

На правах рукописи

ЕРОХИН ДЕНИС ВАЛЕРЬЕВИЧ

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ СОВМЕСТНОГО ДЕЙСТВИЯ
ИНДУЦИРУЮЩИХ БОЛЕЗНЕУСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ БЕЛКОВ MF2 И MF3**

Шифр и наименование научной специальности:

4.1.3. – «Агрохимия, агропочвоведение, защита и карантин растений»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в отделе молекулярной биологии федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии» (ФГБНУ ВНИИФ)

Научный руководитель:

Джавахия Виталий Георгиевич,
кандидат биологических наук,
заведующий отделом молекулярной биологии
федерального государственного бюджетного
научного учреждения «Всероссийский научно-
исследовательский институт фитопатологии»
(ФГБНУ ВНИИФ)

Официальные оппоненты:

Смирнов Алексей Николаевич,
доктор биологических наук,
профессор кафедры защиты растений федерального
государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего образования «Российский
государственный аграрный университет — МСХА
имени К. А. Тимирязева»

Одинцова Татьяна Игоревна,
доктор биологических наук,
заведующая лабораторией молекулярно-генетических
основ иммунитета растений федерального
государственного бюджетного учреждения науки
«Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова
Российской академии наук»
(ИОГен РАН)

Ведущее учреждение:

Федеральное государственное бюджетное учреждение
науки «Государственный научный центр
Российской Федерации Институт биоорганической
химии им. академиков М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова Российской академии наук»
(ГНЦ ИБХ РАН)

Защита диссертации состоится «__» _____ 2026 г. в __ часов на заседании диссертационного совета 24.1.008.01 на базе федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений» (ФГБНУ ВИЗР) по адресу: 196608, Санкт-Петербург – Пушкин, шоссе Подбельского, д. 3, факс: (812) 470-51-10; E-mail: dissovet@vizr.spb.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ ВИЗР и на сайте vizrspb.ru Всероссийского научно-исследовательского института защиты растений

Автореферат разослан «__» _____ 2026 г.

Ученый секретарь диссертационного
совета,

доктор биологических наук

Гусева Ольга Геннадьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Индуцированная устойчивость (ИУ) является одной из форм активного иммунитета растений к вредным организмам и обладает значительным потенциалом для предотвращения или ослабления болезней сельскохозяйственных культур при одновременном снижении потребности в загрязняющих агроценозы пестицидах-ксенобиотиках. В настоящее время активно разрабатываются подходы, направленные на создание средств защиты на основе биогенных соединений, вызывающих развитие ИУ в обработанных ими растениях. Наряду с другими веществами природного происхождения, такими биогенными индукторами устойчивости являются белок MF2, относящийся к семейству белков холодового шока CspD (выделен из *Bacillus thuringiensis*), и белок MF3 из семейства пептидил-пролил цис/транс изомераз FKBP-типа (выделен из *Pseudomonas fluorescens*).

Белковая природа рассматриваемых индукторов болезнеустойчивости, предполагающая отсутствие токсичных для окружающей среды соединений и продуктов их деградации, а также возможность получения легко культивируемых штаммов-суперпродуцентов рекомбинантных MF2 и MF3, делают эти белки перспективными действующими веществами для биопрепаратов. Такие препараты позволили бы fuller использовать ресурс ИУ в современных системах интегрированной защиты растений от патогенов.

Степень разработанности темы. При проведении различных биотестов и вегетационных экспериментов ранее было показано, что обработка белками MF2 и MF3 приводит к защите ряда двудольных и однодольных сельскохозяйственных культур от вирусов и грибов (Щербакова, Джавахия, 2013). Было также установлено, что MF2 и MF3 не обладают вирулицидной или фунгицидной активностью (Кромина, 2006; Шумилина, 2007), а их защитное действие опосредовано растением и связано с развитием ИУ к болезням (Щербакова, Джавахия, 2023).

Для эффективного и научно обоснованного использования MF2 и MF3 решающее значение имеет раскрытие механизмов их действия, в частности того, какие молекулярные события и какие защитные ответы растений индуцируют эти белки.

Цель исследования. Оценить эффективность совместного применения белков MF2 и MF3 для защиты растений от патогенов и изучить влияния этих белков на развитие индуцированной устойчивости у растений на структурно-функциональном и транскриптомном уровнях.

Задачи исследования:

1. Конструирование химерного белка MF2/MF3 и проверка его функциональности.
2. Оценка уровня и характера защитного действия смеси белков MF2 и MF3, а также сконструированного химерного белка MF2/MF3 в патосистемах «*Nicotiana tabacum* L. (табак) - вирус табачной мозаики (ВТМ)» и «*Cucumis sativus* L. (огурец) - возбудитель оливковой пятнистости огурца (*Cladosporium cucumerinum*).
3. Определение взаимосвязи между элементами аминокислотной последовательности активного центра MF3 (АЦ-MF3) и сохранением защитных свойств полноразмерного белка путем получения его мутантных форм для поиска мутаций в АЦ-MF3, приводящих к потере или существенному снижению защитной активности данного белка-индуктора в патосистемах «табак - ВТМ» и «огурец - *C. cucumerinum*).
4. Оценка характера влияния MF2 и MF3 на профили экспрессии генов в обработанных растениях табака.

Научная новизна. Впервые сконструирован химерный белок MF2/MF3, обладающий способностью индуцировать устойчивость растений к патогенным грибам и вирусам. Установлено, что совместное применение MF2 и MF3 в виде химерного MF2/MF3 в патосистеме «огурец - *C. cucumerinum*» приводит к достоверному синергетическому защитному эффекту. Показано, что использование как MF2/MF3, так и смеси MF2 с MF3 значительно превышало уровень защитного действия этих индивидуальных индукторов в патосистеме «табак - ВТМ». Впервые определены ключевые детерминанты сохранения защитной активности MF3 на уровне отдельных аминокислот в составе его активного центра. Впервые показано, что под действием MF2 в растениях табака происходит локальное и системное повышение уровня экспрессии арсенала защитных генов, в том числе гена супероксиддисмутазы и установлено, что обработка MF2 может приводить к развитию ISR – одного из типов ИУ растений к патогенам и вредителям. Впервые обнаружено, что влияние MF2 на транскриптом обработанных растений может выражаться в активации генов, связанных с ответом растений на абиотический стресс и их реакцией на свет. Впервые продемонстрирована возможность прайминга защитных генов табака и пшеницы в результате обработки растений MF3.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные данные об аминокислотных детерминантах АЦ-MF3, определяющих его защитную функцию, а также о влиянии MF2 и MF3 на экспрессию генов обработанных ими растений, позволяют расширить представление о молекулярных механизмах действия белковых индукторов

болезнеустойчивости и развитии процессов индуцированного иммунитета растений. Продемонстрированное усиление защитного эффекта как смеси MF2 и MF3, так и полученного химерного белка MF2/MF3 против ВТМ и причиняющего серьезный экономический ущерб гриба *C. cucumerinum*, по сравнению с индивидуальными белками-индукторами, открывает путь к созданию новых эффективных препаратов, использующих защитный потенциал обоих белковых индукторов.

Методология и методы исследования. В ходе выполнения диссертационного исследования применялись соответствующие общепринятой мировой практике стандарты и методики проведения лабораторных экспериментов. Полученный экспериментальный материал был статистически обработан с использованием методов параметрической и непараметрической статистики.

Положения, выносимые на защиту:

1. Остатки валинов в положениях 60 и 62 играют ключевую роль в реализации защитной активности белка MF3 в патосистемах «табак - ВТМ» и «огурец - *C. cucumerinum*».
2. Обработка растений табака белком MF2 приводит к усилению экспрессии арсенала защитных генов, локальному и системному повышению уровня экспрессии супероксиддисмутазы, а также к обогащению терминов генной онтологии, связанных с реакциями растения на свет, для гомологичных генов арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*).
3. Использование как сконструированного гибридного белка MF2/MF3, так и смеси MF2 и MF3 в патосистемах «табак–ВТМ» и «огурец – *C. cucumerinum*» приводит к защитному эффекту, уровень которого превышает эффект от применения индивидуальных индукторов.

