

## **Влияние генов T-ДНК агробактерий на устойчивость льнянок к фитопатогенам**

Работу выполнил  
Богомаз Фёдор,  
ученик 6 класса В  
школы 303 (т.89533511050)

Работа выполнена на базе  
Лаб. фитотоксикологии и  
биотехнологии ВИЗР.  
Научный руководитель  
вед.н.сотр., к.б.н.  
Сокорнова С.В.  
(т.89219038544)

Санкт-Петербург  
2018

## Оглавление

Введение	3
Обзор литературы	4
1. Иммуитет растений	4
2. Виды иммунитета	5
3. Вторичные метаболиты и их роль в иммунитете	6
4. Гены агробактерий для повышения синтеза вторичных метаболитов	7
5. Природно-трансгенные растения — почему у них изучают вторичные метаболиты.	8
Материал и методы	9
Результаты и обсуждение	11
Выводы	14
Список литературы	15
Благодарности	16

## Введение

Изучение устойчивости растений к болезням очень важная задача, поскольку от болезней могут быть большие потери урожая сельскохозяйственных растений. Кроме того, многие возбудители болезней растений выделяют токсины, вредные для здоровья людей и животных. Выведение устойчивых сортов — это важное направление работ по борьбе с распространением болезней. С другой стороны, «приручая» некоторые патогены, можно бороться с сорняками.

Для этого всего нужно знать, какие механизмы лежат в основе устойчивости, какие гены их контролируют.

По этой причине целью нашей работы было изучение влияния одного из генов агробактериального происхождения (*rolC*) на устойчивость льнянок к фитопатогенам.

В задачи работы входило:

- освоение методов культивирования растений *in vitro*, работы с фитопатогенами;
- оценка заражения фитопатогенными грибами льнянок, различающихся по наличию гена *rolC*

## Обзор литературы

### 1. Иммуниет растений

Иммуниет растений (фитоиммуниет) -это невосприимчивость растений к патогенам (возбудителям болезней), насекомым, а также к продуктам их жизнедеятельности. Фитоиммуниет обеспечивается множеством механизмов: выработкой низкомолекулярных соединений, обладающих антибактериальными и фунгицидными свойствами, рецепторами распознавания специфических белковых и углеводных последовательностей, характерных для многих возбудителей. Иммуниет растения к патогену— способность растения в той или иной мере противостоять заражению патогеном или противодействовать его развитию в растении. Выделяют также толерантность растения к вредному организму. Это способность растения сохранять удовлетворительную урожайность и качество продукции при поражении возбудителем болезни или повреждении вредителем. [1]

Другими словами : устойчивость заключается в том, что растения какого-либо сорта (иногда вида) не поражаются болезнью или вредителями либо поражаются менее интенсивно, чем другие сорта (или виды). Толерантностью называется способность больных или поврежденных растений сохранять свою продуктивность (количество и качество урожая). Применение устойчивых сортов — наиболее надёжный метод борьбы со многими болезнями растений (ржавчиной хлебных злаков, головнёй и ржавчиной кукурузы и др.). [2]

Механизмы *иммуниета растения к болезням* (устойчивость растения по отношению к фитопатогену) и *иммуниета растения к вредителям* (устойчивость растения к повреждению его вредителями) различны.

Основатель учения об иммуниете растений — советский биолог Н. И. Вавилов (рис.1), положил начало изучению его генетического контроля. Он считал, что устойчивость против болезней выработалась в процессе эволюции растений в центрах их происхождения на фоне длительного (в течение тысячелетий) естественного заражения возбудителями болезней. В

результате эволюции растения приобретали гены устойчивости к патогенам, а возбудители болезней приобретали свойство поражать устойчивые сорта вследствие появления новых физиологических рас. И так постоянно. [2]



Рис.1. Н.И. Вавилов.

