

Элиситоры и биометод в защите растений

УДК 632.938.2:577.112.4:577.112.6

doi: 10.15389/agrobiology.2016.3.392rus

ПОИСК АКТИВНОГО ЦЕНТРА ПЕПТИДИЛ-ПРОЛИЛ-цис/транс-ИЗОМЕРАЗЫ ИЗ *Pseudomonas fluorescens*, ОТВЕТСТВЕННОГО ЗА ИНДУКЦИЮ УСТОЙЧИВОСТИ К ВИРУСУ ТАБАЧНОЙ МОЗАИКИ У РАСТЕНИЙ ТАБАКА (*Nicotiana tabacum* L.)*

В.Г. ДЖАВАХИЯ, Т.М. ВОИНОВА, Д.В. ШУМИЛИНА

Индуцирование устойчивости биогенными элиситорами или их аналогами признается перспективным направлением в современных технологиях защиты растений от болезней. Различные элиситоры, выделенные к настоящему времени из фитопатогенов или из не патогенных для растений микроорганизмов, представлены олигосахаридами, гликопротеинами, липидами, пептидами и белками. Первым белковым элиситором, нашедшим применение в сельском хозяйстве, был харпин, выделенный из бактерии *Erwinia amylovora*, на основе которого был разработан коммерческий препарат Messenger® (США). В проведенных нами ранее исследованиях из клеток штамма 197 *Pseudomonas fluorescens* был выделен белок-элиситор MF3, способный индуцировать устойчивость растений к вирусным и грибным патогенам. Столь широкий спектр действия предполагал перспективность использования MF3 в качестве потенциального средства защиты сельскохозяйственных культур от болезней. Была определена полная аминокислотная последовательность выявленного белка и показана высокая степень ее гомологии пептидил-пролил-цис/транс-изомеразам FKBP-типа той же бактерии, вследствие чего MF3 получил название Pf197_ППИ-азы. В отличие от многих белковых индукторов устойчивости растений к фитопатогенам Pf197_ППИ-аза обладает высокой термостабильностью, что облегчает выделение и очистку белка из клеточных лизатов с помощью их кипячения. Активные центры большинства известных белковых индукторов устойчивости растений к патогенам, как правило, связаны с наиболее консервативными участками полипептидной цепи. Мы предположили, что активный центр Pf197_ППИ-азы, ответственный за ее способность индуцировать устойчивость, может быть локализован в одной из наиболее консервативных аминокислотных последовательностей этого белка. Расчет такой последовательности при помощи биоинформационного ресурса PROSITE показал, что она содержит гидролизуемые трипсином сайты, образованные аминокислотами аргинином и лизином. Препараты Pf197_ППИ-азы были получены из штамма *Escherichia coli* BL21(DE3)+pIMF3 — суперпродуцента ППИ-азы. Трипсинолиз Pf197_ППИ-азы приводил к утрате способности белка индуцировать устойчивость растений к патогенам, что косвенно подтвердило правильность нашего предположения об ответственности консервативного участка за элиситорную активность белка. Посредством химического синтеза (Пущинский филиал Института биоорганической химии) был получен соответствующий консервативному участку олигомер, состоящий из 29 аминокислот (Pf_29ак). Дальнейшие эксперименты показали, что эквимолярные концентрации Pf197_ППИ-азы и олигопептида Pf_29ак в одинаковой степени индуцируют устойчивость растений табака *Nicotiana tabacum* L. к вирусу табачной мозаики (ВТМ). Это было подтверждено в биотесте при подсчете развивающихся некрозов на листьях растений табака (*Nicotiana tabacum* L.) сорта Xanthi (NN). Листья обрабатывали исследуемыми препаратами и помещали во влажную камеру, инкубировали 1 сут при 22 °C, после чего инокулировали вирусом и выдерживали во влажной камере 3-4 сут при 22 °C. Полученные результаты позволили сделать вывод о том, что для индуцирования устойчивости растений к ВТМ достаточно одного консервативного участка Pf197_ППИ-азы. Далее предполагается определить минимальный размер активного центра, способного проявлять элиситорные свойства.

Ключевые слова: индуцированная устойчивость растений к патогенам, белковые элиситоры, вирус табачной мозаики, пептидил-пролил-цис/транс-изомеразы, консервативные последовательности белков.

