

УДК 577.122

САЛИЦИЛАТ-ИНДУЦИРУЕМЫЕ ХИТИНАЗЫ В КОРНЯХ ГОРОХА

© 2020 г. А. М. Егорова^{1,*}, Н. Велш², академик РАН И. А. Тарчевский¹

Поступило 22.03.2020 г.

После доработки 15.05.2020 г.

Принято к публикации 15.05.2020 г.

В корнях гороха обнаружены три белка, индуцируемых салициловой кислотой, которые были идентифицированы как изоферменты хитиназы, относящиеся к гликозид-гидролазам семейства 18. Выявлен транскрипт PsCam050724, кодирующий одну из этих изоформ, что позволило определить ее первичную структуру, в которой отсутствует сигнальный пептид.

Ключевые слова: салициловая кислота, хитиназы, фитоиммунитет, *Pisum sativum*

DOI: 10.31857/S268673892005011X

Известно, что салициловая кислота (СК) является одним из ключевых факторов фитоиммунитета [1]. При атаке патогенов в тканях растений происходит многократное повышение содержания СК, запускается СК-зависимый сигнальный каскад, приводящий к изменению программы экспрессии генов и синтезу защитных белков, например, хитиназ [2, 3].

У разных видов растений было выявлено различное число генов хитиназ [4], экспрессия которых отличалась в зависимости от условий, например, от действия биотических и абиотических стресс-факторов. Индукция хитиназ СК была охарактеризована у многих видов растений, но, главным образом, в надземных органах. В то же время, не меньшую значимость имеют исследования ответа корней на действие СК, поскольку она участвует в их ответе на атаку почвенных патогенов, тем более что проблема взаимоотношений корней с многообразным населением ризосферы изучена слабо [5]. Ранее нами было обнаружено, что СК вызывала как снижение, так и повышение содержания ряда белков в корнях гороха, часть из которых нами была идентифицирована [6]. Остались не идентифицированными три кислых белка, близко расположенных на двумерных электрофореграммах, содержание которых многократно повышалось под влиянием СК. Настоящая статья посвящена результатам идентификации этих белков.

Для изучения влияния СК на протеом корней 8-дневные проростки гороха *Pisum sativum* L. сорт Тан выращенные на 1/4 питательной среды Хогланда–Арнона, обрабатывались 50 мкМ СК в течение 72 ч. Контролем служили растения, не обработанные СК. Выделение растворимых белков корней гороха и двумерный электрофорез проводили по методике, использованной в предыдущей работе [6]. Для идентификации белковые пятна вырезали из геля и подвергали трипсинолизу. Анализ полученных пептидов проводили методом UPLC-MS/MS масс-спектрометрии с последующим поиском возможных совпадений по MS BLAST, описанным в предыдущей работе [7]. Анализ первичной структуры белков проводили на сервере NCBI. Содержание белков определяли с использованием программы PDQuest 8.1 (BioRad, США).

Под влиянием СК значительно повышалось содержание не идентифицированных ранее трех кислых белков с молекулярной массой 34–35 кДа и pI 4.4–4.7 (рис. 1а).

Индукция этих белков салицилатом обнаруживалась уже через 12 ч его действия на корни, через 72 ч содержание белка 1203 повышалось в среднем в 15 раз, 1207 – в 28 раз, 1209 – в 90 раз (рис. 2). Содержание в контрольном варианте первого белка было в 8 и в 10 раз выше, чем у последних двух белков, но после обработки корней СК оно стало более выровненным (у первого выше, чем у последних, соответственно, в 4.0 и в 1.3 раза) за счет более интенсивного синтеза всех трех белков (рис. 2). Использование меченых ¹⁴C-аминокислот позволило выяснить, что повышение содержания этих белков вызвано активацией их синтеза (рис. 1б), но не торможением протеолиза [6]. Этот вывод был подтвержден

¹ Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ Казанский научный центр Российской академии наук, г. Казань, Россия

