	4,31	1,04	1,84

Соотношение ИУК/АБК – величина постоянная у более устойчивых сортов (Дезире, Жуковский ранний)

**Содержание фитогормонов (мкг/г сухой массы)
в суспензионной культуре различных генотипов картофеля,
культивируемой в стрессовых условиях (30% КФ патогена)**

Сорт	№ пассажа	ФИТОГОРМОНЫ			
		ИУК	ЦК	ГК	АБК
Удача	I	0,76	6,25	1,45	1,67
	IV	0,21	1,51	2,93	2,26
	VIII	-	-	-	-
Дезире	I	3,88	1,17	0,86	1,46
	IV	3,43	1,53	0,41	1,29
	VIII	4,76	1,72	0,35	1,76
Невский	I	0,50	11,15	1,34	1,39
	IV	0,28	6,63	1,65	1,87
	VIII	0,52	4,94	1,91	2,59
Жуковский ранний	I	0,65	10,64	0,55	1,48
	IV	0,68	17,43	0,13	1,61
	VIII	0,70	18,11	0,183	1,85

Примечание: - культура погибла.

**Утолщение клеточных стенок – подавление роста
клеток растяжением
Более низкий синтез ГК у более устойчивых**

**В
стандартных
условиях
уменьшение
цитокинино
в, при
стрессе –
увеличение,
особенно у
более
устойчивых
сортов**

Участие фенольных соединений

Механизм защиты и адаптации

Поражение патогенами активизирует **синтез фенольных соединений**, в том числе специфических:

- производные фенилпропана
- полифенолы
- хлорогеновая кислота
- коричная кислота
- скополетин

Измененный фенольный метаболизм вызывает изменения химического состава клетки, что нарушает среду обитания патогена

**Изучается изменение
количественного и качественного
состава фенольных соединений**

РГАУ-МСХА + ИФР

Морковь – *Alternaria*

**Уменьшение синтеза фенольных
соединений** при первом пассаже,
дальше или растёт, или стабилен
У растений-регенерантов **уровень
выше в 1,5-2 раза, число
соединений увеличивается**