

УДК 577:632.4

ОСОБЛИВОСТІ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНА ЛІПІД-ТРАНСФЕРНОГО ПРОТЕЇНУ СОСНИ ЗВИЧАЙНОЇ ПРИ ІНФІКУВАННІ СІЯНЦІВ КОРЕНЕВОЮ ГУБКОЮ

© 2013 р. Н. І. Груник, В. А. Ковальова, Р. Т. Гут

Національний лісотехнічний університет України
(Львів, Україна)

Досліджено зміни експресії гена ліпідтрансферного протеїну у сіянцях сосни звичайної (*Pinus sylvestris* L.), інфікованих кореневою губкою, у процесі розвитку патологічного процесу. Високі показники експресії *PsLTP1* на ранніх етапах ураження сіянців сосни звичайної *Heterobasidion annosum* свідчать про залучення цього гена до первинних механізмів захисту проти цього патогена.

Ключові слова: *Pinus sylvestris*, *Heterobasidion annosum*, ліпід-трансферний протеїн, експресія

В останні десятиліття багато досліджень спрямовано на виявлення біологічно активних сполук нового покоління, які можуть бути застосовані у захисті рослин від фітозахворювань. Основними вимогами до цих речовин є: екологічна безпека і мінімальна чутливість самої рослини до них. У рослин виявлено широкий спектр сполук із антимікробними властивостями. Зокрема, із різних органів численних видів рослин очищено протеїни із вираженою антимікробною активністю, які належать до родин ліпід-трансферних протеїнів, пуротіонінів, дефензінів та ін. (Terras et al., 1995; Benko-Iserpon et al., 2010; Brave et al., 2011). Серед цих протеїнів особливу увагу привертає ліпід-трансферний протеїн (ЛТР), який спочатку використовували лише у харчовій промисловості, проте згодом виявили, що цей протеїн має антимікробні властивості (Molina et al., 1993; Kader, 1996; Kim et al., 2006).

Про участь цих пептидів у захисних реакціях свідчить посилення експресії генів *LTP* при інфікуванні, а також підвищення стійкості трансгенних рослин тютюну та арабідопсису, які експресували ген *LTP2* ячменю, до ураження бактеріями роду *Pseudomonas* (Fleming et al., 1992). Нещодавно нами було виявлено, що ендогенний ЛТП, виділений з сіянців сосни зви-

чайної, пригнічує ріст фітопатогенного гриба *Fusarium solani* (Kovaleva et al., 2009). Нуклеотидну послідовність *PsLTP1* (*Pinus sylvestris* lipid transfer protein), яка кодує ліпід-трансферний протеїн сосни звичайної, ми клонували і зареєстрували у GenBank (Acc. No. JN980402.1), а також дослідили характер експресії *PsLTP1* у різних органах сосни за нормальних умов та під впливом фітогормонів. У даній роботі ми поставили за мету з'ясувати особливості експресії цього гена у сіянцях сосни звичайної за умов експериментального інфікування їх кореневою губкою.

Базидіоміцет *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. *sensu lato* – збудник кореневої та комлевої гнилі, один із найбільш економічно важливих лісових патогенів у помірних регіонах північної півкулі, здатний уражати хвойні будь-якого віку (Asiegbu et al., 1994; Li et al., 2004; Asiegbu et al., 2005; Adomas et al., 2007; Adomas et al., 2008). Інфекційний процес у системі сіянці *Pinus sylvestris* – *Heterobasidion annosum* детально описаний: розвиток інфекційних структур (зародкової трубки та апресорій) відбувається протягом перших 24 год після інокуляції, наступний етап супроводжується прямим проникненням і внутрішньою колонізацією кортикальних тканин грибом, який досягає ендодермальної ділянки протягом 3-7 днів після інокуляції; колонізація та руйнування васкулярної ділянки відбувається протягом 9-15 днів (Asiegbu et al., 2005). Раніше було виявлено, що імунна відповідь суберинізованих та несубери-

Адреса для кореспонденції: Груник Наталія Ігорівна, Національний лісотехнічний університет України, вул. Ген. Чупринки, 103, м. Львів, 79057, Україна;
e-mail: hrnyukn@gmail.com

ОСОБЛИВОСТІ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНА

нізованих коренів на контакт із патогеном є однаковою (Asiegbu et al., 1994). Отже, система сіянці *P. sylvestris* – *H. annosum* є хорошою моделлю для дослідження диференційної експресії генів у процесі розвитку інфекційного процесу (Adomas et al., 2007; 2008).

