

УДК 581.1:633/635; 633/635:58

<https://doi.org/10.47612/0134-9740-2020-28-51-56>

**Е. М. Кабачевская, Т. А. Гапеева, А. А. Смирнов,
А. Ю. Мисюкевич, С. В. Суховеева, И. Д. Волотовский**

ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси», г. Минск

E-mail: kabachevskaya@ibp.org.by

БАЗАЛЬНЫЙ УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ФЕРМЕНТОВ МЕТАБОЛИЗМА КОРИЧНОЙ КИСЛОТЫ В ЛИСТЬЯХ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ *IN VITRO* СОРТОВ БЕЛОРУССКОЙ СЕЛЕКЦИИ

РЕЗЮМЕ

Разработаны уникальные ген-специфические праймеры для оценки уровня экспрессии генов метаболизма коричной кислоты в клетках листьев картофеля. Проведена оценка базального уровня относительной экспрессии генов тирамин-гидроксикиназоил-трансферазы (ТНТ) и циннамат 4-гидроксилазы (С4Н). Обсуждается наличие корреляционных связей между уровнем экспрессии изученных генов и устойчивостью картофеля к таким заболеваниям, как фитофтороз, ризоктониоз, парша обыкновенная, черная ножка.

Ключевые слова: сорта картофеля, метаболизм коричной кислоты, фенилпропаноиды, экспрессия генов.

ВВЕДЕНИЕ

Отличительной особенностью любого растительного организма является образование, функционирование и накопление в его тканях вторичных метаболитов. В отличие от первичных, отсутствие вторичных метаболитов не обязательно приводит к быстрой гибели растения. Однако в долгосрочной перспективе нарушение нормального режима вторичного метаболизма приводит к снижению устойчивости растения к действию неблагоприятных факторов внешней среды, уменьшению их выживаемости и продуктивности.

Среди множества вторичных метаболитов, синтезируемых в растениях, важное место занимают коричная кислота (КК) и ее производные. Их образование характерно практически для всех видов растений, так как они выполняют ряд важных функций в растительной клетке. Среди таких функций можно назвать синтез лигнина, мощную антиоксидантную активность, а также антимикробную активность [1].

КК представляет собой жирно-ароматическую ненасыщенную карбоновую кислоту группы фенилпропаноидов, синтезируется в шикиматном цикле из аминокислоты фенилаланина с помощью фермента фенилаланинаммиаклиазы (ФАЛ), а также является предшественником других важных биологически активных молекул, таких как оксикоричные кислоты (их синтез обеспечивается скоординированной работой таких ферментов, как циннамат 4-гидроксилазы – С4Н и 4-кумарат-коэнзим А-лигазы – 4CL) и лигнин – важнейший структурный элемент клеточной стенки. Важные функции в жизнедеятельности растений могут также играть такие продукты метаболизма КК,

как амиды оксикоричных кислот. Несмотря на то, что в целом роль этих соединений далека от понимания, имеются сведения об их связи с развитием защитных реакций растений. Например, ферулоилтирамин, за синтез которого отвечает фермент тирамин-гидроксицинамоил-трансфераза (ТНТ), накапливается в участках клеточной стенки клеток, граничащих с участками проникновения инфекции в перидерму клубней картофеля. Предполагается также, что ферулоилтирамин придает растениям картофеля устойчивость к фитофторозу [2, 3]. В ответ на инфицирование *Phytophthora infestans* наблюдается индукция накопления в листьях картофеля и ряда других амидов коричной кислоты [2, 4].

КК и ее метаболизм – важный объект научных исследований, и в последние годы интерес к ним растет. Эти соединения представляются достаточно перспективными для сельского хозяйства регуляторами роста и развития растений, модуляторами устойчивости к фитопатогенным микроорганизмам. Актуальным является изучение сортоспецифических особенностей функционирования генов, кодирующих ферменты, катализирующие различные реакции метаболизма КК. Кроме того, интересным направлением использования КК является наличие синергизма в действии системы КК и антиинфекционных агентов, особенно фунгицидов, что позволяет уменьшить добавление фунгицида в почву [5]. Перспективным направлением является также разработка биомаркеров метаболитов КК с целью использования в селекции сортов картофеля с повышенным содержанием данных метаболитов, например, хлорогеновой кислоты, интересной тем, что обладает мощной антиоксидантной активностью и не разрушается при термической обработке.