Разработка различных технологий применения веществ биологического происхождения в растениеводстве признается перспективным направлением современной сельскохозяйственной науки (1-3). Подобные

* Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 15-29-05902.

технологии применяются и для защиты растений от болезней, включая использование биопестицидов и индуцирование устойчивости биогенными элиситорами (4-7). В результате поиска биологически активных веществ с подобными свойствами выявлены микробные белки, способные вызывать у растений устойчивость к различным патогенам и вредителям (8-11). Один из таких белков, получивший название MF3 (microbial factor 3), был выделен нами из штамма Pf197 бактерии *Pseudomonas fluorescens* (12). Проведенные исследования показали, что MF3 не оказывает прямого влияния на фитопатогены, но может повышать устойчивость разных растений к ряду вирусных и грибных патогенов, в частности способствовать появлению системной устойчивости табака к вирусу табачной мозаики (ВТМ). Столь широкий спектр действия предполагал перспективность использования MF3 в качестве потенциального средства защиты сельскохозяйственных культур от болезней. Определение полной аминокислотной последовательности (13) показало высокую степень ее гомологии у MF3 и пептидил-пролил-циклический/isomerаз FKBР-типа (ППИ-азы) той же бактерии (14), в связи с чем MF3 получил название Pf197_ППИ-аза. В отличие от других белковых индукторов устойчивости растений к патогенам, например харпинов (15), Pf197_ППИ-аза обладает относительно низкой молекулярной массой — 16,9 кДа (13), а также высокой термостабильностью, что облегчает выделение и очистку этого белка из клеточных лизатов. Возможность деградации белков в природных условиях создает определенные ограничения для их использования в качестве средств защиты растений. Однако для многих белков, индуцирующих устойчивость растений к болезням, было показано, что элиситорной активностью обладает не только нативная молекула белка, но и ее фрагменты. Так, пептид flg22 (наиболее консервативный фрагмент аминокислотной последовательности бактериального флагеллина, проявляющего элиситорную активность), как и нативный флагеллин, может индуцировать у арабидопсиса окислительный взрыв, экспрессию PR-белков и синтез этилена, а также стимулировать отложение каллозы в тканях растения (16). Именно этот пептид, состоящий из 22 аминокислотных остатков, отвечает за элиситорные свойства, связывание и распознавание флагеллина растительными клетками (17). Известно также, что растения арабидопсиса специфично распознают N-концевой домен другого элиситорного белка — бактериального фактора элонгации Tu (EF-Tu), что приводит к активации системы защитных ответов растения. Аналогичный эффект может быть достигнут при использовании в качестве индуктора пептида elf18, входящего в состав упомянутого фактора элонгации и состоящего из 18 аминокислотных остатков (18). Белок холодового шока из *Micrococcus lysodeikticus* служит неспецифическим элиситором защитных реакций для представителей семейства *Solanaceae*. За элиситорную активность этого белка отвечает пептид csp15, расположенный в зоне консервативного домена и включающий 15 аминокислотных остатков (19, 20).

При исследовании Pf197_ППИ-азы нами впервые было обнаружено новое свойство у пептидил-пролил-циклический/isomerаз FKBР-типа, а именно способность индуцировать устойчивость растений к фитопатогенам, в частности к вирусу табачной мозаики (ВТМ). Однако механизм этого явления оставался неизвестным. В частности, отсутствовали сведения о том, содержит ли названный белок аминокислотную последовательность, обусловливающую такую активность. В настоящей работе нами выявлен участок полипептидной цепи ППИ-азы из штамма 179 *P. fluorescens*, отвечающий за элиситорные свойства этого белка, и получены экспериментальные подтверждения его роли в проявлении устойчивости

растений табака к ВТМ.

Целью представляемой работы было определение фрагмента полипептидной цепи ППИ-азы из штамма 179 *P. fluorescens*, отвечающего за способность этого белка индуцировать устойчивость различных растений к фитопатогенам.