## 2. Виды иммунитета

Устойчивость растений к болезням основана на разнообразных механизмах защиты. Их подразделяют на 1) *конститутивные*, т.е. присутствующие в тканях растения-хозяина до инфекции и 2) *индуцированные*, т.е. возникающие в ответ на инфекцию

*Конститутивные (или пассивные) механизмы устойчивости* включают:

- особенности структуры тканей, как механического барьера для проникновения инфекции (наличие волосков, воскового налета, пробковой ткани). Так, восковой налет, густая опушенность листьев и стеблей обеспечивают несмачиваемость и являются препятствиями для прорастания спор грибов и заражения растения. Опушенность листьев затрудняет питание на растении тлей, цикадок и других насекомых с колющесосущим аппаратом, которые являются распространителями вирусов.
- особенности формы растений. Например, сорта картофеля с более рыхлым кустом лучше проветриваются, поэтому меньше поражаются грибными заболеваниями, для развития которых требуется обычно высокая влажность;
- недостаток веществ, которые жизненно необходимы для развития паразита. Например, у лука те сорта, которые содержат больше дисахаридов, меньше поражаются болезнями при хранении, чем луковицы, содержащие много моносахаридов;
- способность к синтезу и выделению веществ со свойствами антибиотиков (фитонцидов). Эта группа веществ представлена эфирными маслами, гликозидами, фенольными соединениями, которые губительно действуют на болезнетворные микроорганизмы. Такими веществами богаты, например, лук и чеснок. Оздоровляющее действие лесного воздуха также связано с присутствием в нем большого количества фитонцидов.

*Индукцированные (или активные) механизмы устойчивости* представляют защитную реакцию растений на внедрение патогена:

- во всех случаях усиливается дыхание и энергетический обмен;
- дополнительно накапливаются вещества, обеспечивающие общую устойчивость (фитонциды, фенолы);
- создаются дополнительные защитные барьеры из разрастающихся покровных и механических тканей;
- синтезируются специфические вещества со свойствами антибиотиков и защитные белки.

### 3. Вторичные метаболиты и их роль в иммунитете

Вторичные метаболиты отличаются от первичных метаболитов тем что первичные метаболиты это молекулы, присутствующие во всех клетках организма и необходимые для жизнедеятельности. Они делятся на четыре категории:

- Углеводы
- Белки
- Липиды
- Нуклеиновые кислоты

А вторичные метаболиты участвуют во взаимодействии растения с окружающей средой, защитных реакциях . Часто их повышенное содержание приводит к устойчивости растений к патогенам.

К вторичным метаболитам относятся следующие классы соединений:

- гликозиды,
- алкалоиды,
- полифенольные соединения (флавоноиды, терпеноиды, кумарины, сапонины)
- эфирные масла.

#### **4. Гены агробактерий для повышения синтеза вторичных метаболитов**

Поскольку увеличение количества вторичных метаболитов повышает устойчивость растений к патогенам, перед учеными стоит задача - найти гены, продукты которых приводят к усилению вторичного метаболизма.

Одним из примеров таких генов являются гены агробактерии *Agrobacterium rhizogenes*.

Эта бактерия вызывает образование у растений злокачественных образований — косматых корней. Обычно они возникают в месте смыкания корня и побега. Такие корни возникают в результате переноса фрагмента бактериальной Ri-плазмиды (Т-ДНК) в клетки растения [4]. Когда-то предполагали, что она играет роль в регулировании гормонального статуса трансгенных клеток. Однако уже в 1987 году было замечено, что культуры косматых корней характеризуются повышенным содержанием вторичных метаболитов. С этого момента появилось предположение, что существуют и другие функции генов Т-ДНК и началось изучение механизмов влияния генов Т-ДНК на вторичный метаболизм растений. В результате проведенных исследований было выявлено влияние отдельных генов Т-ДНК (*rolA*, *rolB*, *rolC*), а так-же их комбинаций на синтез вторичных метаболитов различной природы. [5]

## **5. Природно-трансгенные растения — почему у них изучают вторичные метаболиты.**

Оказывается, в природе есть виды растений, содержащие в геномах последовательности, гомологичные Т-ДНК агробактерий. Такие растения называют природно-трансгенными. К ним относятся некоторые виды льнянок, табака, батата. Считается, что приобретенные от агробактерий гены могли играть важную роль в эволюции. В результате трансформированные растения получали преимущество. Это могло отразиться на приспособляемости к широкому диапазону условий, и повсеместному расселению. Другой возможностью могло быть приспособление к каким-либо экстремальным условиям и способность заселить ранее не пригодные для предковой формы растения территории. К настоящему времени функции далеко не всех генов Т-ДНК известны. Поэтому нет единого мнения, какое преимущество получили трансгенные растения перед своими нетрансформированными сородичами. Обсуждается роль Т-ДНК в контроле вегетативного размножения и/или взаимодействии с микроорганизмами.[6]. Во втором случае влияние на микроорганизмы может быть обусловлено изменением содержания вторичных метаболитов. Так у трансгенных льнянок повышается уровень иридоидных гликозидов, которые могут играть защитную роль.