Достоверность результатов исследования. Степень достоверности результатов исследований определяется значительным объемом как минимум трижды воспроизведенных лабораторных экспериментов, проведенных с использованием стандартных общепризнанных методик с применением современной приборной базы и качественных расходных материалов, а также объемом полученных данных, достаточным для проведения их статистической обработки и выявления достоверности различий.

Апробация работы. Основные результаты диссертационного исследования представлены на следующих российских и международных конференциях: VIII Пущинской конференции «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов» (Пущино, 2022); XIII Международной научной конференции «Микробные биотехнологии:

фундаментальные и прикладные аспекты» (Минск, 2023); 13-ой Международной научной конференции «Биокатализ. Фундаментальные исследования и применения» (Суздаль, 2023); V Всероссийском съезде по защите растений (Санкт-Петербург, 2024); IV Международной конференции по цифровизации сельского хозяйства и органическому производству «ADOP 2024» (Минск, 2024); Международной научной конференции «Астана Биотех 2024» (Астана, 2024), а также на XIV Международной научной конференции «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты» (Минск, 2025).

Публикации. По результатам исследования опубликовано 9 работ, из них 3 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ и входящих в международные базы данных.

Личный вклад автора. Диссертационная работа является результатом исследований, выполненных лично автором или при его определяющем участии в процессе работы в отделе молекулярной биологии ФГБНУ ВНИИФ. Диссертанту принадлежит ключевая роль в постановке научных задач, дизайне экспериментов, анализе полученных данных, их статистической обработке, а также в подготовке к печати научных публикаций.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, основной части, заключения и списка литературы. Материал изложен на 131 странице машинописного текста, содержит 4 таблицы и 15 рисунков. Список литературы включает 250 источников, из которых 235 – международные журналы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Молекулярные механизмы индуцированной устойчивости растений к фитопатогенам (обзор литературы)

Раздел посвящен теоретическим основам создания препаратов для защиты растений от болезней на основе использования ресурса ИУ растений. Рассмотрены основные виды ИУ и ее молекулярные механизмы. В рамках локального этапа ИУ изложены механизмы рецепции индукторов болезнеустойчивости растительной клеткой, ранние защитные реакции растений и сигналинг с участием фитогормонов. Описание системного этапа ИУ представлено информацией о механизмах действия, лежащих в основе системной приобретенной и индуцированной системной устойчивости. Дано описание основных характеристик и механизмов действия ряда индукторов болезнеустойчивости бактериального и грибного происхождения, а также отдельно рассмотрена история открытия и изучения основных

объектов диссертационной работы – белков-индукторов MF2 и MF3. Кроме того, проведен анализ перспектив практического применения ИУ для защиты растений от патогенов.

Глава 2. Материалы и методы исследования

В разделе описаны методики проведения биотестов оценки защитной активности MF2 и MF3. В качестве основной модели использовали патосистему «табак - ВТМ» (Кромина, 2006; Шумилина, 2007), а в качестве дополнительной - патосистему «огурец – *Cladosporium cucumerinum*» (Voinova et al., 2021). Кроме того, эксперименты с обработкой растений белком MF3 проводили, используя патосистемы «табак - *Alternaria longipes*» и «*Triticum aestivum* L. (пшеница) - *Parastagonospora nodorum*».

В разделе приведено подробное описание методик проведения молекулярно-биологических и биохимических экспериментов, таких как сайт-направленный мутагенез, молекулярное клонирование, получение белков в бактериальных системах экспрессии; оценка дифференциальной экспрессии генов с помощью ПЦР-рв, NGS-секвенирование тотальной мРНК с последующей биоинформатической обработкой полученных данных; анализ содержания активных форм кислорода в листьях. Также описаны использованные статистические методы и методы компьютерного моделирования и визуализации структуры белков.

Глава 3. Изучение эффективности совместного применения MF2 и MF3 для защиты растений от патогенных микроорганизмов

Исследование защитной активности смеси MF2 и MF3

При раздельной инокуляции половинок одного и того же листа число некрозов, образующихся на них в ответ на инфицирование ВТМ, оказывается примерно одинаковым (Popletaeva et al., 2023), поэтому при оценке защитной активности исследуемых белков сравниваемые препараты наносили на разные половинки одного и того же листа. Тестирование защитной активности смеси белков MF2 и MF3 в патосистеме «табак-ВТМ» показало, что исследованная смесь обладает большей защитной активностью, чем каждый из этих белков по отдельности (таблица 1).

Таблица 1 – Влияние обработки листьев табака некрозообразующего сорта Xanthi NN препаратами MF2, MF3 и их смесью на уровень поражения листьев ВТМ

Вариант обработки половинок листьев	Среднее число некрозов $\pm$ SD	Число некрозов, % от контроля	Значение p^*
Контроль – H ₂ O (правая половина) (левая половина)	108,0 $\pm$ 9,5 112,0 $\pm$ 4,2	– –	
MF3 (правая половина) MF2+MF3 (левая половина)	54,0 $\pm$ 16,5 23,0 $\pm$ 8,2	49,5 21,0	0,005*
Контроль – H ₂ O (правая половина) (левая половина)	42,4 $\pm$ 7,1 45,6 $\pm$ 3,9	– –	
MF2 (правая половина) MF2+MF3 (левая половина)	20,8 $\pm$ 4,3 8,6 $\pm$ 4,4	47,3 19,5	0,002*

*Уровень значимости отличий эффекта смеси от индивидуальных белков.

Получение и исследование защитной активности химерного белка MF2 и MF3

С использованием классической и Overlap-ПЦР был получен гибридный белок MF2/MF3 (Ерохин и др., 2024), представляющий собой химерную структуру, в которой белок MF2 присоединён к N-концевому участку MF3 через полиаланиновый линкер (AAALIAA) (рисунок 1).

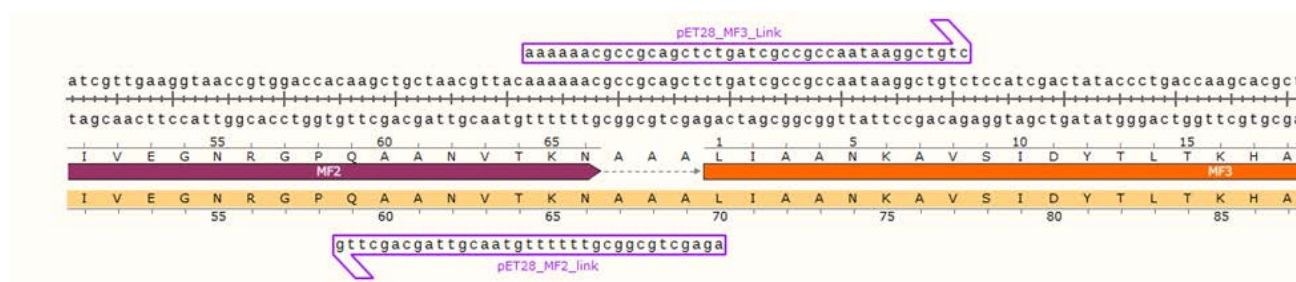


Рисунок 1 – Визуализация участка линкера химерного белка MF2/MF3

Рекомбинантный MF2/MF3 был экспрессирован в трансформированных клетках *E. coli*. Наблюдаемая молекулярная масса полипептида составила 25кДа (рисунок 2), что соответствовало теоретически рассчитанной. Полученный химерный белок сохранял индуцирующую активность.

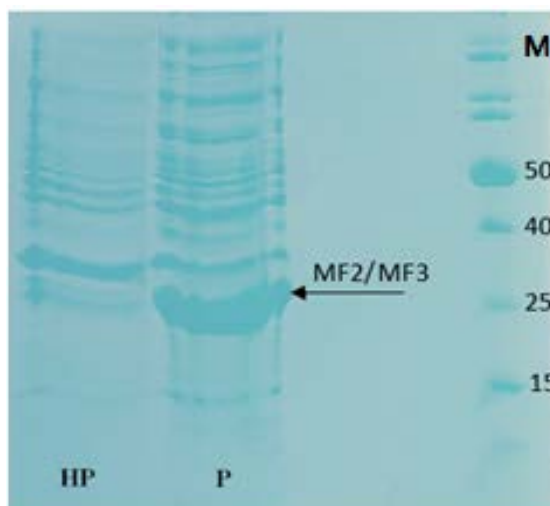


Рисунок 2 – SDS-ПААГ-электрофореграмма белков растворимой (Р) и нерастворимой (НР) фракции лизата клеток *Escherichia coli* Rosetta pET28-MF2/MF3.
М — маркер молекулярных масс (Bench-Mark™ Unstained Protein Ladder, «Thermo Fisher Scientific», США)

Данные, приведенные на рисунке 3, свидетельствуют о том, что защитная активность полученного химерного белка MF2/MF3 в патосистеме «табак-ВТМ» достоверно превосходила активность каждого из белков.