² Институт химической экологии Общества Макса Планка, г. Йена, Германия

*e-mail: egorova@kibb.knc.ru

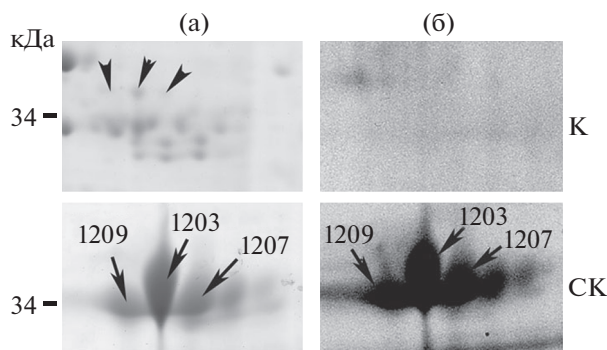


Рис. 1. (а) – фрагменты двумерных электрофореграмм растворимых белков корней гороха. Растворимые белки корней гороха были разделены методом двумерного электрофореза на стрипах IPG иммобилизованным градиентом рН 4–7, 11 см (Bio-Rad). На гели нанесено 300 мкг белка. Гели окрашены соomassie Brilliant Blue G250. К – контроль, СК – обработка салициловой кислотой (50 мкМ) в течение 72 ч. (б) – фрагменты радиоавтографов, полученных с гелей растворимых белков корней гороха, в среду роста которых добавлялись ^{14}C -аминокислоты. Номерами обозначены белки, индуцируемые салициловой кислотой.

опытами, в которых наблюдалось полное ингибирование их СК-индукции при одновременной обработке корней СК и антибиотиком циклогексимидом (ингибитором синтеза белков 80S рибосомами) [8].

До недавнего времени нам не удавалось идентифицировать эти белки, вероятно в связи с тем, что они проявляли низкую степень схожести с последовательностями известных белков. Поэтому для их идентификации был использован метод *de novo* секвенирования пептидов с последующим поиском MS BLAST по гомологичным белкам [9].

В СК-индуцируемых белках были секвенированы пептиды, которые позволили отнести их к хитиназам гликозид гидролазного семейства 18 (GH18) (табл. 1).

Пептид LDGLDLNYE характерен для всех трех исследованных нами белков. В исследованных белках секвенированы и другие схожие пептиды, что также говорит в пользу того, что эти белки являются изоформами хитиназ (табл. 1).

На основе идентифицированных пептидов и гомологичных белков был проведен поиск по базе данных транскриптов гороха The Pea RNA-Seq gene atlas (<http://bios.dijon.inra.fr/FATAL/cgi/pscam.cgi>) [10], что позволило выявить транскрипт PsCam050724, который кодирует секвенированные пептиды всех трех исследованных хитиназ (табл. 1). Отличающиеся изоэлектрические точки белков могут объясняться их посттрансляционной модификацией. Не исключается и альтернативный вариант, при котором каждый белок кодируется своим транскриптом, поскольку в базе дан-

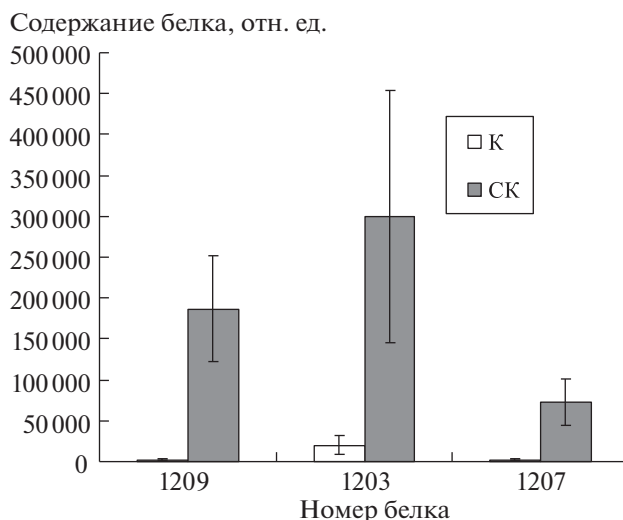


Рис. 2. Влияние обработки салициловой кислотой (72 ч) на содержание салицилат-индуцируемых белков. Результаты были получены с использованием программы PDQuest (BioRad, США). Для обчета использовались по три геля растворимых белков корней гороха, разделенных на стрипах с иммобилизованным градиентом рН 4–7 контрольного и опытного вариантов, каждый из которых представлял биологическую повторность. Светлые столбики – контроль, темные столбики – влияние СК.