Поэтому в данной работе мы изучали особенности заражения различных льнянок фитопатогенами. Льянки различались наличием генов агробактериального происхождения.

## Материал и методы

### Материал

В качестве растительного материала в работе использованы природно-трансгенные льнянки (*Linaria vulgaris*, *L. cretaceae*), нетрансгенная *L. maroccana* (Л1 и сорт Калейдоскоп) и полученные на ее основе в лаборатории генной и клеточной инженерии СПбГУ трансгенные формы, содержащие ген *rolC* из *L. vulgaris* (Б1, Вл) [7]. Растительный материал поддерживается в асептической культуре на среде Мурасига-Скуга черенкованием, как описано в статье [8].

У природно-трансгенных растений ранее описана экспрессия (работа) гена *rolC*, но ее интенсивность разная – более высокая у *L. vulgaris*, более низкая у *L. cretaceae*. У лабораторных трансформантов Б1, Вл также разная интенсивность экспрессии гена (назкая у Б1, высокая – у Вл).

В работе использованы приведенные ниже штаммы фитопатогенов коллекции ВИЗР, выращиваемые на картофельно-глюкозном агаре (рис. 2)

*Fusarium proliferatum* C1, 171

*Boeremia exigua* 32.36, 32.118, Ph1, 263. Ph6

*Phomopsis* sp. K1

### Методы

Асептические растения черенковали и высаживали на питательную среду Мурасиге скуга для подращивания в течение недели (рис.3), далее их инокулировали различными штаммами фитопатогенов. Для этого на растения (3 чашки по 2 растения на вариант) помещались диски диаметром 3 мм 10-дневной культуры гриба, выращенной на картофельно-глюкозном агаре. Развитие заболевания оценивали визуально на 2-е сутки по площади поражения, распространенности заболевания (рис.4).

Оценивали процент поражения и его ошибку.

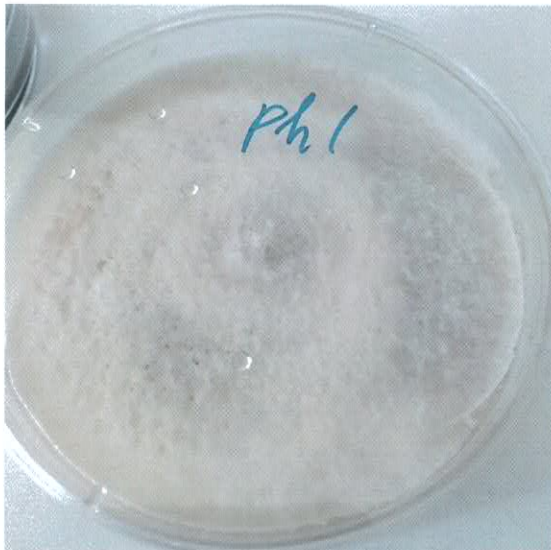


Рис. 2. Чашка Петри с культурой гриба *Boeremía exigua* до заражения растения.

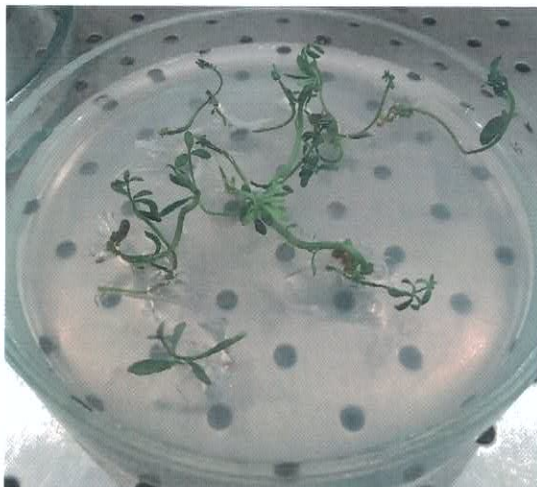


Рис. 3. Чашка Петри растениями льнянки обыкновенной до заражения.



Рис. 4. Чашка Петри растениями льнянки марокканской, зараженной культурой гриба *Boeremía exigua* на 2 день.

