

УДК 577.2

ЭКСПРЕССИЯ КЛАСТЕРНЫХ ГЕНОВ ЗАЩИТЫ В ОТВЕТ НА ВИРУСНУЮ ИНФЕКЦИЮ В ДВУХ ЭКОТИПАХ АРАБИДОПСИСА (ARABIDOPSIS THALIANA)

^{1,2}Постникова О.А., ¹Минакова Н.Ю., ¹Ширшикова Г.Н.,
²Немчинов Л.Г., ^{1,2}Бутанаев А.М.

¹*Институт фундаментальных проблем биологии, Российская академия наук. Пушкино;*
²*USDA/ARS, Plant Sciences Institute, Molecular Plant Pathology Laboratory, Beltsville MD 20705, USA, e-mail: boutanaev@mail.ru*

Значительную часть эукариотического генома составляют кластеры функционально-родственных совместно активирующихся генов. Существует немало данных о специфической активности кластерных генов в отдельных органах и тканях растений, а также на разных стадиях развития растительного организма. Тем не менее, практически нет свидетельств в пользу существования в геноме растений кластеров генов, специфически отвечающих на биотические и абиотические факторы внешней среды. В настоящей работе мы продолжили анализ полученного ранее глобального профиля экспрессии защитных генов арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*), в результате чего идентифицировали два кластера генов, отвечающих на инфекцию вирусом CMV(Y). Регуляция активности кластерных генов в растениях устойчивого (C24) и чувствительного (Col-0) экотипах в ответ на атаку патогена была различной. В обоих экотипах наблюдали конститутивную экспрессию кластерных генов, причем в экотипе Col-0 большинство генов в двух изученных кластерах экспрессировались на более высоком уровне. В результате заражения вирусом уровень экспрессии кластерных генов в растениях Col-0 не изменялся. Напротив, в устойчивых растениях C24 активность большинства генов увеличивалась до уровня, характерного для незараженных растений Col-0 или более высокого. Таким образом, устойчивый к вирусу экотип приобрел в процессе эволюции регуляторный механизм совместной активации кластерных генов ответа на биотический стресс. Предполагается, что одной из причин такой дивергенции генома арабидопсиса могла быть значительная разница среднегодового диапазона температур в каждом из ареалов того или другого экотипа.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*, кластеры генов защитного ответа, вирус мозаики огурца, экотип Col-0, экотип C24

EXPRESSION OF CLUSTERED DEFENSE GENES IN RESPONSE TO THE VIRAL INFECTION IN TWO ECOTYPES OF (ARABIDOPSIS THALIANA)

^{1,2}Postnikova O.A., ¹Minakova N.Y., ¹Shirshikova G.N., ²Nemchinov L.G., ^{1,2}Butanaev A.M.

¹*Institute of Basic Biological Problems, Russian Academy of Sciences, Pushchino;*
²*USDA/ARS, Plant Sciences Institute, Molecular Plant Pathology Laboratory, Beltsville MD 20705, USA, e-mail: boutanaev@mail.ru*

Clusters of functionally-related, co-activated genes constitute the considerable part of the eukaryotic genome. There are a lot of data concerning the activity of clustered genes specifically expressed in plant organs, tissues or genes specific to different developmental stages. However, evidences in favor of clustered genes responsive to biotic or abiotic stress factors are sparse. In this study, we continued investigation of the global expression profile of *Arabidopsis thaliana* defense genes which we obtained earlier. As a result, we identified two clusters of genes responsive to infection of CMV(Y) virus. Susceptible (Col-0) and resistant (C24) ecotypes of *Arabidopsis* differed considerably in regulation of the activity of the clustered genes in response to the attack of the pathogen. Expression of the clustered genes was constitutive in both ecotypes, however the majority of genes located in the two studied clusters was expressed on higher level in Col-0. Furthermore, inoculation did not influence on the expression level of the same genes in Col-0. On contrary, after inoculation of the resistant C24 plants the activity of the most genes was elevated to the level of the non-inoculated Col-0 plants or overcame it. We concluded that the resistant ecotype acquired the ability to co-activate clustered genes responsive to the biotic stress. We speculate that divergence of the *Arabidopsis* genome may be due to considerable difference in temperature yearly averages specific to each areal inhabited by two ecotypes.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, clusters of defense response genes, cucumber mosaic virus, ecotype Col-0, ecotype C24

