Устойчивость к фитопатогенам proSmAMP-1-трансгенных линий картофеля, полученных на основе сортов с различной восприимчивостью к возбудителям фитофтороза и альтернариоза

[1]Юрьева Н.О., [1]Беляев Д.В., [2]Деревягина М.К., [1]Терешонок Д.В., [2]Мелешин А.А., [3]Рогожин Е.А., [1]Соболькова Г.И., [2]Васильева С.В., [2]Шелухин П.Г.
[1] ИФР РАН; [2] ГНУ ВНИИКХ; [3] ИБХ РАН

Рядом исследователей было показано, что устойчивость многих распространенных сорных растений к фитопатогенам, в том числе фитопатогенным грибам, обусловлена экспрессией низкомолекулярных пептидов с антимикробной активностью. Особый интерес представляют гевеин-подобные пептиды, обнаруженные в распространенном в нашей зоне сорняке звездчатка средняя (Stellaria media), которая употребляется в пищу в Великобритании.

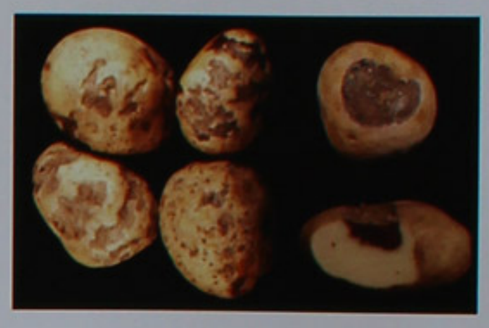
Нами были получены трансгенные растения картофеля (125 линий) с геном proSmAMP-1 из Stellaria media (Шукуров с соавт., 2011) на основе сортов Удача, Скороплодный и Красавчик со средней устойчивостью к возбудителю фитофтороза (Phytophthora infestans) 5.6, 4.8 и 5.3 балла, и очень высокой восприимчивостью к возбудителю альтернариоза (Alternaria solani) – индексы поражения (ИП) 48.5, 38.4 и 44,2, а также сорта картофеля Жуковский ранний с низкой устойчивостью к фитофторозу (2.5-4.3 балла) и восприимчивостью к альтернариозу (ИП 32.0).

Трансгенные линии с подтвержденной Нозерн-гибридизацией экспрессией целевого гена были высажены в теплице и оценены методом искусственного заражения отделенных листьев. Для всех сортов, большинство трансгенных линий показали в той или иной степени повышение устойчивостей к фитофторозу и альтернариозу, причем устойчивость к фитофторозу оценивалась по заражению как клубней, так и листьев. В листьях трех выделившихся по устойчивости к патогенам трансгенных линий сортов Скороплодный, Удача и Жуковский ранний было выявлено присутствие целевых пептидов или их предшественников. Полученные результаты свидетельствуют о возможности повышения устойчивости различных сортов картофеля к фитофторозу и альтернариозу путём трансформации геном антигрибных пептидов proSmAMP-1 из Stellaria media.

Степень устойчивости исходных форм картофеля к возбудителям фитофтороза и альтернариоза

сорт	Устойчивость к фитофторозу, балл (ВНИИ КХ)	Индекс поражения альтернариозом (ВНИИ КХ)
Скороплодный-7	**5,1 - 5,3**	**36 – 47**
Скороплодный-29	**3,3 - 4,8**	**22**
Жуковский ранний	**3,9 - 4,3**	**32**
Удача	**5,5**	**41**
Никулинский	**7,5 - 9,0**	**0,2 – 3,4**

Стандарты высокой и низкой восприимчивостей



Действие пептидов звездчатки на фитопатогены картофеля

Ген ProSmAMP1 звездчатки средней (на фото выше) кодирует пропептид-предшественник двух гевеин-подобных пептидов SmAMP1.1a и SmAMP1.2a, активных по отношению к фитофторе и альтернарии.

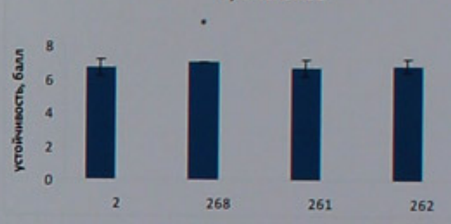
Несколько сортов картофеля были трансформированы конструкцией для экспрессии ProSmAMP1 (Shukurov et al, 2011), любезно предоставленной Бабаковым А. В. (ВНИИ СБ РАСХН).