ных транскриптов гороха мы обнаружили и другие последовательности, гомологичные PsCam050724, содержащие некоторые из секвенированных нами пептидов.

Биоинформационный анализ первичной структуры хитиназы, кодируемой PsCam050724, показал, что она имеет мол. массу 33.5 кДа и рI 4.76, что соответствует данным, полученным нами с использованием двумерного электрофореза. Сравнительный анализ структуры идентифицированной нами хитиназы из *Pisum sativum* выявил относительно высокую степень гомологии с хитиназой 2 из *Cicer arietinum* (52% с белком XP_004503412.1) и *Medicago truncatula* (50% с белком XP_003594919.1). Кроме того, выявленный нами белок имеет сходство с хитиназой из лукович тюльпана *Tulipa saxatilis* (34%), для которой показана хитиназная активность [11].

Для многих кислых хитиназ характерны присутствие сигнального пептида и секреция в апопласт. Анализ последовательности белка, кодируемого PsCam050724, показал отсутствие сигнального пептида, необходимого для секреции белков по классическому типу, что предполагает возможность секреции этих белков по не классическому типу.

Следует отметить, что в специально проведенных опытах мы не обнаружили СК-индуцируемых хитиназ, подобных гороховым, в корнях од-

Таблица 1. Последовательности пептидов, идентифицированных в СК-индуцируемых белках корней гороха по поиску MS BLAST

№ белка на геле ¹	Секвенированные пептиды ²	Score ³	Последовательность белка из базы данных Pea RNA-Seq gene atlas ⁴	Гомологичный белок(ки) ⁵
1209	LDGLDLNVE DFAYCLGEVLK SLARTEDFQPHY LDGLDLNVELLK SDEDDFAYCLGEVLK EDDFAYCLGEVLK	63 61 60 68 82 75		KEH15912.1 glycoside hydrolase family 18 protein [<i>Medicago truncatula</i>] XP_004503412.1 chitinase 2-like [<i>Cicer arietinum</i>]
1203	TWNVDDFSPTK LDGLDLNVE LDGLDLNVELLK SEDDFAY SGRWVSLAPMPFQPHY VNVVSLAPT LDWLNK	63 63 61 55 62 56 56	>PsCam050724 MFVSSQSDIKAVVRPIIFREYTECLDAFPASIIENMSQFHFIL GFATDTYLQDGTGTGNFTRVWVDDFSPTKVNLNKKQEHNRN VKVVISIGGGHGPEDVFNPYDKEEWIKNAKSSIKDLLLDYKVE STP VNIY TIDGIDINYEIKSNEDAFAYCIGKVIKQKEDPQ VLNSVNVYSIAPTEDLQPHYRTLYLENQDNIDWVNYKIFYN QSFDSENEVFKLFLKILLFQYRTPCKLLPGVSTNTSSPSPMTTD IFVKGCTILLKTVSLPGVFWVDANTSAPAYSLEGEIQDQLLTK Q	XP_014492767.1 chitinase 2-like [<i>Vigna radiata</i> var. <i>Radiata</i>] XP_004509468.1 [<i>Cicer arietinum</i>]
1207	LDGLDLNVE WQLDRFSPTK NNLDWLNK	63 60 58		GAU44039.1 Glyco_hydro_18 domain-containing protein [<i>Trifolium subterraneum</i>]

¹ номер белка на геле;² последовательность аминокислот в секвенированных пептидах;³ Score секвенированных пептидов;⁴ аминокислотная последовательность белка, кодируемая транскриптом PsCam050724 из базы данных транскриптов гороха, секвенированные пептиды выделены подчеркиванием, где возможна замена I = L;⁵ белок(ки), по гомологии с которыми были идентифицированы секвенированные пептиды по MS BLAST поиску.