Методика. Препараты Pf197_ППИ-азы были получены из штамма *Escherichia coli* BL21(DE3)+pIMF3 — суперпродуцента ППИ-азы, который выращивали на среде YT (100 мл) в колбах; непосредственно перед посевом в среду добавляли ампциллин до конечной концентрации 100 мкг/мл. Инокулятом служила сток-культура штамма BL21(DE3)+pIMF3, хранившаяся при -20 °C в 25 % глицерине. Колбы инкубировали на терmostатируемой качалке Excella™ E-25/25R («New Brunswick Scientific Co., Inc.», США) при 250 об/мин (эксцентрикитет 5 см) и температуре 37 °C в течение 20-22 ч. Полученную культуральную жидкость центрифугировали 30 мин при 4000 g. Осажденные клетки суспендировали в буфере (50 mM Трис-HCl, 0,15 M NaCl, 2 mM EDTA, pH 8,0), содержащем лизоцим (2 мкг/мл), и инкубировали в течение 30 мин при 37 °C. Клеточную суспензию обрабатывали ультразвуком (5 раз по 40 с) и помещали на кипящую водяную баню (20 мин, 100 °C) с периодическим перемешиванием, после чего быстро охлаждали на льду до 0 °C и центрифугировали (4000 g, 30 мин).

Супернатант, содержащий приблизительно 200 мг Pf197_ППИ-азы на 1 л культуральной жидкости, подвергали последовательной ультрафильтрации в ячейке Amicon 8050 («Millipore Corp.», США). Сначала супернатант разделяли с использованием селективной мембранны MWCO 100 kDa, а затем пермеат фильтровали через мембранны MWCO 10 kDa. В процессе ультрафильтрации происходило концентрирование целевого белка и его одновременное отделение от более высоко- и низкомолекулярных компонентов супернатанта.

Осветленный клеточный лизат наносили на колонку (25×50 мм) с наполнителем Chelating Sepharose (Ni^{2+}) («Pharmacia», Швеция), уравновешенную 50 mM Трис-HCl буфером (pH 7,5) с 0,25 M NaCl. Колонку тщательно промывали 50 mM Трис-HCl буфером (pH 7,5), содержащим 1 M NaCl. Белок элюировали линейным градиентом имидазола. Скорость потока составляла 3 мл/мин, объем градиента — 300 мл. Элюат (50-60 мл) дialisировали против 2 л дистиллированной воды при 4 °C. Поскольку ППИ-аза при кислых значениях pH выпадает в осадок, воду подщелачивали раствором NaOH до pH 7,0. Чистоту полученного раствора ППИ-азы оценивали при помощи гель-электрофореза по Лэммли (21). Для длительного хранения Pf197_ППИ-азу лиофилизовали и хранили при -20 °C в герметично закупоренных пробирках.

Для выявления наиболее консервативных участков был выполнен анализ установленной ранее аминокислотной последовательности белка (12) с использованием биоинформационного ресурса PROSITE (22, 23).

Для подтверждения роли обнаруженного консервативного участка в индукции устойчивости Pf197_ППИ-азу обрабатывали трипсином, предварительно денатурировав прогреванием исходного препарата в 50 mM Трис-HCl буфере (pH 8,0), содержащем мочевину (8 M) и меркаптоэтанол (4 mM), в течение 15-20 мин при 95 °C. После охлаждения раствор разбавляли 50 mM Трис-HCl буфером с 1 mM CaCl₂ (pH 7,6) до конечной концентрации мочевины 1 M. К денатурированному белку добавляли трипсин в соотношении 1:20 (по массе) и инкубировали смесь при 37 °C в течение 1 ч, после чего ферментативную реакцию останавливали, добавляя фенилметилсульфонилфторид до концентрации 1 mM. Полноту гидролиза кон-

тролировали с помощью электрофореза в ПААГ с додецилсульфатом натрия.

Составший из 29 аминокислотных остатков олигопептид, соответствующий фрагменту одной из консервативных областей Pf197_ППИ-азы (далее обозначен как Pf_29ак), был синтезирован сотрудниками Пущинского филиала Института биоорганической химии РАН.