В связи с вышесказанным целью данной работы было выявление особенности функционирования генов, ассоциированных с метаболизмом КК, в клетках растений различных сортов картофеля белорусской селекции, а также оценка наличия возможных корреляционных связей между устойчивостью сортов и уровнем относительной экспрессии изучаемых генов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

В качестве объектов исследования использовались растения картофеля *in vitro* сортов белорусской селекции, различающиеся по устойчивости к фитофторозу, которые выращивали в условиях лабораторных световых комнат при температуре 18–23 °C с 16/8-часовым фотопериодом (200 мкм м-2 с-1; лампы LF 35W/54-765, Philips, Польша) на агаризованных питательных средах.

Общую РНК выделяли из тканей листьев растений картофеля (100 мг на образец) с помощью TRI Reagent (Sigma, Германия) в соответствии с протоколом производителя. Образцы РНК (2 мкг) обрабатывали свободной от РНКаз ДНКазой (Thermo Fisher Scientific), а затем проводили обратную транскрипцию. Реакционная смесь для синтеза кДНК содержала 200 ед. обратной транскриптазы RevertAid™ M-MuLV, случайные (random) гексамерные праймеры (0,2 мкг), 0,1 мМ дНТФ, 20 ед. ингибитора рибонуклеаз RiboLock (Thermo Fisher Scientific) в общем объеме реакционной смеси 20 мкл.

Ген-специфические ПЦР-праймеры для генов метаболизма коричной кислоты были разработаны при помощи программного обеспечения Primer-BLAST (NCBI). ПЦР-праймеры были синтезированы фосфорамидитным методом с использованием ДНК-синтезатора MerMade-4 (Bioautomation, США).

ПЦР проводился на термоциклере CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США) с использованием набора Luna® Universal qPCR Master Mix производства Thermo Fisher Scientific Baltics («Ферментас», Литва). Реакционная смесь для ПЦР

содержала также специфические олигонуклеотидные праймеры (6–12 пмоль на реакцию), кДНК-матрицу в количестве, соответствующем 100 нг тотальной РНК. Программа для термоциклера была следующей: 95 °С – 5 мин; {94 °С – 30 с, 57–59 °С – 30 с, 72 °С – 30 с}40 циклов; 72 °С – 7 мин. Скорость изменения температуры – 1 °С/с.

Для подтверждения специфичности праймеров по отношению к кДНК изучаемых генов определяли нуклеотидные последовательности ПЦР-продуктов, полученных с использованием дизайнированных праймеров, методом автоматического секвенирования с использованием генетического анализатора флуоресцентно-меченых фрагментов ДНК, разделяемых методом капиллярного гель-электрофореза, ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, США).

Оценку экспрессии генов на транскрипционном уровне и статистический анализ результатов проводили с использованием пакета программ REST-MCS. В качестве гена-нормализатора использовали ген фактора элонгации картофеля *ef1α* (AB061263) и следующие праймеры: 5'-ATTGGAAACGGATATGCTCCA (EF1S), 5'-TCCTTACCTGAACGCCTGTCA (EF1A) [6].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для проведения ПЦР в режиме реального времени и оценки генной экспрессии на транскрипционном уровне генов метаболизма КК – ФАЛ, С4Н, 4CL, ТНТ были сконструированы ген-специфические праймеры, необходимые для оценки уровня экспрессии в сортах картофеля с различной устойчивостью к инфекционным заболеваниям. В результате конструирования праймеров с помощью алгоритма параметров пакета программ «Primer-BLAST» для опубликованных в базе данных NCBI последовательностей соответствующих генов было отобрано 8 пар праймеров (по 2 пары для каждого гена), которые были синтезированы и проанализированы на матрицах ДНК и кДНК на соответствие их ампликонов теоретически рассчитанным размерам, специфичность связывания с матрицами исследуемых генов путем секвенирования ампликонов, а также их эффективность в ПЦР. В результате для дальнейшей работы были отобраны пары праймеров, наиболее специфичные и эффективные (табл. 1). Основные, теоретически рассчитанные характеристики ампликонов, получаемых с помощью дизайнированных праймеров, представлены в таблице 2.

Далее с использованием отобранных пар праймеров был проведен ПЦР-анализ относительного уровня экспрессии генов ТНТ и С4Н в клетках листьев растений *in vitro* сортов картофеля белорусской селекции, различающихся по баллам устойчивости к действию различных фитопатогенов: Одиссей, Ветразь, Карсан, Гармония, Скарб (табл. 3).