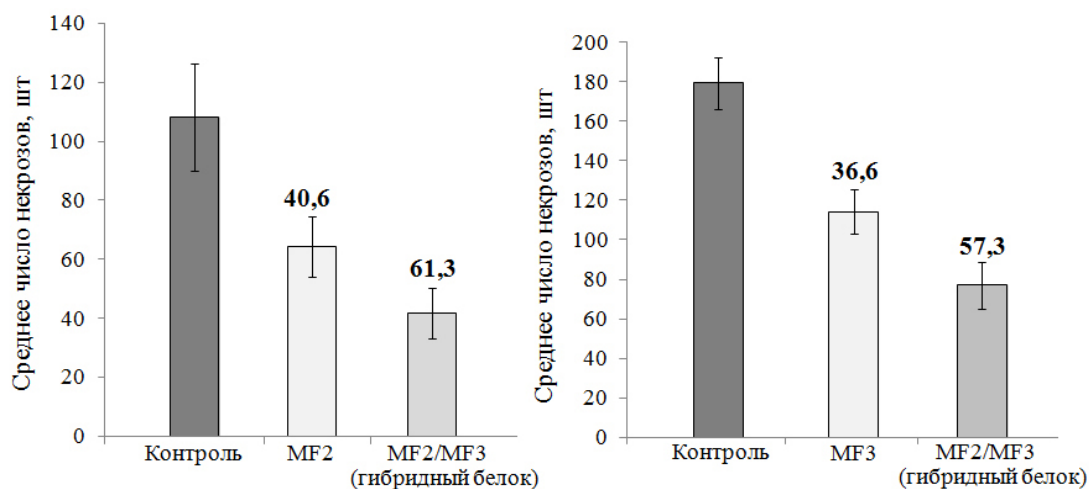


Рисунок 3 – Сравнительная защитная активность химерного белка и отдельных белков: некрозообразование на листьях табака (Xanthi NN), зараженных вирусом табачной мозаики, после прединакуляционной обработки водой (контроль), элиситорами MF2, MF3 и химерным белком MF2/MF3.

Цифры над столбцами — степень подавления некрозообразования в процентах от не обработанного препаратами контроля ($n = 10$, $M \pm SE$).

В каждом из опытов отличия от контроля и между обработками достоверны при $p \leq 0,05$.

В последующих экспериментах при сравнении защитного действия химерного белка MF2/MF3 и смеси MF2+MF3 на противоположных половинках листьев табака было

установлено, что полученный химерный белок обладает такой же целевой активностью, что и смесь исходных белков (рисунок 4).

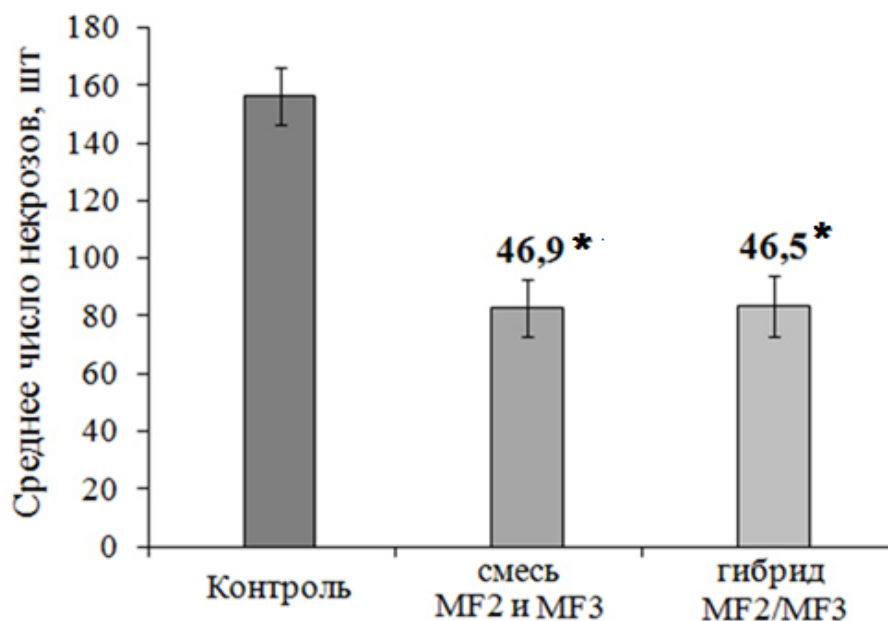


Рисунок 4 – Уровень некрозообразования на листьях табака (Xanthi NN), зараженных ВТМ после прединокуляционной обработки их водой (контроль), смесью двух белков-индукторов и их гибридом

*Цифры над столбцами — см. пояснение к рис. 3.

Результаты изучения защитного эффекта химерного белка MF2/MF3 и смеси MF2 с MF3 против патогенного гриба *S. cucumerinum* (таблица 2) показали, что как смесевой препарат, так и химерный белок по своей защитной активности превосходит каждый из индивидуальных белков (Ерохин и др., 2024).

Поскольку структура MF2/MF3 обеспечивает пространственное разобщение полноценных белков и возможность свободного вращения этих доменов полученного химерного белка, при определенном допущении его можно рассматривать как препарат, объединяющий два действующих компонента. Для оценки такого препарата может быть применен критерий Лимпела, позволяющий установить превосходит ли защитная эффективность данного химерного белка аддитивный эффект, ожидаемый при совместном применении индивидуальных белков. Полученный в эксперименте с обработкой растений огурца эффект подавления симптомов болезни (E_T) химерным белком (70,7%) достоверно превышал расчетный аддитивный эффект ($E_e = 61,4\%$), ожидаемый от суммы эффектов каждого из белков-индукторов при их раздельном применении. Полученные данные продемонстрировали синергетический характер защитного действия, которое могло быть

обусловлено различиями в механизмах действия каждого из белков. Защитный эффект смеси белков MF2 и MF3 в этой патосистеме был сопоставим с их аддитивным действием.

Таблица 2 – Степень развития оливковой пятнистости огурца (с. Феникс) на растениях, обработанных интактными белками MF2 и MF3, их смесью или химерным белком MF2/MF3 перед заражением листьев грибом *C. cucumerinum**

Вариант обработки	Степень развития болезни (%)***	Степень подавления болезни (E _г , % от контроля)	Уровень аддитивного эффекта (E _е ,%)
	M ± SD		
Вода (контроль)	82 ± 6	0,0 ± 7,3	—
MF3 (нативный белок)	48 ± 6	41,5 ± 7,3	—
MF2 (нативный белок)	54 ± 7	34,1 ± 8,5	—
Смесь белков MF3 и MF2	31± 3	62,2 ± 3,7	61.4
Химерный белок MF3/MF2	24 ± 2	70,7** ± 2,4	61.4**

*Для оценки возможного синергетического действия белков-индукторов использовали критерий Лимпела: $E_g \geq E_e$ при $p \leq 0,05$, где E_g – полученный эффект (%), E_e – ожидаемый аддитивный эффект (%) от применения двух тестируемых веществ (E_1 и E_2), рассчитанный по формуле $(E_1 + E_2) - E_1 \times E_2 / 100$.