МЕТОДИКА

Рослинний матеріал. У дослідах використано насіння *Pinus sylvestris* L., люб'язно надане Львівською зональною лісонасінневою станцією. У чашках Петрі пророщували по 50 насінин на фільтрувальному папері, попередньо змоченому дистильованою водою, за температури 26°C. Семидобові сіянці асептично переносили в чашку Петрі із картопляним агаром, на якому культивували міцелій кореневої губки. Сіянці відбирали через 2, 6 та 24 год після інокуляції міцелієм, швидко заморожували їх у рідкому азоті та зберігали за температури -80°C до їхнього використання. Як контроль використовували семиденні сіянці, культивовані на картопляному агарі без кореневої губки, зразки відбирали через 2, 6 та 24 год після перенесення на агар та зберігали при -80°C.

Напівкількісна зворотної транскрипції полімеразна ланцюгова реакція (ЗТ-ПЛР). Сумарну РНК із рослинного матеріалу виділяли модифікованим методом літєво-хлоридної преципітації (Chang et al., 1993). Для синтезу кДНК використовували однакові кількості сумарної РНК (5 мкг) з оліго (dT)18 праймером (5 мкМ) та зворотною транскриптазою RevertAid™ Premium (Fermentas, Литва). Реакцію проводили згідно з протоколом виробника зворотної транскриптази. ПЛР зі специфічними праймерами проводили в 25 мкл реакційної суміші, яка містила кДНК, синтезовану на 50 нг сумарної РНК, 2 U Taq полімерази (Fermentas, Литва), ПЛР-буфер від виробника, 0,2 мМ дНТФ та 0,5 мкМ специфічних праймерів. Для виявлення транскриптів гена *PsLTP1* використовували праймери: прямий – 5'-ATGGCTGTGAAGAAGATG-3' і зворотний – 5'-TCAGTGAACCTTGGAACAG-3'. Як контроль за перебігом ПЛР та визначення відносного рівня експресії гена *PsLTP1* використовували ген «домашнього господарства» – 60S рибосомальний протеїн L44 (*RPL44*; GenBank Acc. No. E1342388). Для ампліфікації цього гена використали такі олігонуклеотиди: прямий – 5'-CAAAGCTTGCAAAAAGCACA-3' та зворотний – 5'-TTCCCTTCCCCTTCTTGTC-3'. У кожній реакції ампліфікації одночасно використовували дві пари праймерів: до гена «домаш-

нього господарства» і *PsLTP1*. Очікувана довжина продуктів ампліфікації для *PsLTP1* – 372 п.н., для *RPL44* – 263 п.н. Умови ПЛР: денатурація при 95°C протягом 5 хв з подальшими 35 циклами ампліфікації (95°C – 1 хв; 54°C – 1 хв; 72°C – 1 хв) і елонгація при 72°C протягом 5 хв. Розділення продуктів ПЛР проводили у 1,5% агарозному гелі в Тріс-боратній буферній системі (50 мМ Тріс-Н₃ВО₃, рН 8,3; 2 мМ ЕДТА), зафарбовували бромистим етидієм (0,5 мкг/мл), візуалізували в УФ-світлі та фотографували.