В геноме эукариот гены распределены не случайно и одной из причин такого распределения является то, что негомологичные гены, участвующие в одних и тех же биохимических или физиологических процессах или активирующиеся на определенных стадиях развития, большей частью локализованы поблизости друг от друга, образуя кластеры. Поскольку кластерные гены составляют значительную часть эукариотического генома, их структурная

и функциональная организация представляет существенный интерес. Хотя такие кластеры функционально-родственных генов найдены во многих модельных геномах, включая геном арабидопсиса [8], мало что известно о механизмах совместной активации и репрессии членов кластеров. В частности, практически полностью отсутствуют сведения о возможности образования кластеров генами, отвечающими на действие абиотических и биотических факто-

ров внешней среды, а также их совместной регуляции. В настоящей работе мы идентифицировали и изучили экспрессию генов, составляющих два независимых кластера у чувствительного и устойчивого экотипов арабидопсиса, в норме и в растениях, зараженных вирусом мозаики огурца *CMV(Y)*.

Материалы и методы исследования

Выращивание арабидопсиса, очистка вируса и заражение растений.

Растения арабидопсиса экотипа *Columbia-0* и экотипа *C24* выращивали в течение 21 дня в климатической камере с 16-часовым фотопериодом при 24 °С. Желтый штамм вируса огуречной мозаики (*Cucumber mosaic virus, CMV(Y)*) был любезно предоставлен Х. Такахаши [7]. Размножение вируса проводили на растениях табака *Nicotiana benthamiana* и очищали дифференциальным центрифугированием, как было описано ранее [5]. Вирусы ресуспендировали до концентрации 0,5 мг/мл в 20 мМ калий фосфатном буфере (рН 7,2) и 10 мкл суспензии использовали для заражения листьев трехнедельных растений путем втирания с частицами карборунда. С контрольными растениями проводили ту же процедуру с фосфатным буфером. В качестве образца отбирали по 2–3 листочка с 3–5 растений через 1, 3 и 5 дней после инокуляции, замораживали в жидком азоте и хранили при температуре –80 °С до выделения РНК.

Выделение РНК, синтез первой цепи кДНК и количественная ПЦР в реальном времени.

Выделение суммарной РНК проводили с использованием Trizol-Reagent согласно инструкции производителя (Invitrogen). Для синтеза первой цепи кДНК использовали набор SuperScript First-Strand cDNA Synthesis System согласно инструкции производителя (Invitrogen). ПЦР в реальном времени проводили с использованием набора iQ SYBR Green Supermix kit (Bio-Rad) на амплификаторе MiniOpticon Real-Time PCR system (Bio-Rad). Условия ПЦР в реальном времени: 94 °С – 1 мин (1 цикл); 94 °С – 30 с, 60 °С – 30 с, 72 °С – 30 с (30 циклов). Амплификацию выполняли в двух повторах. В качестве внутреннего контроля в реакциях ПЦР в реальном времени были использованы гены арабидопсиса *ACTIN1* (*AT2G37620*) и *UBQ5* (*AT3G62250*).

Список изученных в эксперименте кластерных генов.

AT5G49480, AT5G49490, AT5G49510, AT5G49520, AT5G49525, AT5G49530, AT3G04700, AT3G04710, AT3G04715, AT3G04717, AT3G04730, AT3G04735, AT3G04740, AT3G04750, AT3G04720.

Стохастическое моделирование.

Для получения случайного распределения кластеров по размеру использовали генератор случайных чисел. Было получено 4935 случайных уникальных чисел (согласно результатам предыдущей работы – это количество активированных защитных генов в глобальном профиле экспрессии [3]) в диапазоне 1–27379 (общее количество генов арабидопсиса согласно последней версии генома). В предположении, что ряд чисел от 1 до 27379 составляет порядок генов в геноме арабидопсиса, каждое число, таким образом, приписывает случайную позицию в геноме одному из 4935 генов ответа. Из 100 итераций были получены средние значения для случайного распределения кластеров по размеру.