** Отличия E_g от E_e значимы при ($p = 0,02$).

***Среднее для трех опытов (для определения значимости различия в каждом использовали U-тест Манна-Уитни).

Глава 4. Изучение структурно-функциональных взаимосвязей в АЦ-MF3

Цели данного этапа работы состояли в получении мутантных форм MF3 и их скрининге, направленном на поиск мутаций в АЦ-MF3, приводящих к потере или существенному снижению защитной активности данного белка. Для анализа вторичной структуры активного центра АЦ-MF3 применяли как расчетные методы (рисунок 5А), так и метод множественного выравнивания целевой последовательности с последовательностями гомологичных белков с известными вторичными структурами (рисунок 5Б). Полученную консенсусную вторичную структуру АЦ-MF3, представленную на рисунке 5В, использовали для отбора мутантов и для проверки защитной активности. Было получено десять мутантов MF3 с случайно отобранными точечными заменами соответствующих аминокислотных остатков на аланин (G51A, D57A, L58A, V60A, V62A, P64A, E65A, D66A, Y68A, G69A) и один мутант с делецией предполагаемой области альфа-спирали (ahD) (рисунок 5Г).

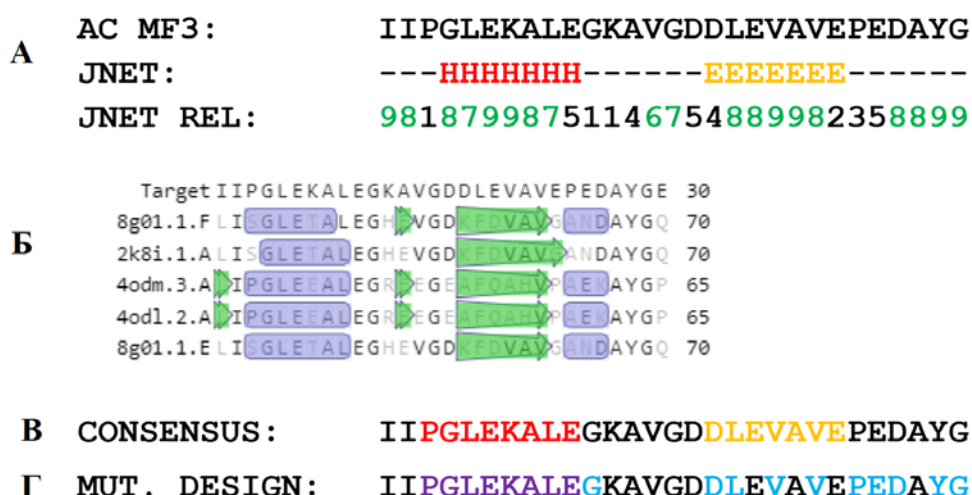


Рисунок 5– Дизайн мутантных MF3-белков с модификациями в АЦ-MF3

А – Предполагаемая вторичная структура АЦ-MF3. Б – Множественное выравнивание целевой последовательности с последовательностями гомологичных белков с известными вторичными структурами. В – Консенсусная последовательность АЦ-MF3. Красным цветом обозначена предполагаемая область альфа-спирали, светло-коричневым цветом промаркирован предполагаемый участок бета-листа. Г – Произведенные мутации в АЦ-MF3. Фиолетовым цветом обозначена область делеции предполагаемой альфа-спирали, голубым цветом - замены аминокислотных остатков на аланин.

Чтобы оценить способность полученных мутантов влиять на развитие ИУ растений были проведены эксперименты, в которых защитный эффект мутантных форм MF3 оценивали, сравнивая снижение числа некрозов в процентах от контроля, на обработанных ими листьях табака после заражения ВТМ, с аналогичным эффектом от прединокуляционного нанесения на листья исходного белка дикого типа. В результате было обнаружено, что целевая активность всех полученных мутантов, за исключением G69A, ниже, чем у MF3, а максимальное снижение защитной активности происходило при использовании в биотестах мутантной формы V62A с заменой валина на аланин в положении 62 (рисунок 6). Нанесение этого мутанта на листья табака перед инокуляцией ВТМ приводило к почти трехкратному увеличению количества некрозов по сравнению с MF3 дикого типа. Остальные мутанты были разделены на три группы в соответствии с уровнем их защитной активности, первая из которых включала G51A, V60A и L58A, содержащие соответствующие замены аланина на глицин, валин и лейцин, а также делеционный мутант ahD. Эти мутанты показали примерно в два раза более низкую целевую активность, чем MF3 дикого типа (Erokhin et al., 2023).

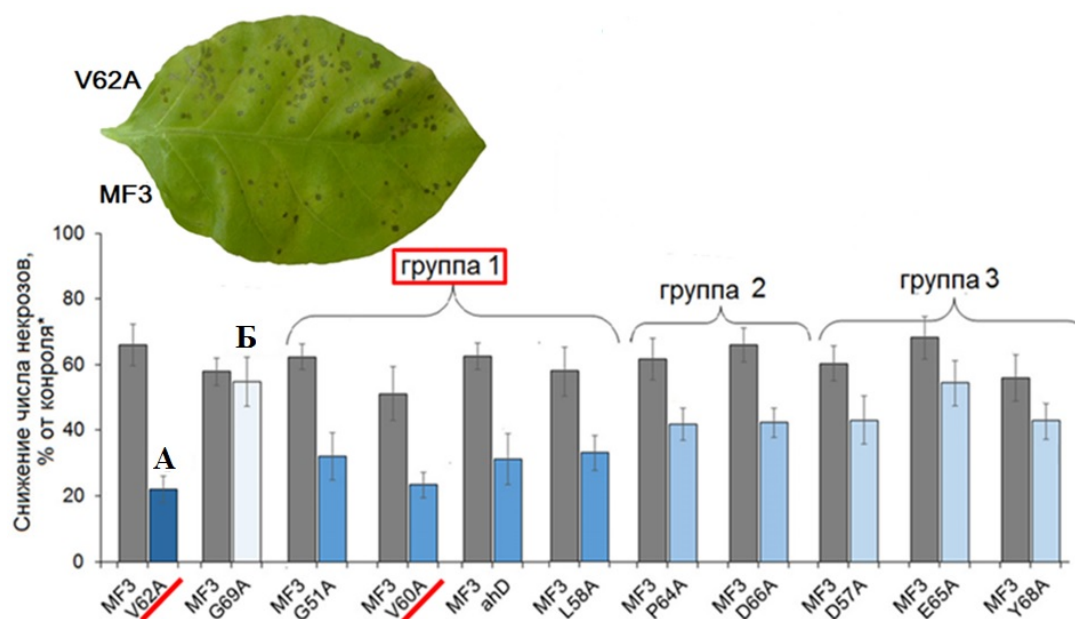


Рисунок 6 – Сравнение влияния белка MF3 и его мутантов на образование некрозов на листьях табака, инокулированных ВТМ

А - наименее активный мутант; Б - мутант, не изменивший активность.

Среднее для 3 экспериментов, 10 листьев на вариант в каждом. Y-погрешности показывают стандартную ошибку среднего при $p \leq 0,05$

*Контроль – листья, обработанные перед инокуляцией дистиллированной водой.

Поскольку белок MF3, как было показано ранее, индуцирует неспецифическую ИУ различных растений не только к вирусам, но и к патогенным грибам (Шумилина, 2007), защитная активность двух наименее активных против ВТМ мутантов с заменой валинов на аланины в позициях 60 и 62 была протестирована в вегетационных экспериментах с использованием патосистемы «огурец – *C. cucumerinum*».

Обработка интактным белком MF3 (рисунок 7) в концентрации 100 мкг/мл приводила к значительному уменьшению степени развития болезни (на 76% по сравнению с контролем). В то же время, обработка растений мутантными белками V60A и V62A не приводила к статистически достоверному снижению степени развития заболевания.

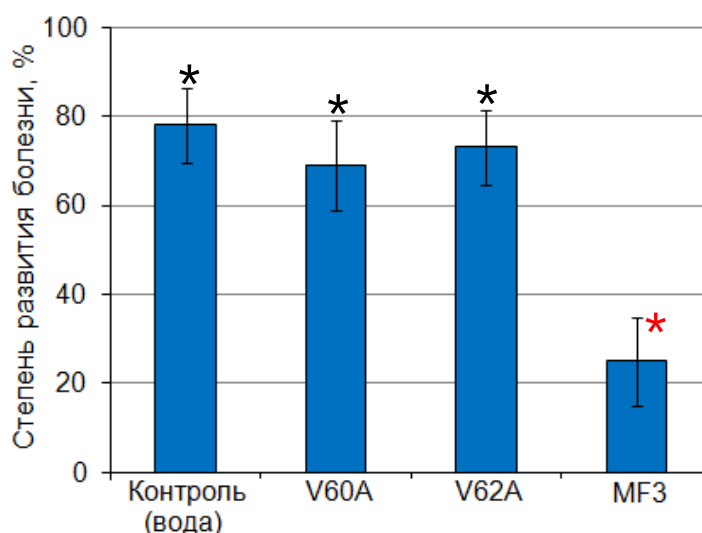


Рисунок 7 – Сравнительная защитная активность MF3 и его мутантных форм V60A и V62A против оливковой пятнистости огурца (*C. cucumerinum*)

Приведены средние значения для трех экспериментов, Y-погрешности показывают SD ($p \leq 0,05$).