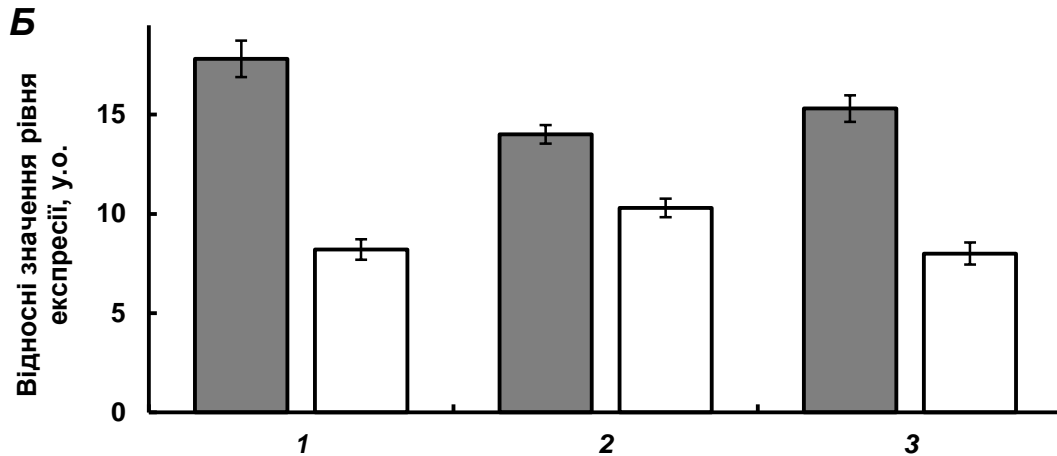
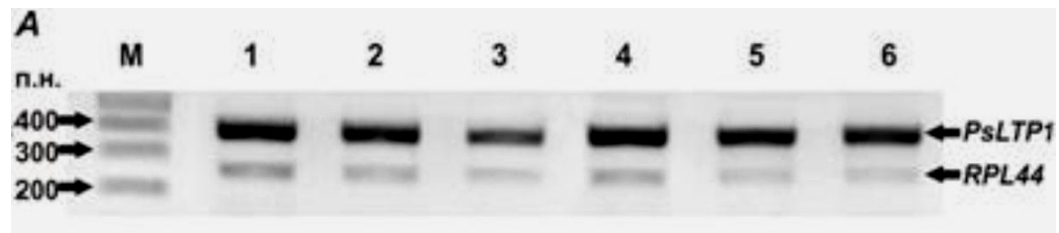
Статистична обробка результатів. Денситометричний аналіз електрофореграм проводили за допомогою програми GelProAnalyzer 4.0 («MediaCybernetics», США). Значення рівня експресії гена *PsLTP1* нормалізували щодо рівня експресії гена *RPL44*. Експерименти проводили в триразовому повторенні. Для статистичного оброблення результатів використовували двосторонній критерій Стьюдента. Статистично достовірною вважали різницю при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Ураження сіянців сосни звичайної міцелієм кореневої губки призводило до збільшення в них кількості транскриптів *PsLTP1* у 2,2 раза порівняно з контролем уже через дві години контакту із грибом (рисунк).

Через 6 год після інокуляції відбувалося зниження рівня експресії гена ліпідтрансферного протеїну на 30%, а через добу після ураження рівень експресії *PsLTP1* знову зростав. Варто зазначити, що протягом усього періоду спостереження кількість транскриптів *PsLTP1* в інфікованих сіянцях була вищою від такого у контрольних.

Індукція експресії *PsLTP1* на початкових етапах ураження кореневою губкою можливо пов'язана з швидкою первинною реакцією організму хазяїна на ураження патогеном. Відомо, що вже через кілька хвилин після розпізнавання еліситорних молекул патогена ініціюється серія реакцій вторинної відповіді, яка включає зміцнення механічного бар'єру через процеси лігніфікації та суберинізації клітинних стінок, синтез рослинних антибіотиків (фітоалексинів), літичних ензимів та факторів захисту, так званих патоген-індукованих (PR) захисних протеїнів (Hietala et al., 2004; Okubara et al., 2005; Salvaudon et al., 2005; Van Loon et al., 2006). Механізми інгібування росту патогена ліпідтрансферними протеїнами ще не встановлені. I. Kader (1996) припустив, що оскільки для LTP



Аналіз експресії *PsLTP1* у проростках сосни звичайної.