Результаты исследования и их обсуждение

Ранее, используя метод гетерологичного картирования EST (Expressed Sequence Tags) как альтернативу технологии микрочипов, мы построили профиль ответа арабидопсиса на биотический стресс в масштабе всего генома и идентифицировали 4935 генов, ассоциированных с ответом растения на инфекцию [3].

В настоящей работе посредством компьютерного анализа профиля мы обнаружили 1594 кластерных гена (32%), распределенных по всем хромосомам, которые могли бы быть связаны с защитным ответом. Кластер определяли как группу соседних генов, имеющих положительное значение профиля [2]. Для того чтобы определить, отличается ли наблюдаемое распределение кластеров генов по их размеру (количество генов в кластере) от случайного, мы создали модель стохастического распределения с использованием генератора случайных чисел так, как описано ранее [2]. На рис. 1 представлен сравнительный анализ наблюдаемого и стохастического распределения. Согласно χ^2 -критерию, образование кластеров генов, связанных с патогенозом, не случайно ($p = 1,2316E-242$, т.е. $p \ll 0,001$).

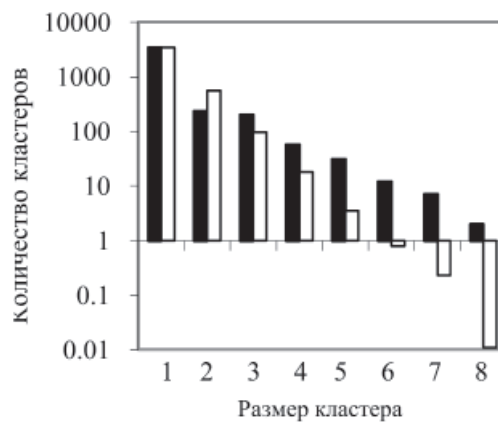


Рис. 1. Геном арабидопсиса содержит большие кластеры генов, связанных с защитной реакцией (черный цвет), по сравнению со случайным распределением (белый цвет). Размер кластера – количество генов в кластере. Ось ординат представляет количество кластеров соответствующего размера

Всего было идентифицировано 109 кластеров, содержащих 5 или большее число негомологичных генов, с наибольшим количеством генов в кластере, равном 11. Мы произвольно выбрали 2 кластера и изучили экспрессию их генов в двух экотипах арабидопсиса *Col-0* и *C24*, зараженных вирусом огуречной мозаики (*Cucumber mosaic*

virus, *CMV(Y)*). Экотип *Col-0* чувствителен к *CMV(Y)*, тогда как *C24* является устойчивым к данному вирусу. Один из кластеров состоял из девяти соседних генов, локализованных на третьей хромосоме, а другой – из 7 генов, локализованных на 5-й хро-

мосоме. На рис. 2 показан пример одного из двух выбранных кластеров. Интересно, что два кластера содержали известные гены, связанные с патогенезом: *PR4* (*AT3G04720*), *IAA* (*AT3G04730*), *ATCP1* (*AT5G49480*) и *WRKY48* (*AT5G49520*) [1].

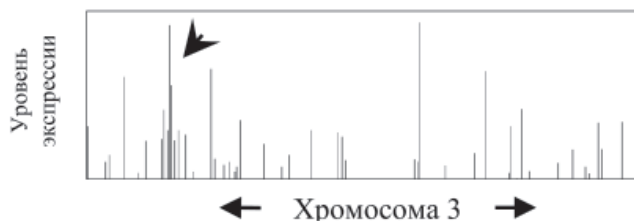


Рис. 2. Профиль экспрессии генов защитного ответа, расположенных в области, равной 1 Мб, на 3-й хромосоме арабидопсиса. Стрелка указывает положение большого кластера генов. По оси ординат отложены нормированные значения профиля экспрессии, представляющие собой долю EST, гомологичных данному гену