Пептид	Показатель	*Alternaria alternata*	*Phytophthora infestans* ОСВ 12 сильно-агрессивный	*Phytophthora infestans* ПРИЛ 2 слабо-агрессивный
SmAMP1.1a	ICmin, μM	3,5	5,5	2,1
	IC_{50}, μM	8,6	11,0	6,5
	Морф. изменения	+	-	-
SmAMP1.2a	ICmin, μM	3,0	3,6	1,9
	IC_{50}, μM	7,1	9,0	5,0
	Морф. изменения	+	-	-

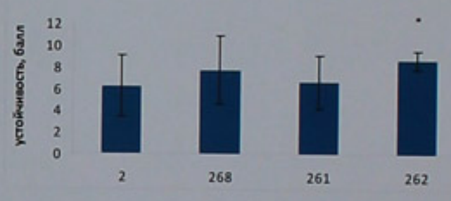
pBI121-SmAmp1

Экспрессия proSmAMP-1 в трансгенных растениях с.Юбилей Жукова, усл. ед.

Устойчивость к фитофторозу листьев растений с.Юбилей Жукова и его AMP-1 трансгенов



Устойчивость к фитофторозу клубней растений с.Юбилей Жукова и его AMP-1 трансгенов

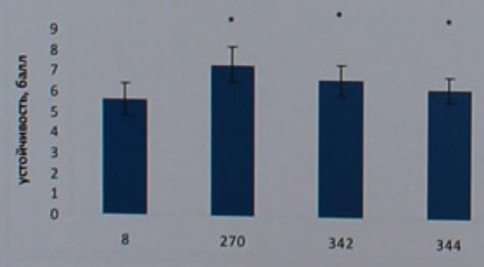


Индекс поражения альтернариозом растений с.Юбилей Жукова и его AMP-1 трансгенов

* различия с исходной формой достоверны при p<0,05
** различия с исходной формой достоверны при p<0,1

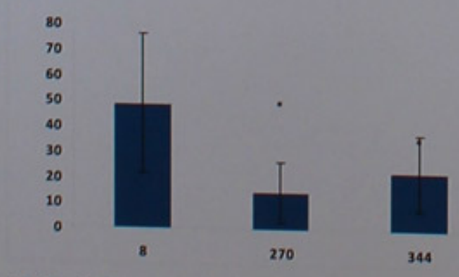
Экспрессия гена proSmAMP-1 в трансгенных растениях картофеля с.Удача, усл. ед.

Устойчивость к фитофторозу листьев растений с.Удача и его AMP-1 трансгенов



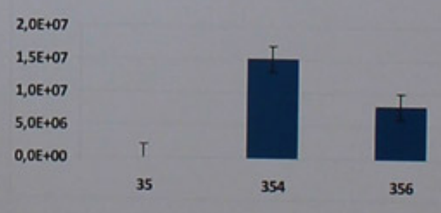
Устойчивость к фитофторозу клубней растений с.Удача и его AMP-1 трансгена

Индекс поражения альтернариозом растений с.Удача и его AMP-1 трансгенов

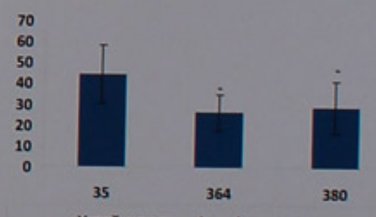


Экспрессию трансгена измеряли с помощью гибридизации РНК из трансгенных растений с ДНК гена ProSmAMP1, меченной 32P. Заражение фитофторой и оценку тепличных и асептических растений проводили в соответствии с методами, разработанными и модифицированными во ВНИИКХ (Шнейдер Ю.И., Яшина И.М., Ерохина С.А., Филина Н.И., Воловик А.С., Захарова-Кукушкина Л.Н., 1980; Юрьева Н.О., Кукушкина Л.Н., 1992). Устойчивость листьев картофеля к Alternaria solani рассчитывали по формуле: X=(а1 б1/в1 + а2 б2/в2 +….an бn/вn) x 1/n, где а1, а2,….an-диаметр поражения (мм); б1, б2,….бn – интенсивность спороношения (балл); в1, в2,….вn – длина инкубационного периода (сутки); n – количество заражений.