нодольных растений риса и пшеницы и в корнях двудольных бобовых растений сои и фасоли.

Известно, что экскретируемые хитиназы могут оказывать подавляющее влияние на хитин-содержащих обитателей ризосферы — грибов (в том числе патогенных), нематод и насекомых. По всей вероятности, это относится и к идентифицированным нами изоформам хитиназы корней гороха.

Хитиназы все больше используются в качестве агентов биоконтроля для борьбы с болезнями сельскохозяйственных растений. Было создано много трансгенных растений, в которые были перенесены гены активных хитиназ из микроорганизмов и из других растений [12, 13]. В последнем случае донором генов хитиназ чаще всего выступают растения риса [14], а реципиентами — овес, табак, морковь, арахис и др. [15]. Не исключено, что идентифицированные нами хитиназы смогут использоваться в агробιοтехнологии для подавления почвенных фитопатогенных грибов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие конфликтов интересов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта 20-016-00238а и в рамках государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Klessig D.F., Malamy J.* // Plant Mol. Biol. 1994. V. 26. № 5. P. 1439–1458.
2. *Blanco F., Salinas P., Cecchini N.M., et al.* // Plant Mol. Biol. 2009. V. 770. № 1-2. P. 79–102.
3. *Тарчевский И.А.* “Молекулярная война между растениями и микроорганизмами. Роль салициловой кислоты в фитоиммунитете”. XXIV Годневские чтения. НАН Беларуси. Минск: “Право и экономика”. 2017.
4. *Bartholomew E.S., Black K., Feng Z., et al.* // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. № 21. P. 5309.
5. *Lareen A., Burton F., Shafer P.* // Plant Mol. Biol. 2016. V. 90. № 6. P. 575–587.
6. *Тарчевский И.А., Яковлева В.Г., Егорова А.М.* // Физиология растений. 2011. Т. 58. № 4. С. 523–532.
7. *Skaljic M., Vogel H., Wielsch N., et al.* // Front Physiol. 2019. V. 10. 438.
8. *Егорова А.М., Тарчевский И.А.* // Доклады РАН. 2015. Т. 461. № 4. С. 468–471.
9. *Shevchenko A., Sunyaev S., Loboda A., et al.* // Anal. Chem. 2001. V. 73. № 9. P. 1917–1926.
10. *Alves-Carvalho S., Aubert G., Carrère S., et al.* // Plant J. 2015. V. 84. № 1. P. 1–19.
11. *Yamagami E., Ishiquro M.* // Biosci. Biotechnol. Biochem. 1998. V. 62. № 6. P. 1253–1257.
12. *Cletus J., Balasubramanian V., Vashisht D., et al.* // Biotechnol. Lett. 2013. V. 35. № 11. P. 1719–1732.
13. *Prasad K., Bhatnagar-Mathur P., Waliyar F., et al.* // J. Plant Biochem. Biotech. 2013. V. 22. № 2. P. 222–233.
14. *Jalil S.U., Mishra M., Ansari M.I.* // Trends in Bioscience. 2015. V. 8. № 24. P. 633–6743.
15. *Durechova D., Jopcik M., Rajninc M., et al.* // Mol Biotechnol. 2019. V. 61. № 12. P. 916–928.

SALICYLATE INDUCED CHITINASES IN PEA ROOTS

A. M. Egorova^{a, #}, N. Wielsch^b, and academician of the RAS I. A. Tarchevsky^a

^a *Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Kazan, Russian Federation*

^b *Max Planck Institute for Chemical Ecology, Jena, Germany*

[#]*e-mail: egorova@kibb.knc.ru*

Three proteins induced by salicylic acid have been revealed in pea roots. These proteins were identified as chitinase isozymes belonging to the glycoside hydrolases family 18. The PsCam050724 transcript encoding at least one of these isoforms has been found, allowing us to determine its primary structure and to find out that it lacks a signal peptide.

Keywords: salicylic acid, chitinases, phytoimmunity, *Pisum sativum*