На зараженных очищенным препаратом *CMV(Y)* листьях растений экотипа *Col-0* через 3 дня развивались хлорозные симптомы. Инфекция развивалась в системную через 5–7 дней. Растения устойчивого экотипа *C-24* образовывали характерные некротические пятна только на зараженных листьях. Экспрессия генов в каждом из предполагаемых кластеров в зараженных растениях экотипа *Col-0* была на том же уровне, что и в контрольных незараженных растениях того же экотипа. Об этом свидетельствует отношение *CMV/контроль*, которое колебалось около 1,0 (между 0,7 и 1,4). Напротив, те же самые гены значительно активировались в зараженных растениях *C24* по сравнению с контрольным (рис. 3,а, б). Интересно, что в незараженных здоровых растениях кластерные гены экспрессировались даже в отсутствие атаки патогена, хотя уровень экспрессии значительно отличался в разных экотипах. Так, в одном из кластеров (рис. 3,в) уровень экспрессии семи генов из девяти был значительно выше в экотипе *Col-0* по сравнению с экотипом *C24* и только два гена экспрессировались на аналогичном уровне как в *C24*, так и в *Col-0*. В другом кластере (рис. 3,г) уровень экспрессии четырех генов был выше в экотипе *Col-0*, один экспрессировался на том же уровне в обоих экотипах и уровень двух других был выше в экотипе *C24*. В целом, базовый уровень экспрессии значительной части генов в обоих кластерах был выше в экотипе *Col-0*, что составило 69% от всех генов двух кластеров.

Далее, мы сравнили уровень экспрессии активированных генов в зараженных растениях экотипа *C24* с базовым уровнем экспрессии тех же генов в незараженных растениях *Col-0*. Как видно из рис. 3,д, отношение уровней экспрессии зараженный *C24/незараженный Col-0* для всех генов

кластера близко к единице (между 0,7 и 1,7). Это свидетельствует о том, что уровень экспрессии активированных генов кластера в растениях экотипа *C24* повышается и достигает их базового уровня в незараженных растениях экотипа *Col-0*. В другом кластере (рис. 3,е) профиль ответа более сложный. Из семи активированных генов растений экотипа *C24* для 4-х из них уровень экспрессии был выше, для 2-х – на том же уровне и для одного ниже по сравнению с базовым уровнем экспрессии соответствующих генов в незараженных растениях экотипа *Col-0*.

Для того чтобы подтвердить специфичность активации изученных кластерных генов лишь в ответ на атаку вируса, мы изучили экспрессию этих генов в условиях пониженной температуры (4 °C в течение 12 и 36 часов) и при облучении длинноволновым ультрафиолетом УФ-А с длиной волны 365 нм (12 мкмоль квантов м⁻² с⁻¹) в течение 2-х и 4-х часов. Как показали результаты экспериментов, при действии обоих факторов изменение экспрессии кластерных генов не происходило, что подтверждает специфичность активации при инфекции растений вирусом *CMV* (результаты не показаны).

Основываясь на результатах исследования экспрессии генов двух независимых кластеров в ответ на вирусную инфекцию как в здоровых, так и в зараженных растениях *CMV*-чувствительного и *CMV*-устойчивого экотипов, мы сделали следующие выводы:

- 1) активация кластерных генов происходит в ответ на вирусную инфекцию в устойчивом экотипе *C24* и не происходит в восприимчивом экотипе *Col-0*;
- 2) в здоровых растениях обоих экотипов гены двух кластеров, тем не менее, экспрессируются на некотором базовом уровне, который выше в экотипе *Col-0* по сравнению с экотипом *C24* у большинства генов;

3) уровень экспрессии большей части (за исключением одного) активированных в ответ на инфекцию генов в *C-24* был срав-

ним с базовым уровнем в здоровых растениях *Col-0* или выше его (94% из 16 генов двух кластеров).