Экспрессия proSmAMP-1 гена в растениях с. Красавчик, усл. ед.

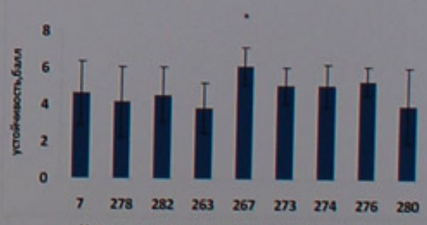


Индекс поражения альтернариозом растений с.Красавчик и его AMP-1 трансгенов

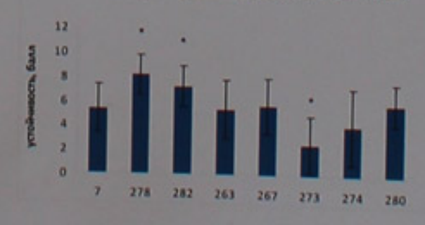


Экспрессия proSmAMP-1гена в избранных растениях с.Скороплодный, усл. ед.

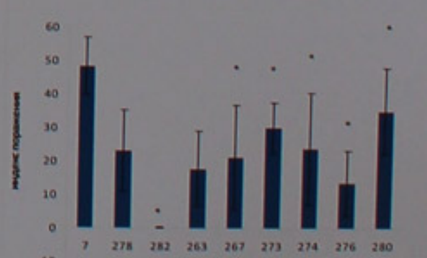
Устойчивость к фитофторозу листьев растений с.Скороплодный-7 и его AMP-1 трансгенов



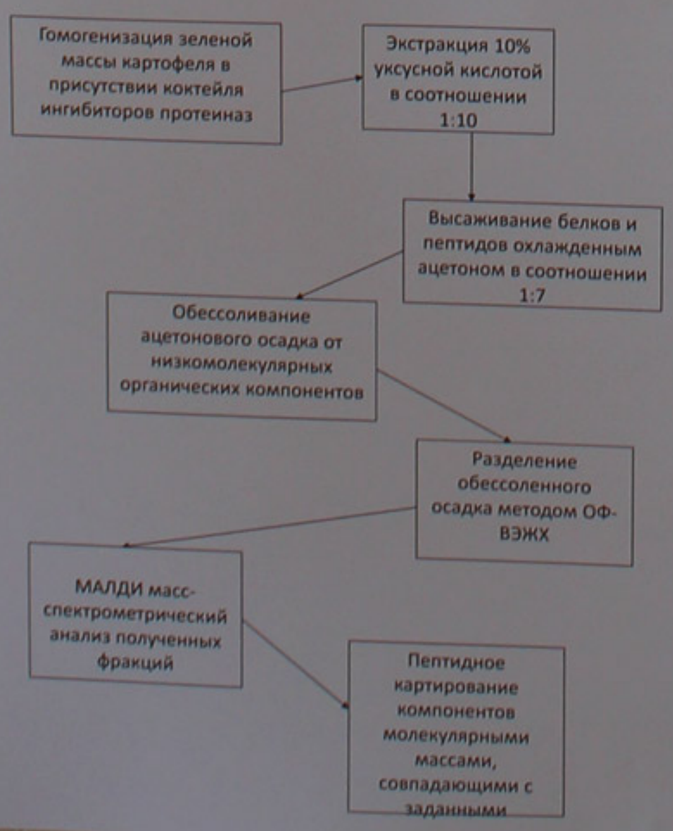
Устойчивость к фитофторозу клубней растений с.Скороплодный-7 и его AMP-1 трансгенов