A – електрофорез продуктів ЗТ-ПЛР, отриманих із РНК сіянців: 1, 3, 5 – через 2, 6 та 24 год культивування з кореневою губкою; 2, 4, 6 – відповідно контрольні зразки після 2-х, 6-ти і 24 год від початку експерименту. М – маркери GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas, Литва). Стрілкам справа вказано продукти ПЛР: *PsLTP1* і ген „домашнього господарства” *RPL44*. *Б* – значення рівня експресії *PsLTP1* перераховано відносно *RPL44*. Темні стовпчики: 1, 2, 3 – значення рівня експресії *PsLTP1* у проростках сосни звичайної після 2-х, 6-ти і 24-х год контакту з кореневою губкою; світлі стовпчики – 1, 2, 3 – значення рівня експресії *PsLTP1* у контрольних проростках сосни після 2-х, 6-ти і 24 год від початку експерименту.

характерне високе значення ізоелектричної точки, то можливо вони здатні пермеабілізувати мембрани, тобто діяти безпосередньо на патогенний мікроорганізм. Але захисна функція цих протеїнів може здійснюватися і опосередковано через їхнє залучення до біосинтезу кутину і зміцнення захисних механічних бар’єрів.

Високі показники експресії *PsLTP1* на ранніх етапах ураження сіянців сосни звичайної кореневою губкою свідчать про залучення цього гена до первинних механізмів захисту сосни звичайної проти цього патогена.

ЛІТЕРАТУРА

Adomas A., Heller G., Olson G., Chu T-M., Osborn J., Craig D., van Zyl L., Wolfinger R., Sederoff R., Dean R.A., Stenlid J., Finlay R., Asiogbu F.O. Transcript profiling of conifer pathosystem: response of *Pinus sylvestris* root tissues to pathogen (*Heterobasidion annosum*) invasion // *Tree Physiol.* – 2007. – V. 27. – P.1441-1458.

Adomas A., Heller G., Li G., Olson G., Osborn J., Karlsson M., Nahalkova J., van Zyl L., Sederoff R.,

Stenlid J., Finlay R., Asiogbu F.O. Comparative analysis of transcript abundance in *Pinus sylvestris* after challenge with a saprotrophic, pathogenic or mutualistic fungus // *Tree Physiol.* – 2008. – V. 28. – P. 885-897.

Asiogbu F.O., Adomas A., Stenlid J. Conifer root and butt rot caused by *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. s.l. // *Mol. Plant Pathol.* – 2005. – V. 6. – P. 395-409.

Asiogbu F.O., Daniel G., Johansson M. Defense related reactions of seedling roots of Norway spruce to infection by *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. // *Physiol. Mol. Plant Pathol.* – 1994. – V. 45. – P. 1-19.

Benko-Iseppon A.M., Galdino S.L., Calsa Jr. T., Akio Kido E., Tossi A., Belarmino L.C., Grovella S. Overview on plant antimicrobial peptides // *Curr. Protein Pept. Sci.* – 2010. – V. 11. – P. 181-188.

Brave M., Methuku D.R. Small cysteine-rich proteins from plants: a rich resource of antimicrobial agents // *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances* / Ed. Mendez-Vilas. – 2011. – P. 1074-1083.