Таблица 1 – Ген-специфические ДНК-праймеры, рассчитанные для генов метаболизма коричной кислоты растений картофеля

Название ДНК-праймера	Олигонуклеотидная последовательность ДНК-праймера	Название гена, к которому рассчитан ДНК-праймер
PALS1	AACSTATCTCGTGGCGCTTT	ФАЛ
PALA1	CACGTATTCCCTGTCCACGA	ФАЛ
C4HS1	ACCAAGAGCATGGACAGCAA	С4Н
C4HA1	CTAGTTCCGCGATACCCAC	С4Н
4CLS2	GATTAGCACGACCGCAAACC	4CL
4CLA2	AACTCCGCGAACTAAGGCA	4CL
THTS1	TCCGTCTCGCTACAAAATCTGA	ТНТ
THTA1	GACAGGCTTGAACCCCTTCGT	ТНТ

РАЗДЕЛ 2. ГЕНЕТИКА КАРТОФЕЛЯ

Таблица 2 – Характеристика ампликонов, образуемых праймерами для определения мРНК-транскриптов генов метаболизма коричной кислоты картофеля

№ регистрации в базе данных NCBI (нуклеотидная последовательность)	Фермент	Наименование пары праймеров	Праймер *	Локализация / (ДНК или мРНК), пн	Ожидаемый размер продукта, пн	
					ДНК	кДНК
КС631948.1 (мРНК)	Фенилаланин-аммоний-лиаза	PAL1	S	1645-1664	187	187
			A	1831-1812		
ХМ_006350825.1 (мРНК)	Циннамат-4-гидроксилаза	C4H1	S	936-55	–	169
			A	1104-1085		
ХМ_006366893.2 (мРНК)	4-кумарат-коэнзим А-лигаза	4CL2	S	443-462	–	198
			A	640-621		
КФ943630.1 (мРНК)	Тирамин-гидроксисин-намоил-трансфераза	THT1	S	104-125	–	233
			A	336-317		

* S – прямой, A – обратный праймер.

Таблица 3 – Баллы устойчивости сортов картофеля к действию фитопатогенных заболеваний [7]

Сорт	Ризоктониоз	Черная ножка	Фитофтороз листьев	Фитофтороз клубней
Скарб	8	8	5	5
Карсан	7	7	7	7
Ветразь	5	8	8	8
Одиссей	5	5	–	8
Гармония	7	5	7	5

Расчет уровня относительной экспрессии для исследованных генов в различных сортах картофеля и построение графиков проводили с помощью специализированной программы REST-MCS (Relative Expression Software Tool Multiple Condition Solver), в соответствии с требованиями которой уровень экспрессии изучаемых генов отображен в условных единицах, устанавливаемых данной программой, и представлен в логарифмической шкале [8, 9].

Результаты анализа показаны на рисунке. В качестве контроля, для которого в REST рассчитывался уровень относительной экспрессии генов в выбранной группе сортов, использовали значения уровня генной экспрессии для сорта Скарб (далее – контрольный сорт). Из рисунка видно, что проанализированные гены имеют значения базального уровня экспрессии ниже, чем у контрольного сорта. Далее, на основании полученных значений уровней экспрессии в исследованных сортах, с помощью пакета программ MS EXCEL рассчитывался коэффициент корреляции между ними и устойчивостью сортов в пределах выбранной группы к таким широко распространенным заболеваниям картофеля, как фитофтороз, ризоктониоз, черная ножка, парша обыкновенная (табл. 4). Из таблицы видно, что наиболее сильная положительная связь между более высоким уровнем относительной экспрессии *THT* и высокими баллами устойчивости сортов наблюдается для такого заболевания, как черная ножка (для ризоктониоза – средняя), а более высокие базальные уровни относительной экспрессии *C4H* характерны для сортов, более устойчивых к ризоктониозу. В случае устойчивости к фитофторозу (как листьев, так и клубней) оба гена проявляли тенденцию к обратной зависимости, а именно у более устойчивых к фитофторозу исследованных сортов наблюдались более низкие уровни относительной экспрессии данных генов.

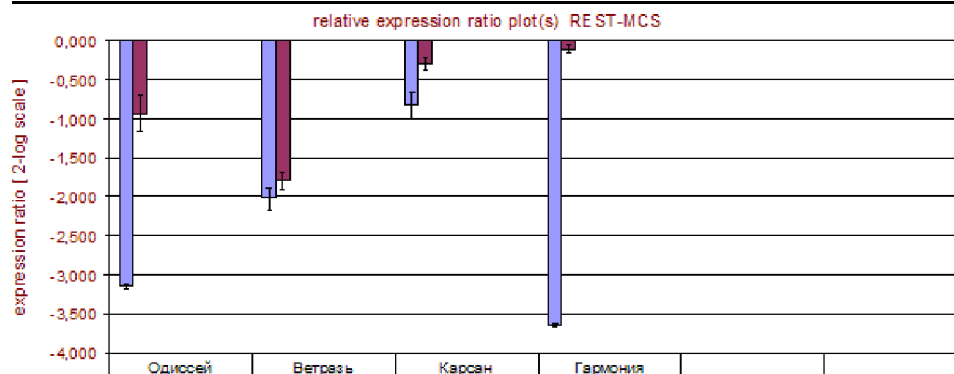


Рисунок – Сравнение относительного уровня экспрессии генов *THT* и *C4H* в клетках листьев растений картофеля сортов Одисей, Ветразь, Карсан, Гармония по отношению к уровню экспрессии этих генов в контрольном сорте Скарб в логарифмической шкале