## Результаты и обсуждение

Фитопатогенные грибы по-разному воздействовали на растения. Гриб мог разрастаться по питательной среде, но не поражать растение. Тогда оно считалось устойчивым. Но в большинстве случаев растения были поражены грибом. В диаграммах на рисунках 5 и 6 показан суммарный процент поражения эксплантов.

Среди штаммов *B. exigua* были более и менее агрессивные.

Все исследованные штаммы *Fusarium* сильно поражали все льнянки.

Обе нетрансгенные линии *L. maroccana* похожим образом реагировали на заражение и были не устойчивы к большинству патогенов. Также низкая устойчивость была характерна для форм с низкой экспрессией трансгена (Б1 и *L. cretaceae*)

В некоторых вариантах опыта *L. vulgaris* и Вл оказывались заметно более устойчивыми к грибу *Boeremia exigua*, чем другие льнянки.

Все наши наблюдения свидетельствуют о роли гена *rolC* в формировании устойчивости к *B. exigua*. В тоже время, к фузариуму не устойчивы все льнянки. Значит механизмы устойчивости тут разные.

В дальнейшем надо увеличит выборки для исследования, чтобы выявлять более тонкие различия, но уже сейчас наметились интересные результаты, которые можно использовать, получая устойчивые формы растений.

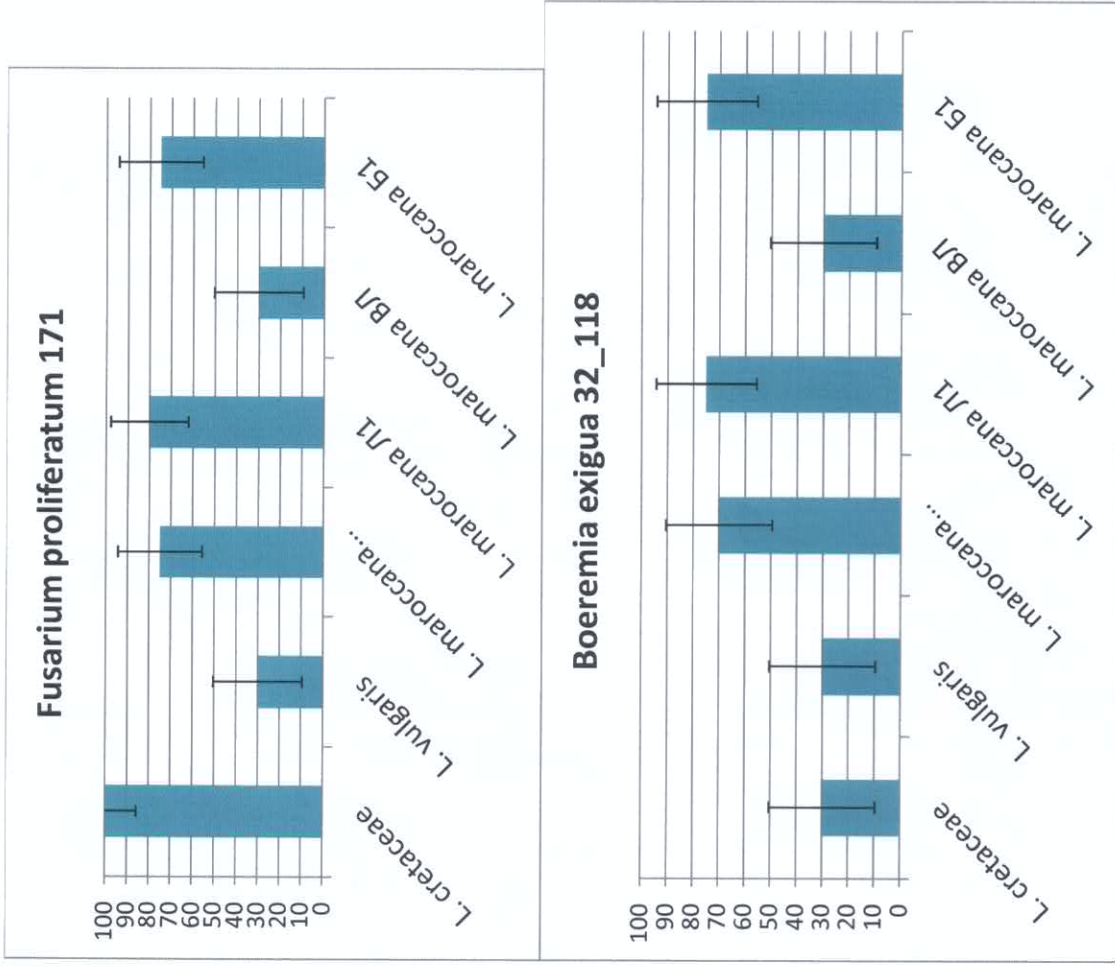
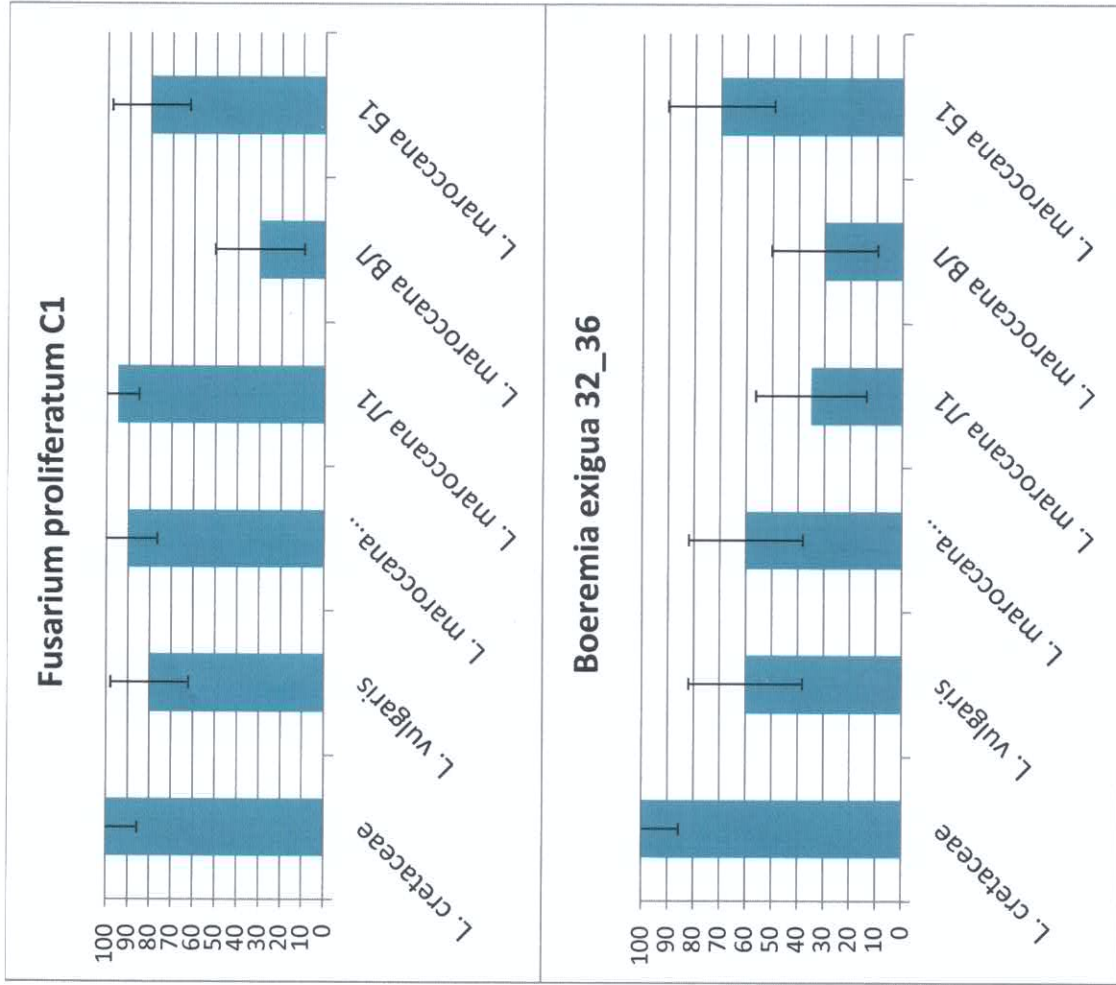


Рис. 5 . Количественные характеристики патогенности штаммов грибов в отношении различных генотипов льнянок (часть 1)