ОСОБЛИВОСТІ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНА

- Chang S., Purayer J., Cairney J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees // *Plant Mol. Biol. Rep.* – 1993. – V. 11. – P. 113-116.
- Fleming A.J., Mandel T., Hofmann S., Sterk P., de Vries S.C., Kuhlemeier C. Expression pattern of a tobacco lipid transfer protein gene within the shoot apex // *Plant J.* – 1992. – V. 2. – P. 855-862.
- Hietala A.M., Kvaalen H., Schmidt A., Johnk N., Solheim H., Fossdal C.G. Temporal and spatial profiles of chitinase expression by Norway spruce in response to bark colonization by *Heterobasidion annosum* // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2004. – V. 70. – P. 3948-3953.
- Kader J-C. Lipid-transfer proteins in plants // *Plant Mol. Biol.* – 1996. – V. 47. – P.627-654.
- Kim T.H., Kim M.C., Park J.H., Han S.S., Kim B.R., Moon B.Y., Suh M.C., Cho S.H. Differential expression of rice lipid transfer protein gene (LTP) classes in response to abscisic acid, salt, salicylic acid, and the fungal pathogen *Magnaporthe grisea* // *J. Plant Biol.* – 2006. – Vol. 49. – P. 371-375.
- Kovaleva V., Kiyamova R., Cramer R., Krynytskyy H., Gout I., Gout R. Purification and molecular cloning of antimicrobial peptides from Scots pine seedlings // *Peptides.* – 2009. – V. 30, № 12. – P. 2136-2643.
- Li G., Asiegbu F.O. Use of Scots pine seedling roots as an experimental model to investigate gene expression during interaction with the conifer pathogen *Heterobasidion annosum* (P-type) // *J. Plant Res.* – 2004. – V. 117. – P.155-162.
- Molina A., A.Segura, Garcia-Olmedo F. Lipid transfer proteins (nsLTPs) from barley and maize leaves are potent inhibitors of bacterial and fungal plant pathogens // *FEBS Lett.* – 1993. – V. 316. – P. 119-122.
- Okubara P.A., Paulitz T.C. Root defense responses to fungal pathogens: A molecular perspective // *Plant Soil.* – 2005. – V. 274. – P. 215-226.
- Salvaudon L., Heraldet V., Shykoff J.A. Parasite-host fitness trade-offs change with parasite identity: genotype-specific interactions in a plant-pathogen system // *Int. J. Org. Evol.* – 2005. – V. 59. – P. 2518-2524.
- Terras F.R., Eggermont K., Kovaleva V., Raikhel N.V., Osborn R.W., Kester A., Rees S.B., Torrekens S., Van Leuven F. Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense // *Plant Cell.* – 1995. – V. 7. – P. 573-588.
- Van Loon L.C., Rep M., Pieterse C.M.J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 2006. – V. 44. – P. 135-162.

Надійшла до редакції
30.09.2013 р.

FEATURES OF GENE EXPRESSION OF A LIPIDTRANSFER PROTEIN IN PINE SEEDLINGS DURING INFECTION BY ANNOSUM ROOT ROT

N. I. Hrunyk, V. A. Kovaleva, R. T. Gout

*Ukrainian National Forestry University
(Lviv, Ukraine)*

The changes in the gene expression of lipid-transfer protein in Scotch pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings, infected with the annosum root rot, during the pathological process, have been investigated. High indexes of *PsLTP1* expression at the early stages of infection of pine seedlings with the annosum rot suggest to involving of this gene in primary defence mechanisms of Scotch pine against this pathogen.

Key words: *Pinus sylvestris*, *Heterobasidion annosum*, lipid-transfer proteins, expression, Scots pine, annosum root rot

ОСОБЛИВОСТІ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНА

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА ЛИПИД-ТРАНСФЕРНОГО ПРОТЕИНА СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ СЕЯНЦЕВ КОРНЕВОЙ ГУБККОЙ

Н. И. Груник, В. А. Ковалева, Р. Т. Гут

*Национальный лесотехнический университет Украины
(Львов, Украина)*

Исследованы изменения экспрессии гена липид-трансферного протеина в сеянцах сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), инфицированных корневой губкой, в ходе развития патологического процесса. Высокие показатели экспрессии *PsLTP1* на ранних этапах инфицирования сеянцев сосны корневой губкой свидетельствуют о вовлечении этого гена в первичные механизмы защиты сосны обыкновенной против этого патогена.

Ключевые слова: *Pinus sylvestris*, *Heterobasidion annosum*, липид-трансферный протеин, экспрессия, сосна обыкновенная, корневая губка