Индекс поражения альтернариозом растений с.Скороплодный-7 и его AMP-1 трансгенов



Принципиальная схема выделения и идентификации пептидов SmAMP1.1a и SmAMP1.2a в трансгенных линиях картофеля. Работа была проведена на растениях, выращенных в полевых условиях (испытательном полигоне).




```
>Pea-YY-SmAMP
MVNMKSFALVMLFATLVGVTIASGPNGQCGPGWGGCRGGLCCSQYGYCGSGPKYCAHTTPLSEIEPTDAGRCSGRGTCSGGRCCSKYGYCGTGPAYCGLG
                       SGPNGQCGPGWGGCRGGLCCSQYGYCGSGPKYCAH          DAGRCSGRGTCSGGRCCSKYGYCGTGPAYCGLG

Варианты протеолиза:

1. SGPNGQCGPGWGGCRGGLCCSQYGYCGSGPKYCAH                                                    3462,8 Da
2. SGPNGQCGPGWGGCRGGLCCSQYGYCGSGPKYCAHTTPLSEIEPT                                         4545,0 Da
3. SGPNGQCGPGWGGCRGGLCCSQYGYCGSGPKYCAHTTPLSEIEP                                          4443,9 Da
4. SGPNGQCGPGWGGCRGGLCCSQYGYCGSGPKYCAHTTPLSEIE                                           4346,8 Da
5. SGPNGQCGPGWGGCRGGLCCSQYGYCGSGPKYCAHTTPLSEI                                            4217,7 Da
6. SGPNGQCGPGWGGCRGGLCCSQYGYCGSGPKYCAHTTPLSE                                             4104,5 Da[1,2]
7. SGPNGQCGPGWGGCRGGLCCSQYGYCGSGPKYCAHTTPLS                                              3975,4 Da
8. SGPNGQCGPGWGGCRGGLCCSQYGYCGSGPKYCAHTTPL                                               3888,3 Da[1,3]
9. SGPNGQCGPGWGGCRGGLCCSQYGYCGSGPKYCAHTTP                                                3775,2 Da
10. SGPNGQCGPGWGGCRGGLCCSQYGYCGSGPKYCAHTT                                                3678,0 Da
11. SGPNGQCGPGWGGCRGGLCCSQYGYCGSGPKYCAHT                                                 3576,9 Da
12. DAGRCSGRGTCSGGRCCSKYGYCGTGPAYCGLG                                                    3218,6 Da
13. TTPLSEIEPTDAGRCSGRGTCSGGRCCSKYGYCGTGPAYCGLG                                          4300,8 Da
14. TPLSEIEPTDAGRCSGRGTCSGGRCCSKYGYCGTGPAYCGLG                                           4186,7 Da[2]
15. PLSEIEPTDAGRCSGRGTCSGGRCCSKYGYCGTGPAYCGLG                                            4085,6 Da
16. LSEIEPTDAGRCSGRGTCSGGRCCSKYGYCGTGPAYCGLG                                             3988,4 Da[1,3]
17. SEIEPTDAGRCSGRGTCSGGRCCSKYGYCGTGPAYCGLG                                              3875,3 Da
18. EIEPTDAGRCSGRGTCSGGRCCSKYGYCGTGPAYCGLG                                               3788,2 Da
19. IEPTDAGRCSGRGTCSGGRCCSKYGYCGTGPAYCGLG                                                3659,2 Da
19. EPTDAGRCSGRGTCSGGRCCSKYGYCGTGPAYCGLG                                                 3545,9 Da
20. PTDAGRCSGRGTCSGGRCCSKYGYCGTGPAYCGLG                                                  3416,8 Da
21. TDAGRCSGRGTCSGGRCCSKYGYCGTGPAYCGLG                                                   3319,7 Da
22. SGPNGQCGPGWGGCRGGLCCSQYGYCGSGPKYCAHTTPLSEIEPTDAGRCSGRGTCSGGRCCSKYGYCGTGPAYCGLG      3745,6 Da[1,2]

1 обнаружено у 267 линии
2 обнаружено у 268 линии
3 обнаружено у 270 линии
```

Множественное выравнивание выведенных вариантов транслированных аминокислотных последовательностей полипептидов белка-предшественника SmAMPs в зависимости от локализации сайта протеолиза. Зрелые пептиды SmAMP1.1a и SmAMP1.2a подчеркнуты и выделены желтым фоном, зеленым показан линкерный участок, в котором расположен сайт ферментативного протеолиза. Жирным шрифтом выделены средние молекулярные массы полноразмерного белка-предшественника, а также зрелые пептиды SmAMPs. Голубым фоном представлены измеренные средние молекулярные массы, совпадающие с соответствующими заданными последовательностями.