Зашитную активность оценивали в биотесте на листьях табака (*Nicotiana tabacum* L.) сорта Xanthi (NN), выращенных в климатической камере при 16-часовом световом дне и температуре 24 °C днем и 20 °C ночью. У растений, достигших стадии 3-4 настоящих листьев, отделяли листья одного и того же яруса и обрабатывали их препаратами тестируемых веществ (по 5 листьев на вариант). При этом на одну из половинок каждого листа наносили водные или буферные растворы, содержащие эквимолярные количества Pf197_ППИ-азы, смеси триптических пептидов, полученных после ее гидролиза, или синтезированного олигопептидного фрагмента Pf_29ак. Вторые (контрольные) половинки тех же листьев обрабатывали дистиллированной водой или соответствующими буферными растворами, включающими все использованные для обработок соседних половинок компоненты, кроме анализируемого белка и пептидов. Так, в опытах с триптическими пептидами на контрольные половинки наносили буфер для протеолиза (см. выше) с инактивированным трипсином, а при анализе активности Pf_29ак — 0,1 % водный раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА), который использовался для растворения тестируемого олигопептида. При проверке инфекционности препарата ВТМ дополнительным контролем служили листья, на обе половинки которых перед заражением наносили дистиллированную воду. Обработанные листья помещали во влажную камеру, инкубировали 1 сут при 22 °C, а затем инокулировали ВТМ, используя сок растений табака, предварительно инфицированных вирусом, который разбавляли дистиллированной водой так, чтобы при нанесении 60 мкл сока на контрольных половинках образовалось от 100 до 200 некрозов (в сок, содержащий ВТМ, добавляли карборунд). Инокулированные листья выдерживали во влажной камере 3-4 сут при 22 °C, после чего подсчитывали число развившихся некрозов. Опыты по оценке защитной активности каждого из анализируемых препаратов повторяли не менее 3 раз.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы STATISTICA 6.0 («SoftStat, Inc.», США). Определяли среднее стандартное отклонение и стандартную ошибку среднего арифметического. Различия между вариантами, согласно *t*-тесту, везде, где это не оговорено специально, достоверны при $p \geq 0,05$.

Результаты. Поскольку защитный эффект Pf197_ППИ-азы проявлялся при обработке филогенетически отдаленных растений против филогенетически неродственных патогенов (12), индуцируемая этим белком устойчивость носит неспецифический характер, а сам белок, возможно, вызывает активацию защитных ответов, общих для различных видов растений (24). Известно, что типичными индукторами таких ответов служат элиситоры МAMP/PAMP-типа (Microbial Associated Molecular Pattern/Pathogen Associated Molecular Pattern) (25, 26), представляющие собой метаболиты микроорганизмов, в том числе белки, необходимые им для жизнедеятельности и поэтому всегда присутствующие в их составе. При этом сайтами распознавания в процессе взаимодействия с растениями обычно оказываются наиболее консервативные участки элиситорных молекул, например такие пептидные фрагменты, как упомянутые выше flg22, elf18 и csp15 (9, 27). Исходя из этого, мы предположили, что Pf197_ППИ-аза также

может содержать пептидный фрагмент, с которым связана ее активность против фитопатогенов, в частности против ВТМ, причем весьма вероятно, что такой фрагмент будет локализован в консервативной зоне молекулы.

В результате поиска генов, гомологичных гену, кодирующему Pf197_ППИ-азу, проведенного с помощью программы Scan Prosite (22, 23), выявили более 45 сходных по составу генов ППИ-аз разных организмов (28). Далее был осуществлен поиск консервативных последовательностей внутри Pf197_ППИ-азы и обнаружены две основные консервативные области (рис.). В одной из них располагался наиболее консервативный фрагмент, состоящий из 29 аминокислотных остатков. Чтобы проверить возможную ассоциацию элиситорной активности с этим консервативным участком, провели специфический протеолиз ферментом, расщепляющим белок в том числе внутри этого участка (см. рис.).

Потеря или снижение активности Pf197_ППИ-азы могли бы свидетельствовать о том, что центр, ответственный за его протективную активность, расположен внутри найденной консервативной области. С помощью программы Peptide Cutter (<http://ca.expasy.org/tools/peptidecutter/>) для протеолиза был выбран фермент трипсин, гидролизующий пептидные связи, образованные остатками основных аминокислот — аргинина и лизина. В результате обработки трипсином исследуемый белок должен был расщепиться, в том числе внутри предполагаемой консервативной области, образовав 10 фрагментов (см. рис.).