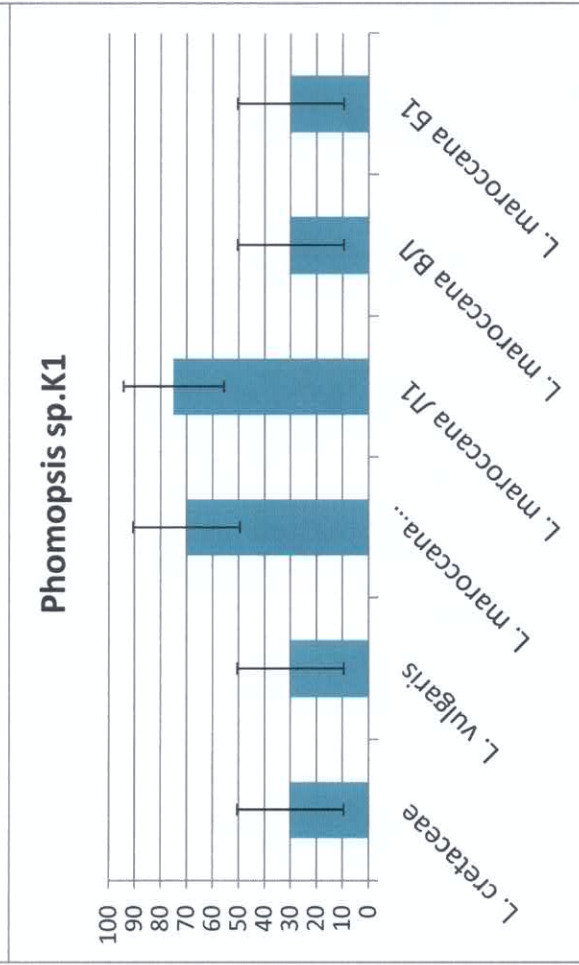
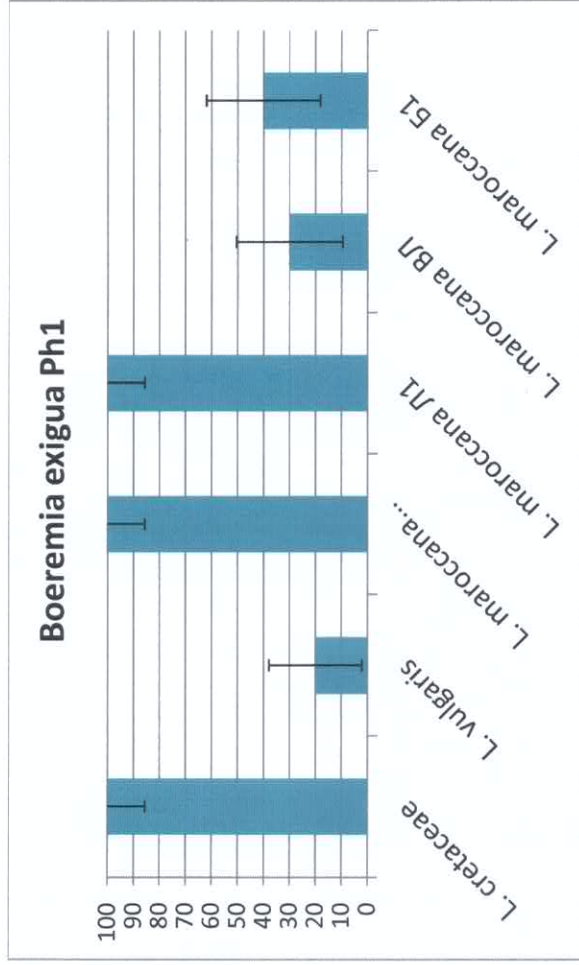
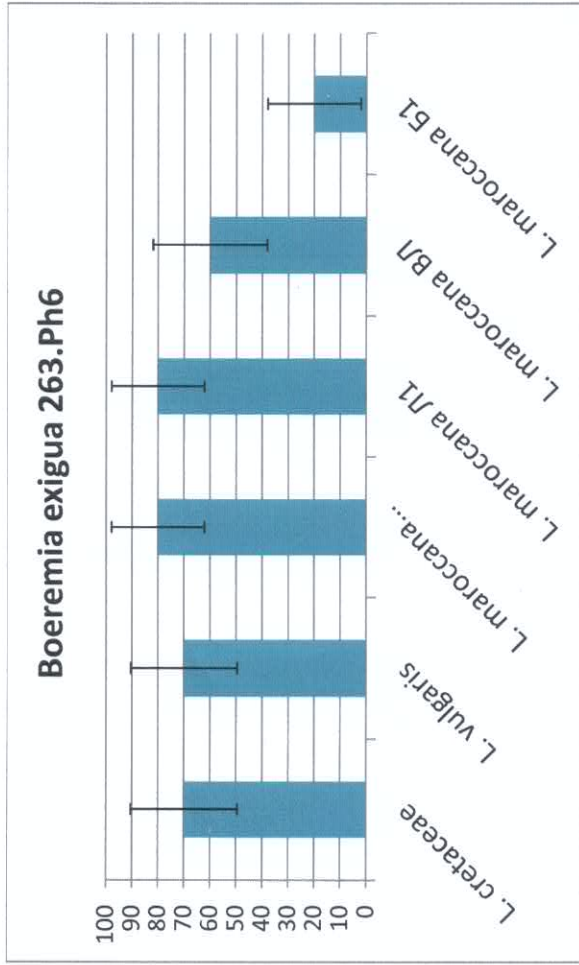