Для определения значимости различия в каждом из экспериментов использовали U-тест Манна-Уитни:

*различия между вариантами недостоверны ($U > U_{\text{крит}}$ при $p \leq 0,05$);

*различия между вариантами значимы ($U < U_{\text{крит}}$ при $p \leq 0,05$).

Таким образом, замены V60 и V62 в АЦ-MF3 вызывали существенное снижение способности MF3 индуцировать устойчивость не только растений табака к ВТМ, но и к полной потери индуцирующей активности в случае патогенного для огурца гриба *C. cucumerinum*.

На рисунке 8 представлена локализация аминокислотных остатков с мутациями, приводивших к наиболее сильному снижению защитных свойств MF3: Gly 51, Leu 58, Val 60, Val 62. В результате проведенного анализа было выявлено, что эти аминокислотные остатки, а также альфа-спираль, делеция которой также приводила к заметному снижению защитного эффекта MF3 (см. ahD на рис. 6), расположены близко друг к другу и находятся на одной стороне белковой глобулы, то есть образуют компактную зону. В связи с тем, что снижение защитных свойств MF3 может быть связано с уменьшением эффективности его связывания с соответствующим клеточным рецептором полученные данные позволяют предположить, что рецептор-связывающая зона MF3 у данного индуктора локализована в его домене, ответственном за защитную активность.

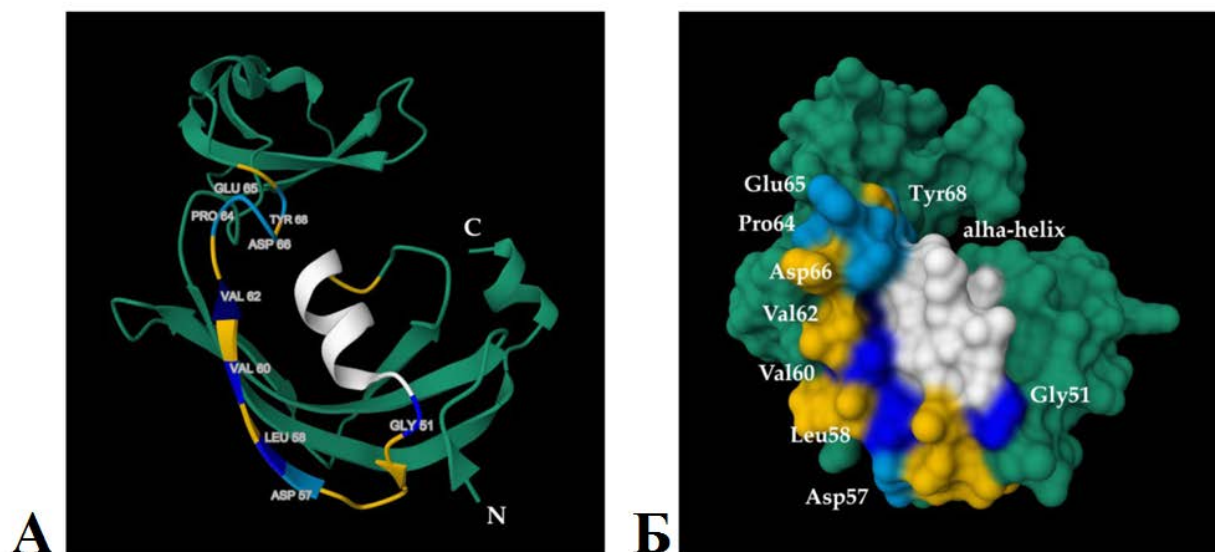


Рисунок 8 – Пространственное распределение замещенных аминокислот в молекуле MF3, смоделированное с помощью программных пакетов RCSB PDB и Mol* 3D Viewer
 А – Элементы 2D-структуры в 3D-модели MF3;

Б – Модель поверхности молекулы MF3. Альфа-спираль отмечена белым цветом. Аминокислоты, связанные с <1,5-, 2- и >2,5-кратным снижением индуцирующей активности белка, обозначены светло-голубым, синим и темно-синим цветом (Val62) соответственно. Остальные части области АЦ-MF3 и белковой молекулы обозначены, соответственно, желтым и зеленым цветом.

Глава 5. Изучение влияния MF2 и MF3 на профили экспрессии генов обработанных растений

Влияние MF2 на экспрессию генов растений табака

Сравнительный анализ динамики накопления транскриптов ключевых генов ИУ в обработанных MF2 листьях табака, по сравнению с контрольными (необработанными) растениями, выявил повышение экспрессии гена *pdf1.2*, представляющего собой маркерный ген ISR, чувствительный к уровням эндогенного этилена и жасмоновой кислоты (рисунок 9А) (Erokhin et al., 2024). Максимальное усиление экспрессии этого гена (в 2,5 раза по сравнению с контрольными растениями) наблюдалось в обработанных MF2 («локальных») листьях через 12 ч после обработки; в случае обработки MF2 с последующей инокуляцией ВТМ уровень экспрессии *pdf1.2* был в 4,8 раз выше в обработанных растениях. В верхних («системных») листьях изменений экспрессии гена *pdf1.2* не наблюдалось.

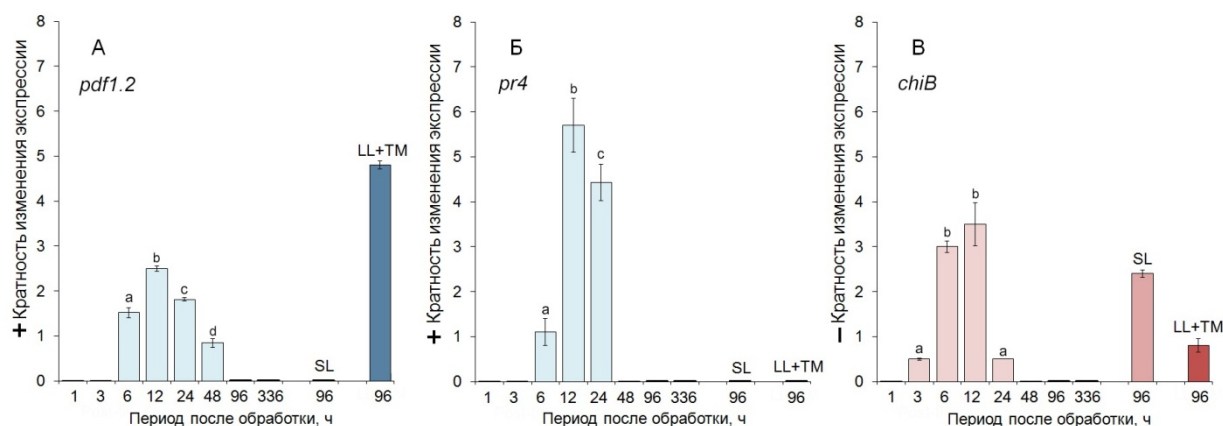


Рисунок 9 – Сравнительный анализ динамики экспрессии ключевых генов ИУ *pdf1.2*, *pr4* и *chiB* в растениях табака

Голубым цветом обозначен повышенный, а розовым – пониженный уровень экспрессии соответствующего гена в опыте относительно контроля (обработка водой). Бледно-голубые и бледно-розовые столбцы в левой части соответствующей диаграммы характеризуют динамику накопления транскриптов в «локальных» листьях табака после воздействия MF2.

SL – Уровень экспрессии в «системных» листьях. LL + TMV – Уровень экспрессии в «локальных» листьях, обработанных MF2, а затем инокулированных BTM.

Различные буквы над столбцами обозначают статистически значимую разницу ($p \leq 0,05$) между значениями кратности изменений.