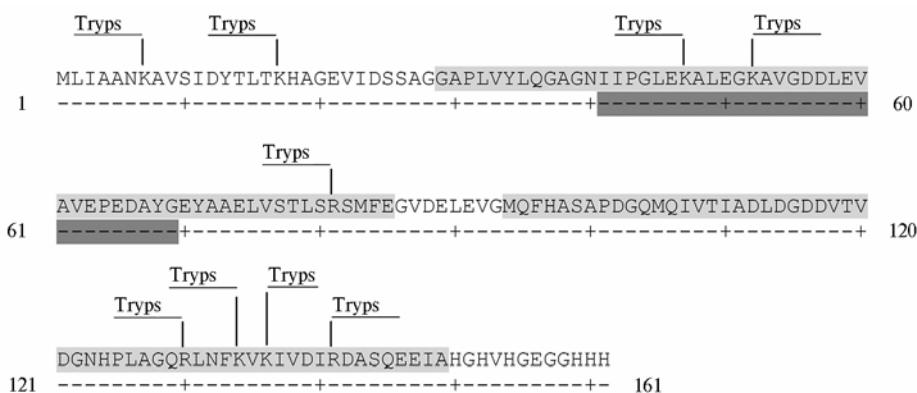


Схема действия трипсина (Tryps) на Pf197_ППИ-азу FKBP-типа, выделенную из *Pseudomonas fluorescens*. Светло-серым цветом выделены консервативные области, темно-серым — наиболее консервативный фрагмент (Pf_29 ак).

В качестве тест-системы для определения устойчивости растений использовали модель ВТМ—некрозообразующий сорт табака Xanthu. Она оказалась удобна тем, что позволила, подсчитывая число некрозов на листьях, получать достаточно точную количественную оценку степени индуцируемой устойчивости.

Результаты эксперимента показали, что предварительная обработка листьев табака раствором пептидов, полученных в результате трипсина-лиза, не препятствовала развитию некрозов после заражения ВТМ, то есть расщепление Pf197_ППИ-азы лишило ее способности вызывать устойчивость. На половинках листьев, обработанных исходным белком, число некрозов было существенно меньше, чем при обработке смесью триптических пептидов (табл. 1). Таким образом, обработка Pf197 ППИ-азы трипсином приводила к образованию неактивных пептидов, что свидетельствует о повреждении трипсином части молекулы ППИ-азы, ответственной за ее элиситорные свойства.

1. Влияние предварительной обработки продуктами трипсинолиза Pf197_ППИ-азы на заражение листьев табака (*Nicotiana tabacum* L.) сорта Xanthy вирусом табачной мозаики (ВТМ) ($X \pm x$)

Вариант	Препарат	Число некрозов на половинке листа
I	Продукты протеолиза (пептиды), 1 мкг/мл	93,4±17,0 ^a
	Контрольный раствор	96,2±18,1 ^a
II	Продукты протеолиза (пептиды), 1 мкг/мл	116,2±20,4 ^b
	Контрольный раствор + Pf197_ППИ-азы 1 мкг/мл	12,4±1,8 ^b

П р и м е ч а н и е. Тестируемые растворы продуктов протеолиза наносили на одну половинку листа, другую половинку того же листа обрабатывали контрольными растворами (контрольный раствор — это буфер, в котором проводилась рестрикция белка, с добавлением инактивированного трипсина). Данные, отмеченные одинаковыми буквами, статистически не отличаются друг от друга ($p > 0,05$).

В состав одной из наиболее консервативных областей Pf197_ППИ-азы входит пептид, который состоит из 29 аминокислотных остатков: PPGLEKALE GKGVGDDLEV AVEPEDAYG (Pf_29ак). В условиях лаборатории искусственного климата мы изучили способность пептида Pf_29ак индуцировать устойчивость к ВТМ у листьев табака. Для минимизации воздействия на пептид протеиназ в раствор пептида добавляли 0,1 % БСА. При исследовании защитных свойств синтетического олигопептида (табл. 2) было показано, что предобработка листьев растворами Pf_29ак в трех концентрациях индуцировала устойчивость к ВТМ как обработанных половинок, так и (в определенной степени) соседних, то есть имел место трансламинарный эффект. Таким образом, было установлено, что синтетический олигопептид обладает способностью индуцировать устойчивость листьев табака к ВТМ.