Таблица 4 – Коэффициенты корреляции между относительным уровнем экспрессии *THT* и *C4H* в клетках листьев растений картофеля *in vitro* и устойчивостью к патогенным заболеваниям сортов Скарб, Одисей, Ветразь, Карсан, Гармония

Ген	Заболевание				
	фитофтороз листьев	фитофтороз клубней	черная ножка	парша обыкновенная	ризиктониоз
<i>THT</i>	–0,18201	–0,60705	0,830325	–0,38423	0,550246
<i>C4H</i>	–0,82934	–0,73803	–0,21078	–0,02703	0,893513

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения работы обнаружено, что в исследованной группе сортов имеется определенная связь между уровнями экспрессии *THT* и *C4H* и устойчивостью сортов картофеля к различным инфекционным заболеваниям. Между тем для составления более полного и четкого понимания роли изученных генов в формировании устойчивости картофеля к действию патогенов планируется в дальнейшем проведение новой серии экспериментов с целью использования большего числа сортов для более широкого сравнительного анализа базального уровня генной экспрессии, а также проведение экспериментов по заражению тканей картофеля возбудителями изучаемых болезней для того, чтобы оценить роль изучаемых генов на фоне развития болезней, а не только на базальном уровне.

Список литературы

1. Hydroxycinnamic acid functional ingredients and their biosynthetic genes in tubers of *Solanum tuberosum* Group Phureja / Ji Liyao [et al.] // Cogent Food & Agriculture. – 2016. – Vol. 2, Iss. 1. – P. 1–42.
2. Quantitative resistance in potato leaves to late blight associated with induced hydroxycinnamic acid amides / K. Jogendra [et al.] // Functional & integrative genomics. – 2014. – Vol. 14. – P. 285–298.
3. Transcription factor StWRKY1 regulates phenylpropanoid metabolites conferring late blight resistance in potato / K. Jogendra [et al.] // J. Exp. Bot. – 2015. – Vol. 66. – P. 7377–7389.
4. Identification of late blight resistance-related metabolites and genes in potato through nontargeted metabolomics / D. Pushpa [et al.] // Plant Mol. Biol. Report. – Vol. 32. – P. 584–595.

5. Relative potency of culture supernatants of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp. on growth of some fungal phytopathogens / S. Hazir [et al.] // Eur. J. Plant Pathol. – 2016. – Vol. 146. – P. 369–381.
6. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress / N. Nicot [et al.] / J. Exp. Bot. – 2005. – Vol. 56, № 421. – P. 2907–2914.
7. Сорта картофеля белорусской селекции. Каталог / В. Л. Маханько [и др.] ; Науч.-практ. центр НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству. – Минск, 2018. – 56 с.
8. Michael, W. New mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR / W. Michael, A. Pfaffl // Nucleic Acids Research. – 2001. – Vol. 29, № 9. – С. 45.
9. Pfaffl, M. W. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR / M. W. Pfaffl, G. W. Horgan, L. Dempfle // Nucleic Acids Res. – 2002. – Vol. 30, № 9. – С. 36.

Поступила в редакцию 26.11.2020 г.

E. M. KABACHEVSKAYA, T. A. GAPEEVA, A. A. SMIRNOV,
A. YU. MISYUKEVICH, S. V. SUHOVEEVA, I. D. VOLOTOVSKIY

BASAL LEVEL OF GENES EXPRESSION OF CINNAMIC ACID METABOLISM ENZYMES IN THE LEAVES OF IN VITRO PLANTS OF POTATOES VARIETIES OF BELARUSIAN BREEDING

SUMMARY

The unique gene-specific primers were developed to assess the level of gene expression of cinnamic acid metabolism in potato leaf cells. The basal level of the relative gene expression of tyramine hydroxycinnamoyl transferase (THT) and cinnamate 4-hydroxylase (C4H) was estimated. The presence of correlations between the level of expression of the research genes and potatoes resistance to diseases such as late blight, rhizoctonia, common scab, black leg is discussed.

Key words: potatoes varieties, cinnamic acid metabolism, phenylpropanoids, gene expression.