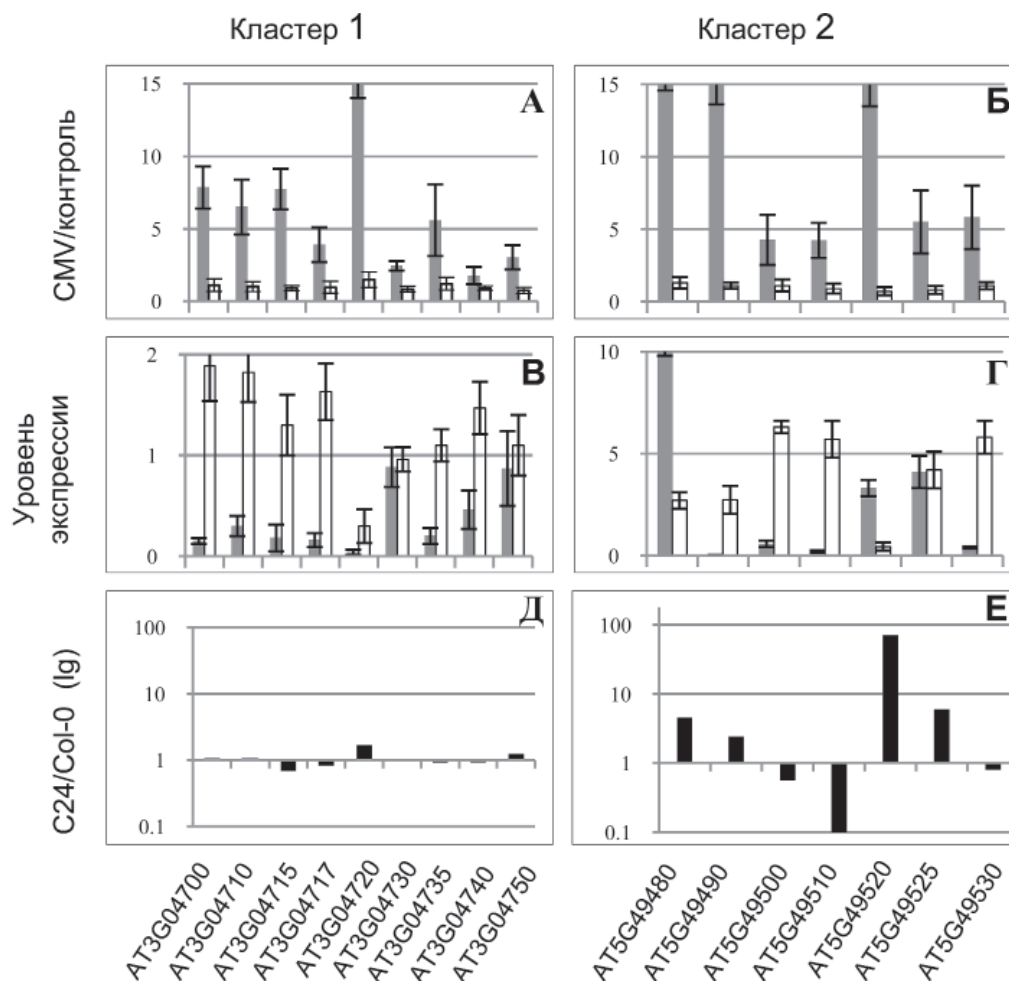


Рис. 3. Уровень экспрессии членов двух кластеров в ответ на инфекцию вирусом мозаики огурца *СМV(Y)*. Порядок генов соответствует их действительному расположению на хромосоме. А, В, Д и Б, Г, Е представляют два произвольно выбранных кластера генов, отвечающих на инфекцию (биотический стресс). Гистограммы серого цвета (А, Б, В, Г) соответствуют результатам, полученным на растениях экотипа *С24*, тогда как гистограммы белого цвета (А, Б, В, Г) соответствуют результатам, полученным на растениях экотипа *Col-0*. Гистограммы черного цвета (Д, Е) представляют отношение уровня экспрессии активированных генов в зараженных растениях *С24* к базовому уровню в незараженных *Col-0*. Ординаты на рис. В и Г являются нормализованными данными относительной флюоресценции. На рисунке представлены результаты, полученные на 5-й день после заражения

Два экотипа арабидопсиса, представляющие один и тот же геном, отличаются тем, что в геноме устойчивого к вирусу *СМV(Y)* экотипа присутствует доминантный ген резистентности (R-ген) *RCY1*. Предполагается, что R-гены активируют каскад передачи сигнала, приводящий к блокированию распространения патогена и, в конечном счете, несовместимому взаимодействию патоген-растение [4]. Вероятно, имеются и другие, более глубокие отличия. Такая дивергенция одного генома составляет генетический фон, на котором происходит экспрессия генов, связанных с патогенезом.