2. Влияние предварительной обработки листьев табака (*Nicotiana tabacum* L.) сорта Xanthy растворами пептида Pf_29ак и Pf197_ППИ-азы разной концентрации на образование некрозов при заражении вирусом табачной мозаики (ВТМ) ($X \pm x$)

Вариант обработки	Половинка листа	Число некрозов на половинке листа	Степень защиты, %
БСА (0,1 %)	Контроль	294,9±13,2	
Pf_29ак (0,5 нМ) + БСА (0,1 %)	Опыт	96,7±44,7	67,2
Pf197_ППИ-аза (5,9 нМ) + БСА (0,1 %)	Контроль	235,0±25,5	20,3
Pf_29ак (5 нМ) + БСА (0,1 %)	Опыт	193,2±9,7	34,5
Pf197_ППИ-аза (59 нМ) + БСА (0,1 %)	Контроль	251,7±41,5	16,7
Pf_29ак (50 нМ) + БСА (0,1 %)	Опыт	62,3±22,0	78,9
Pf197_ППИ-аза (59 нМ) + БСА (0,1 %)	Контроль	186,3±58,5	36,8
Pf_29ак (50 нМ) + БСА (0,1 %)	Опыт	49,7±17,3	83,7
Pf197_ППИ-аза (59 нМ) + БСА (0,1 %)	Контроль	277,5±33,1	5,9
Pf_29ак (50 нМ) + БСА (0,1 %)	Опыт	60,8±15,3	79,4
Pf197_ППИ-аза (59 нМ) + БСА (0,1 %)	Контроль	200,2±75,7	32,1

П р и м е ч а н и е. БСА — бычий сывороточный альбумин.

Сравнение действия пептида и исходного белка проводили, выражая их количество в наномолях. Так, при обработке Pf197_ППИ-азой в концентрации 1 мкг/мл, что соответствует 59 нМ, листья были защищены на 80-90 %, в концентрации 5,9 нМ — примерно на 30 %. В то же время в варианте с раствором пептида Pf_29ак в концентрации 5 нМ защитный эффект достигал 78,9 %. Таким образом, синтетический пептид обладал не меньшими защитными свойствами, чем нативная молекула Pf197_ППИ-азы.

FK506-связывающие белки (FKBP) относятся к большому семейству пептидил-пролил-цис/транс-изомераз (28). Несмотря на то, что эти белки известны довольно давно, их внутриклеточные функции до конца не изучены. Белки FKBP-типа вовлечены во многие внутриклеточные процессы, такие как сигналинг, белковый трафик и транскрипция. Они участвуют в процессах роста и развития растений, что было показано в

опытах с блокированием генов растений, кодирующих белки FKBP-типа. Инактивация двух подобных генов у *Arabidopsis* показала причастность этих белков к регуляции биосинтеза таких важных гормонов, как цитокинины и брассиностероиды. Эти два белка FKBP-типа вовлечены в передачу сигнала в клетке разными путями, регулируя сборку сложных белков или их активность (29). Белки FKBP-типа участвуют в упаковке вновь синтезируемых полипептидов, а также в транспорте и сборке клеточных белковых комплексов (30). Помимо того, что ППИ-азы одного организма могут ингибировать рост другого организма за счет конкурентного связывания с рецепторами, некоторые циклофилины, по-видимому, способны непосредственно подавлять рост грибов. Так, циклофилин C-CyP с молекулярной массой 20 кДа, выделенный из китайской капусты (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*), обладает фунгитоксичным действием и ограничивает *in vitro* рост *Candida albicans*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Trichoderma harzianum* и *T. viride*. В меньшей степени белок сдерживает рост мицелия *Fusarium solani* и *F. oxysporum*. Наконец, C-CyP не оказывает влияния на развитие *Aspergillus flavus* (31). В отличие от описанного выше белка Pf197_ППИ-азы, выделенная нами из *P. fluorescens*, не проявляет прямого антигрибного или антивирусного действия, однако это первая из ППИ-аз FKBP-типа, для которой показана способность индуцировать устойчивость растений к патогенам.