Уровень экспрессии еще одного маркера ISR, гена *pr4*, достигал максимума через 12 ч после обработки MF2 и был выше в 5,7 раз в обработанных растениях по сравнению с контрольными растениями (рисунок 9Б). Интересно, что уровень экспрессии другого маркера ISR, гена *chiB*, был снижен в 3,5 раза в обработанных MF2 растениях, по сравнению с контрольными, с максимальным снижением через 12 ч после обработки MF2 (рисунок 9В). В «системных» листьях уровень экспрессии *chiB* был снижен в 2,4 раза по сравнению с контрольными растениями, в то время как обработка MF2 с последующей инокуляцией BTM практически не приводила к изменению экспрессии данного гена в «локальных» листьях табака (рисунок 9В). Уровень экспрессии генов, связанных с SAR, оставался либо неизменным в обработанных индуктором растениях по сравнению с контрольными растениями, либо фиксировалось его снижение в некоторых временных точках. Усиление экспрессии маркерных генов ISR *pdf1.2* и *pr4* после обработки MF2 и отсутствие повышенной экспрессии генов, ассоциированных с SAR, позволяет предположить, что под воздействием данного белкового индуктора в растениях табака происходит развитие ISR.

Накопление активных форм кислорода с последующим активированием антиоксидантного комплекса – один из типичных ранних защитных ответов растений. В обработанных MF2 листьях табака сравнительный анализ динамики накопления транскриптов генов, представляющих собой наиболее характерные для табака антиоксидантные ферменты супероксиддисмутазы (*sod*), каталазы (*cat*) и

аскорбатпероксидазы (*арх*), показал, что только уровень экспрессии гена *sod* был повышен во всех вариантах эксперимента (рисунок 10).

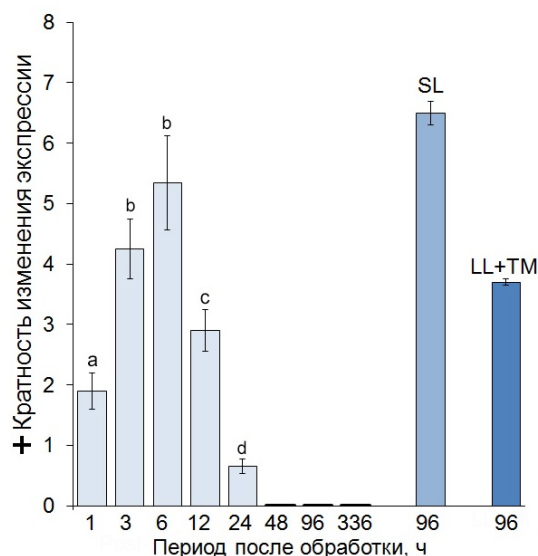


Рисунок 10 – Изменение уровня экспрессии гена супероксиддисмутазы (*sod*) в листьях табака, вызванное воздействиями MF2 и MF2 + BTM

Бледно-голубые в левой части диаграммы характеризуют динамику экспрессии *sod* в «локальных» листьях табака после воздействия MF2. SL и LL + TMV – см. пояснение к рисунку 9.

Различные буквы над столбцами обозначают статистически значимую разницу ($p \leq 0,05$) между значениями кратности изменений.

Так, уровень экспрессии *sod* был повышен (максимально в 5,4 раза через 6 ч после обработки по сравнению с контрольными растениями) не только в обработанных MF2 «локальных» листьях, но и в «системных» листьях (максимально в 6,5 раза через 4 дня после обработки «локальных» листьев по сравнению с контрольными растениями). В случае пост-инокуляции BTM наблюдалось 3,7-кратное усиление экспрессии *sod* по сравнению с контрольными растениями, что может свидетельствовать об участии этого фермента и в защитном ответе растений табака от инфицирования BTM. Уровень экспрессии гена *cat* был 1,9- и 1,5-кратно снижен через 3 и 6 ч после обработки «локальных» листьев MF2 по сравнению с контрольными растениями, соответственно. Анализ экспрессии гена *арх* не выявил существенных изменений ее уровня при всех условиях обработки. Таким образом, повышение экспрессии гена супероксиддисмутазы, наблюдавшееся во всех вариантах эксперимента и особенно повышение уровня экспрессии *sod* в «системных» листьях, демонстрирует важную роль этого фермента в иммунном ответе, индуцированном в табаке обработкой MF2.

Проведенный для проверки данных о экспрессии *sod* биохимический анализ образцов «локальных» листьев через 6 и 24 ч после их обработки MF2 выявил усиление в них окисления адреналина на 20 и 69%, соответственно, по сравнению с контрольными

(необработанными) листьями (Erokhin et al., 2024), что свидетельствует об увеличении содержания супероксида в обработанных листьях по сравнению с контролем (рисунок 11А). В то же время, добавление супероксиддисмутазы в реакционную смесь не приводило какой-либо существенной разнице между обработанными и контрольными образцами, что подтверждало тот факт, что эндогенное накопление супероксида было индуцировано обработкой MF2 (рисунок 11Б).

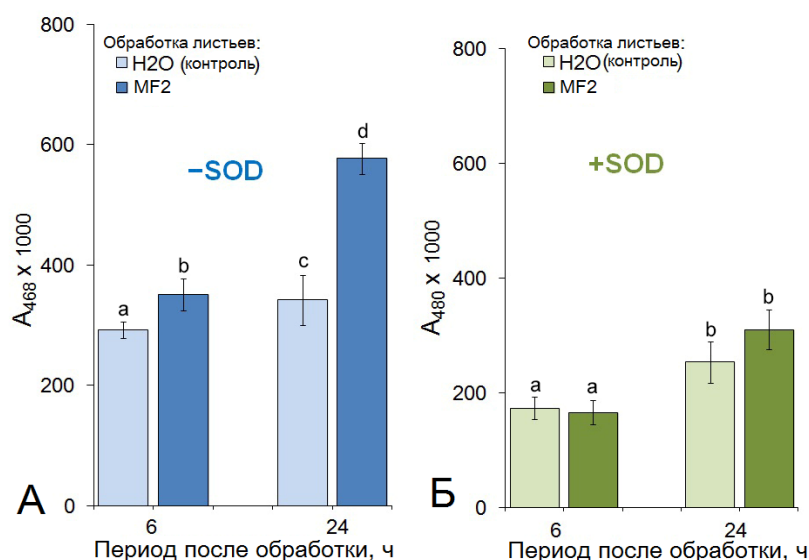


Рисунок 11 – Окисление адреналина в диффузатах листьев табака, обработанных MF2 (А) в отсутствие и (Б) в присутствии супероксиддисмутазы, добавленной в реакционную смесь

Разные буквы над столбиками указывают на значимое различие при $p \leq 0,05$, в то время как одинаковые буквы указывают на статистически незначимое различие.

Анализ данных проведенного мРНК-секвенирования образцов табака через 6 ч после обработки MF2 показал, что список 40 наиболее сильно дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) включает ряд генов, реагирующих на абиотический стресс, таких как транспортер сахара ERD6 (LOC107788102) или E3 убиквитин-протеинлигаза RGLG1 (LOC107806658), а также элементы, связанные с защитными реакциями, такие как факторы транскрипции WRKY (LOC107829848, LOC107832371), PEARL11-подобный белок переноса липидов 1 (LOC107792217) или ассоциированный с устойчивостью к болезням белок RPP1 (LOC107815900). Для идентификации биологических процессов, на которые могла повлиять обработка растений MF2, был проведен анализ избыточной репрезентативности (АИР) терминов геной онтологии, который, с одной стороны, не выявил статистически значимых результатов для ДЭГ с высоким уровнем экспрессии ($\log_2FC \geq 2$); с другой стороны, для полного списка ДЭГ ($\log_2FC \geq 1$) показал чрезвычайно широкий и поэтому сложно интерпретируемый спектр биологических процессов, преимущественно

ассоциированных с клеточным ядром, что возможно свидетельствует об участии эпигенетических механизмов в ответе растений табака на обработку MF2. ДЭГ со средним уровнем экспрессии ($\log_2FC \geq 1.5$) продемонстрировали значительное обогащение терминами генной онтологии, связанными с защитными реакциями растений, что, наряду с присутствием таких генов в списке 40 наиболее сильно экспрессируемых, в целом подтверждает индукторную природу MF2 на транскриптомном уровне.