Наши экспериментальные результаты демонстрируют, что различия в экспрессии изученных кластеров не сводятся только к их активации или неактивации в ответ на биотический стресс в том или ином экотипе. Эти гены экспрессируются конститутивно и, возможно, участвуют в общем метаболизме. Интересно, что в восприимчивом экотипе большинство генов конститутивно экспрессируются на значительно более высоком уровне, чем в устойчивом. Возможно, это позволяет растению быть всегда готовым к атаке патогена. Напротив, в устойчивом экотипе базовый уровень экс-

прессии большинства тех же кластерных генов значительно ниже и гены активируются в ответ на атаку патогена, что позволяет экономить клеточные ресурсы. В действительности, механизм ответа кластерных генов вряд ли сводится полностью к такой упрощенной модели, поскольку профили экспрессии в разных экотипах зараженных и здоровых растений более сложные.

Среднегодовые температуры в ареалах, занимаемых двумя экотипами, близки по значению (14,8°C в случае *C24* и 12,1°C в случае *Col-0*), однако диапазон температур существенно различается и составляет 9,3...20,9°C и –3,1...25,6°C в случае ареалов *C24* и *Col-0*, соответственно [6]. Возможно, что положительные температуры способствуют распространению вируса, что, в свою очередь, могло являться селективным фактором в процессе формирования устойчивого к вирусу экотипа *C24*.

Заключение

Очевидно, что гены, участвующие в ответе растительного организма на атаку патогена, так же как и другие функционально-родственные гены, могут образовывать кластеры. Особенность данной экспериментальной модели состоит в том, что кластерные гены, составляющие часть одного генома, конститутивно экспрессируются в обоих дивергированных экотипах и только в одном из них существует регуляторный механизм их активации на более высоком уровне. Поэтому, как представляется, дивергенция между экотипами более глубокая, нежели присутствие или отсутствие R-гена. Одним из эволюционных достижений устойчивого к вирусу экотипа является приобретение регуляторного механизма активации кластерных генов, отвечающих на биотический стресс. Вполне вероятно, что

положительная температура, наблюдаемая в течение года на территории ареала экотипа *C24*, явилась одним из селективных факторов, способствовавших появлению растений, устойчивых к вирусу.

Список литературы

1. Global analysis of Arabidopsis gene expression uncovers a complex array of changes impacting pathogen response and cell cycle during geminivirus infection / J.T. Ascencio-Ibáñez, R. Sozzani, T.J. Lee, T.M. Chu, R.D. Wolfinger, R. Cella, L. Hanley-Bowdoin // *Plant Physiol.* – 2008. – Vol. 148, № 1. – P. 436–454.
2. Large clusters of co-expressed genes in the Drosophila genome / A.M. Boutanaev, A.I. Kalmykova, Y.Y. Shevelyov, D.I. Nurminsky // *Nature.* – 2002. – Vol. 420. – P. 666–669.
3. Boutanaev A.M., Postnikova O.A., Nemchinov L.G. Mapping of heterologous expressed sequence tags as an alternative to microarrays for study of defense responses in plants // *BMC Genomics.* – 2009. – Vol. 10. – P. 273.
4. Kang B.C., Yeam I., Jahn M.M. Genetics of plant virus resistance // *Ann. Rev. Phytopathol.* – 2005. – Vol. 43. – P. 581–621.
5. Lot H., Marrou J., Quiot J.B., Esvan C. A contribution to the study on Cucumber mosaic virus (CMV). Quick method of purification // *Ann. Phytopath.* – 1972. – Vol. 4. – P. 25–38.
6. Swindell W.R., Huebner M., Weber A.P. Plastic and adaptive gene expression patterns associated with temperature stress in *Arabidopsis thaliana* // *Heredity.* – 2007. – Vol. 99, № 2. – P. 143–150.
7. Takahashi H., Goto N., Ehara Y. Hypersensitive response in cucumber mosaic virus-inoculated *Arabidopsis thaliana* // *Plant J.* – 1994. – Vol. 6. – P. 369–377.
8. Zhan S., Horrocks J., Lukens L.N. Islands of co-expressed neighbouring genes in *Arabidopsis thaliana* suggest higher-order chromosome domains // *Plant J.* – 2006. – Vol. 45, № 3. – P. 347–357.

Рецензенты:

Креславский В.Д., д.б.н., с.н.с. Института фундаментальных проблем биологии РАН, г. Пущино;

Кособрюхов А.А., д.б.н., руководитель группы, в.н.с. Института фундаментальных проблем биологии РАН, г. Пущино.

Работа поступила в редакцию 28.11.2011.