Рис. 6 . Количественные характеристики патогенности штаммов грибов в отношении различных генотипов льнянок (часть 2)

## Выводы

1. Наиболее агрессивными из изученных патогенов в отношении льнянок являются штаммы вида *F. proliferatum*
2. Формы льнянок, содержащие функциональный ген *rolC*, более устойчивы к *B. exigua.*, чем формы без этого гена.
3. В основе устойчивости к изученным грибам лежат разные механизмы.

## Список литературы

1 Иммуни́тет растений (статья из Википедии)

([https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%98%D0%BC%D0%BC%D1%83%D0%BD%D0%B8%D1%82%D0%B5%D1%82\\_%D1%80%D0%B0%D1%81%D1%82%D0%B5%D0%BD%D0%B8%D0%B9](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%98%D0%BC%D0%BC%D1%83%D0%BD%D0%B8%D1%82%D0%B5%D1%82_%D1%80%D0%B0%D1%81%D1%82%D0%B5%D0%BD%D0%B8%D0%B9)), дата обращения 10.10.18

2 Иммуни́тет растений (<https://www.booksite.ru/fulltext/1/001/008/053/276.htm276.htm>), дата обращения 10.10.18

3 Устойчивость сельскохозяйственных растений к патогенным микроорганизмам .  
Зооинженерный факультет МСХА  
( <http://www.activestudy.info/ustojchivost-selskoxozyajstvennyx-rastenij-k-patogennym-mikroorganizmam>), дата обращения 11.10.18

4 *Agrobacterium* (статья из Википедии)

(<https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%90%D0%B3%D1%80%D0%BE%D0%B1%D0%B0%D0%BA%D1%82%D0%B5%D1%80%D0%B8%D0%B8>) дата обращения 15.10.18

5 *Матвеева Т.В., Сокорнова С.В* Биологические особенности природно-трансгенных растений и их роль в эволюции.//Физиология растений. 2017. Т. 64. № 5. С. 323-336.

6 Богомаз О., Бемова В., Рогачева М., Сокорнова С.В., Матвеева Т.В. Гриродно-трансгенные растения: эндемики и космополиты// Сохранение природной среды и особо охраняемые природные территории (К 100-летию мониторинга экосистем Петергофа и его окрестностей) Материалы XI молодежной экологической школы-конференции с международным участием в усадьбе "Сергиевка". 2017. Издательство: ООО "Издательство ВВМ" (Санкт-Петербург)

7. Владимиров И.А., Матвеева Т.В., Лутова Л.А. Метод трансформации марокканской льнянки (*LINARIA MAROCCANA* НООК Ф. Генетика, 2018, Т.54(8), С. 964-968)

8. Матвеева Т.В. , Богомаз О.Д. , Голованова Л.А. , Ли Ю.С., Димитров Д. Гомологи гена *rolC* природно-трансгенных льнянок *Linaria vulgaris* и *Linaria cretica* экспрессируются *in vitro*, Вавиловский журнал генетики и селекции, 2018, Т. 22(2), С. 273-278

## **Благодарности**

Выражаю глубокую благодарность своему научному руководителю **Сокорновой Софье Валерьевне**, а также коллективу лаборатории фитотоксикологии и биотехнологии ВИЗР за возможность выполнения исследования и поддержку на всех этапах работы.

Благодарю свою маму, Матвееву Татьяну Валерьевну за идею работы и помощь при ее написании.