Для идентификации предполагаемых наиболее интенсивных биологических процессов, ассоциированных с ДЭГ табака с высокой экспрессией ($\log_2FC \geq 2$), где использование АИР не показало статистически значимых результатов, был проведен дополнительный АИР для ортологов из арабидопсиса и сравнение его результатов с результатами АИР после обработки арабидопсиса другими индукторами МАРМ-типа (flg22, OGs и OMVs), к которому также принадлежит MF2 (рисунок 12).

GO Information				CM				ID:597192585.1				ID:355003280.1				ID:979953262.1				ID:517638616.1			
No	GO Term	Onto	Description	1	2	3	4	Ajusted Pvalue	Num	Ajusted Pvalue	Num	Ajusted Pvalue	Num	Ajusted Pvalue	Num	Ajusted Pvalue	Num	Ajusted Pvalue	Num	Ajusted Pvalue	Num	Ajusted Pvalue	Num
1	GO:0050794	P	regulation of cellular process					0.037	49	6.3e-09	481	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
2	GO:0006952	P	defense response					0.037	22	1.7e-52	325	3.8e-19	77	2e-42	156	---	---	---	---	---	---	---	---
3	GO:0071482	P	cellular response to light stimulus					0.037	6	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
4	GO:0071478	P	cellular response to radiation					0.037	6	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
5	GO:0009639	P	response to red or far red light					0.037	8	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
6	GO:1901700	P	response to oxygen-containing compound					0.037	22	1.8e-38	290	8.9e-11	61	4.9e-20	114	---	---	---	---	---	---	---	---
7	GO:0043531	F	ADP binding					0.014	7	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
8	GO:0005488	F	binding					0.021	95	2.7e-12	1074	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
9	GO:0008092	F	cytoskeletal protein binding					0.021	8	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
10	GO:0001071	F	nucleic acid binding transcription factor activity					0.034	22	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
11	GO:0003700	F	transcription factor activity, sequence-specific DNA binding					0.034	22	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
12	GO:0003779	F	actin binding					0.037	5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
13	GO:0044464	C	cell part					0.014	153	9.8e-11	1809	0.011	340	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
14	GO:0005623	C	cell					0.014	153	9.8e-11	1809	0.011	340	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
15	GO:0050896	P	response to stimulus					---	---	3.6e-79	876	2e-38	211	1.3e-44	344	---	---	---	---	---	---	---	---
16	GO:0006950	P	response to stress					---	---	7.4e-67	577	2e-38	156	1.7e-40	237	---	---	---	---	---	---	---	---
17	GO:0042221	P	response to chemical					---	---	8e-43	443	1.8e-20	110	1.8e-22	172	---	---	---	---	---	---	---	---
18	GO:0044699	P	single-organism process					---	---	4.1e-37	1006	2e-12	206	4e-16	361	---	---	---	---	---	---	---	---
19	GO:0051707	P	response to other organism					---	---	2.9e-36	243	1.2e-24	76	2.7e-37	129	---	---	---	---	---	---	---	---
20	GO:0043207	P	response to external biotic stimulus					---	---	3.2e-36	243	1.2e-24	76	2.7e-37	129	---	---	---	---	---	---	---	---

GO Information				CM				ID:597192585.1				ID:550359077.1				ID:597788497.1				ID:999399222.1			
No	GO Term	Onto	Description	1	2	3	4	Ajusted Pvalue	Num	Ajusted Pvalue	Num	Ajusted Pvalue	Num	Ajusted Pvalue	Num	Ajusted Pvalue	Num	Ajusted Pvalue	Num	Ajusted Pvalue	Num	Ajusted Pvalue	Num
1	GO:0050794	P	regulation of cellular process					0.037	49	0.00034	202	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
2	GO:0006952	P	defense response					0.037	22	6.2e-44	176	4.4e-12	32	1.2e-25	84	---	---	---	---	---	---	---	---
3	GO:0071482	P	cellular response to light stimulus					0.037	6	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
4	GO:0071478	P	cellular response to radiation					0.037	6	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
5	GO:0009639	P	response to red or far red light					0.037	8	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
6	GO:1901700	P	response to oxygen-containing compound					0.037	22	2.3e-34	158	1.2e-05	22	1.2e-10	57	---	---	---	---	---	---	---	---
7	GO:0043531	F	ADP binding					0.014	7	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
8	GO:0005488	F	binding					0.021	95	1.7e-05	451	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
9	GO:0008092	F	cytoskeletal protein binding					0.021	8	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
10	GO:0001071	F	nucleic acid binding transcription factor activity					0.034	22	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
11	GO:0003700	F	transcription factor activity, sequence-specific DNA binding					0.034	22	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
12	GO:0003779	F	actin binding					0.037	5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
13	GO:0044464	C	cell part					0.014	153	9e-06	765	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
14	GO:0005623	C	cell					0.014	153	9e-06	765	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
15	GO:0050896	P	response to stimulus					---	---	4e-69	444	4.5e-19	74	7.7e-25	174	---	---	---	---	---	---	---	---
16	GO:0006950	P	response to stress					---	---	1.4e-59	306	2.2e-21	60	2.6e-22	120	---	---	---	---	---	---	---	---
17	GO:0043207	P	response to external biotic stimulus					---	---	4.2e-37	143	4.4e-13	30	4.7e-23	70	---	---	---	---	---	---	---	---
18	GO:0051707	P	response to other organism					---	---	4.2e-37	143	4.4e-13	30	4.7e-23	70	---	---	---	---	---	---	---	---
19	GO:0042221	P	response to chemical					---	---	1.3e-36	229	3.9e-08	36	4.1e-15	93	---	---	---	---	---	---	---	---
20	GO:0009607	P	response to biotic stimulus					---	---	2.3e-36	144	8.4e-13	30	2.3e-22	70	---	---	---	---	---	---	---	---

Рисунок 12 – Сравнение обогащенных терминов генной онтологии для гиперэкспрессированных после обработки MF2 ортологов ДЭГ табака в арабидопсисе с другими распространенными индукторами МАРМ-типа

Вверху: сокращенный диапазон сравниваемых ДЭГ для индукторов, слева направо: MF2, flg22, OG и OMV. *Внизу:* полный диапазон сравниваемых ДЭГ для индукторов, слева направо: MF2, flg22, OG и OMV. Цветная модель представляет собой относительную статистическую значимость обогащенных терминов генной онтологии в четырех обработках индукторами («1» для MF2, «2» для flg22, «3» для OG, «4» для OMV); высокосignификантные результаты обозначены красным, умеренно значимые результаты обозначены желтым, а результаты, не прошедшие порог «FDR < 0,05», обозначены серым.

Результаты проведенного сравнения показали, что обработка MF2 генерирует уникальные термины генной онтологии, все из которых связаны с реакциями на свет: «клеточная реакция на световой стимул» (GO: 0071482), «клеточная реакция на излучение» (GO: 0071478) и «реакция на красный и дальний красный свет» (GO: 0009639). Эти результаты свидетельствуют о том, что индуцирование у растений реакции на свет может быть специфичным механизмом действия MF2, отличающим его от других индукторов МАРР-типа.

В целом, результаты исследований профилей экспрессии генов в обработанных MF2 растениях (Erokhin et al., 2024) указывают на ярко выраженное влияние этого индуктора на экзом табака, которое проявляется в активации генов, связанных с ответом растения на биотический и абиотический стрессы.

Изучение влияния MF3 на экспрессию в обработанных растениях генов, ассоциированных с двумя типами системной устойчивости

В отличие от результатов, полученных в экспериментах с MF2, опыты по изучению динамики представленности транскриптов ключевых генов ИУ табака не выявили непосредственного влияния MF3 на уровень экспрессии этих генов в обработанных им растениях. Для изучения возможного прайминга как альтернативного непосредственному влиянию на транскриптом механизма действия MF3 был проведен сравнительный анализ экспрессии некоторых ключевых генов ИУ табака и пшеницы в растениях, обработанных MF3, зараженных двумя патогенными грибами и ВТМ, а также зараженными этими патогенами после обработки растений-хозяев MF3 (рисунок 13).

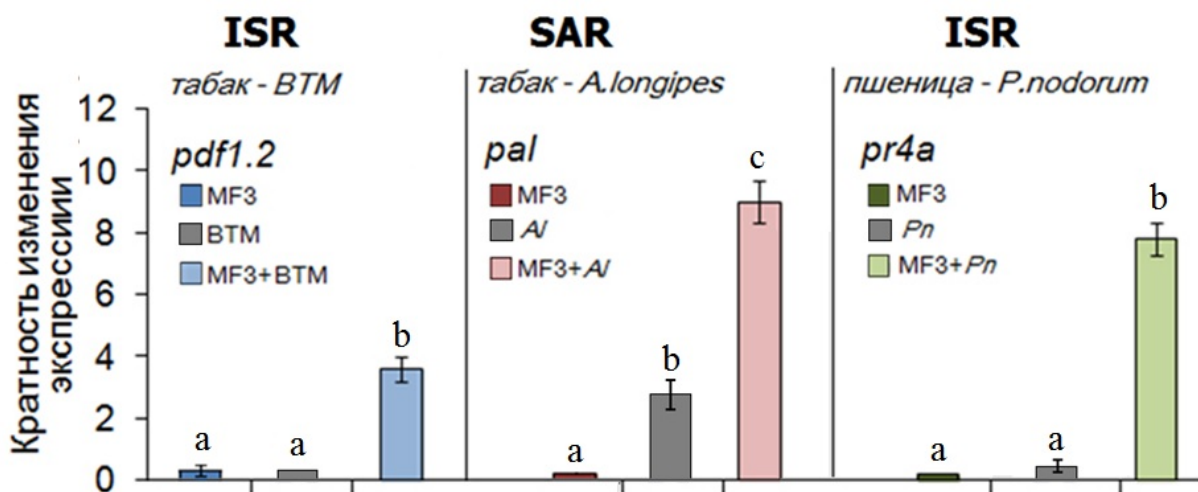


Рисунок 13 – Изменение уровня экспрессии некоторых маркерных генов ИУ растений после обработки MF3 и последующего контакта с патогенами или в его отсутствие. Различные буквы над столбцами обозначают статистически значимую разницу ($p < 0,01$) между значениями кратности изменений.

Полученные данные продемонстрировали усиление уровня экспрессии в обработанных растениях табака ISR-маркера *pdf1.2* после инокуляции BTM, который сам активирует ИУ по типу SAR и не активирует ISR, а также SAR-маркера *pal* после заражения возбудителем бурой пятнистости табака *A. longipes*, инокуляция которым без предварительной обработки MF3 также усиливала экспрессию *pal*, но на значительно более низком уровне. При этом в растениях, обработанных MF3, но не контактировавших после этого с соответствующими патогенами (интактные растения), экспрессия обоих генов оставалась на уровне контроля. Анализ экспрессии ключевых генов ИУ пшеницы в обработанных MF3 растениях пшеницы также не выявил существенного изменения уровня их экспрессии по сравнению с необработанными растениями, но показал усиление экспрессии ISR-маркера *pr4a* после заражения обработанных MF3 растений *P. nodorum*, который сам активирует ИУ по типу SAR. Таким образом, полученные данные позволяют говорить о прайминге ряда защитных генов, как о возможном механизме защитного действия MF3, по крайней мере, в исследованных патосистемах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. С использованием двух патосистем («табак–BTM» и «огурец – *C. cucumerinum*») показано, что полученный химерный белок MF2/MF3 имеет такую же защитную активность, как смесь исходных белков, при этом его активность превышает активность каждого из белков по отдельности.
2. С использованием двух патосистем установлена определяющая роль валинов в положениях 60 и 62 для реализации защитной активности MF3. Замены V60A и V62A вызывают значительное (приблизительно в 3 и в 2 раза) снижение защитного эффекта данного белка против BTM и полную потерю защитной активности против возбудителя оливковой пятнистости огурца (*C. cucumerinum*).
3. Показано, что обработка белком-индуктором MF2 усиливает в листьях табака экспрессию *pdf1.2* и *pr4* – маркерных генов индуцированной системной устойчивости (ISR) растений.
4. Установлено, что под влиянием MF2 в растениях табака происходит локальное и системное повышение уровня экспрессии супероксиддисмутазы, а также рост концентрации эндогенного супероксида в обработанных листьях.
5. Показано, что обработка MF2 растений табака приводит к усилению экспрессии арсенала защитных генов и обогащению терминов генной онтологии, связанных с реакциями растения на свет, для гомологичных генов арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*).
6. Усиление экспрессии ряда ключевых генов ИУ *pdf1.2*, *pal* в растениях табака и *pr4a* в растениях пшеницы после контакта обработанных MF3 растений с патогенами позволяет предположить, что прайминг является одним из вероятных механизмов его действия.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК РФ:

1. Erokhin, D. Some Structural Elements of Bacterial Protein MF3 That Influence Its Ability to Induce Plant Resistance to Fungi, Viruses, and Other Plant Pathogens / D. Erokhin, S. B. Popletaeva, I. G. Sinelnikov [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24, No. 22. – P. 16374.
2. Erokhin, D. Transcriptomic Study of *Nicotiana tabacum* Treated with the Bacterial Protein CspD Reveals Some Specific Abiotic Stress Responses / D. Erokhin, D. Baranova, K. Sergeeva [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2024. – Vol. 25, No. 23. – P. 13015.
3. Ерохин, Д.В. Получение химерного белка-элиситора MF2/MF3 и оценка его защитной активности против вируса табачной мозаики / Д. В. Ерохин, И. Г. Синельников, И. А. Шашков [и др.] // *Сельскохозяйственная биология*. – 2024. – Т. 59, № 3. – С. 446-459.

В прочих изданиях:

4. Ерохин, Д.В. Бактериальный белок MF3: возможные механизмы его защитного действия против вируса мозаики табака и рост-стимулирующих эффектов / Д.В.Ерохин, Л.А. Щербакова, Д.Я. Эммер [и др.] // *Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов: Материалы VIII Пущинской конференции, Пущино, 06–08 декабря 2022 года*. – Москва, Россия: ООО «Издательство ГЕОС», 2022. – С. 130-132.
5. Popletaeva, S. B. Comparison of the Protective Activity of Elicitor Proteins MF2 and MF3 Applied Individually or in Combination Against Tobacco Mosaic Virus on Tobacco Leaves / S. B. Popletaeva, D. V. Erokhin, V. G. Dzhevakhia // *Agriculture Digitalization and Organic Production: Proceedings of the Third International Conference on Agriculture Digitalization and Organic Production (ADOP 2023)*, St. Petersburg, 05–07 июня 2023 года. Vol. 362. – St. Petersburg: Springer Nature Singapore, 2023. – P. 225-234.
6. Ерохин, Д.В. Подходы к изучению механизмов защитного действия белка-индуктора из *Pseudomonas fluorescens* / Д. В. Ерохин, Д. Я. Эммер, И. Г. Синельников [и др.] // *Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: Материалы XIII Международной научной конференции, Минск, 06–09 июня 2023 года*. – Минск. Республика Беларусь: Беларуская навука, 2023. – С. 260-261.
7. Ерохин, Д. В. Ферменты в механизмах индуцированной устойчивости растений / Д. В. Ерохин // *Биокатализ. Фундаментальные исследования и применения: Тезисы докладов 13-ой Международной научной конференции, Суздаль, 25–29 июня 2023 года*. – Москва, Россия: ООО «АДМИРАЛ ПРИНТ», 2023. – С. 77.
8. Джавахия, В.Г. Изучение молекулярных механизмов защитного действия белка MF3 из *Pseudomonas fluorescens*, индуцирующего устойчивость растений к болезням / В.Г. Джавахия, Д.В. Ерохин, С.Б. Поплетаева // *Eurasian Journal of Applied Biotechnology*. – 2024. –Vol. 3S. – P. 83.
9. Ерохин, Д.В. Изучение влияния белка-индуктора из *Bacillus thuringiensis* на транскриптом табака. / Д. В. Ерохин, Л. А. Щербакова, В. Г. Джавахия // *Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: Материалы XIV Международной научной конференции, Минск, 02–07 июня 2025 года*. – Минск. Республика Беларусь: Беларуская навука, 2025. – С. 107-109.