Для того чтобы выяснить, определяет ли Pf_29ак минимальный размер активного центра, планируется создать библиотеку более коротких олигопептидов в пределах этой последовательности. Тестирование биологической активности таких пептидов позволит выявить минимальный фрагмент молекулы Pf197_ППИ-азы, достаточный для индуцирования устойчивости растений к патогенам, либо установить, что для этого необходима полная последовательность Pf_29ак.

Итак, аминокислотная последовательность Pf197_ППИ-азы содержит участок, повреждение которого приводит к потере индуцирующей активности. Этот фрагмент соответствует наиболее консервативной части последовательности и состоит из 29 аминокислот. Искусственно синтезированный гипотетический олигопептид Pf_29ак в эквимолярных концентрациях обладает такой же элиситорной активностью, как и нативная молекула Pf197_ППИ-азы. Иными словами, активный центр молекулы Pf197_ППИ-азы, ответственный за его способность индуцировать устойчивость растений к патогенам, представлен фрагментом, состоящим, по крайней мере, из 29 аминокислот.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gerwick B.C., Sparks T.C. Natural products for pest control: an analysis of their role, value and future. Pest Manag. Sci., 2014, 70: 1169-118 (doi: 10.1002/ps.3744).
2. Hutchins S.H. Natural products for crop protection: evolution or intelligent design. In: Discovery and synthesis of crop protection products /P. Maienfisch, M.S. Thomas (eds.). ACS Symposium Series, 2015: 55-62 (doi: 10.1021/bk-2015-1204.ch005).
3. Bhatia S., Sinha R.K., Sharma R. Seeking alternatives to chemical fertilizers for sustainable agriculture: study of the impact of vermicompost on growth and yield of potted wheat crops. International Journal of Environmental Education and Information, 2000, 19: 295-304.
4. Duke S.O., Abbas H.K. Natural products with potential use as herbicides. In: Allelopathy /K.M.M. Inderjit, F.A. Dakshini, K. Einhellig (eds.). ACS Symposium Series, 1994: 348-362 (doi: 10.1021/bk-1995-0582.ch025).
5. Gahukar R.T. Evaluation of plant-derived products against pests and diseases of medicinal plants: a review. Crop Protection, 2012, 42: 202-209 (doi: 10.1016/j.cropro.2004.05.002).
6. Roberts D.P., Lakshman D.K., Maul J.E., McKeenna L.F., Buyle J.S., Fan B. Control of damping-off of organic and conventional cucumber with extracts from a plant-

- associated bacterium rivals a seed treatment pesticide. *Crop Protection*, 2014, 65: 86-94 (doi: 10.1016/j.cropro.2014.07.009).
7. Mejía - Teniente L., Torres - Pacheco I., González - Chavira M.M., Ocampo - Velazquez R.V., Herrera - Ruiz G., Chapá - Oliver A.M., Guevara - González R.G. Use of elicitors as an approach for sustainable agriculture. *African Journal of Biotechnology*, 2010, 9: 9155-9162 (doi: 10.5897/AJB2010.000-3340).
 8. Ahmed M., Kibret M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University — Science*, 2014, 26: 1-20 (doi: 10.1016/j.jksus.2013.05.001).
 9. Djavakhia V.G., Nikolaev O.N., Voinova T.M., Battchikova N.V., Korpela T., Khomutov R.M. DNA sequence of gene and amino acid sequence of protein from *Bacillus thuringiensis*, which induces non-specific resistance of plants to viral and fungal diseases. *Journal of Russian Phytopathological Society*, 2000, 1: 75-81.
 10. Шумилина Д.В., Войнова Т.М., Джавахия В.Г. Микробный фактор 3 — база для создания новых биопестицидов. Защита и карантин растений, 2006, 10: 20-21.
 11. Shcherbakova L.A., Odintsova T.I., Stakheev A.A., Fravel D.R., Zavrijev S.K. Identification of a novel small cysteine-rich protein in the fraction from the biocontrol *Fusarium oxysporum* strain CS-20 that mitigates fusarium wilt symptoms and triggers defense responses in tomato. *Front. Plant Sci.*, 2016, 6(1207): 1-15 (doi: 10.3389/fpls.2015.01207).
 12. Shumilina D., Krämer R., Klocke E., Dzhavakhija V. MF3 (peptidyl-prolyl cis-trans isomerase of FKBP type from *Pseudomonas fluorescens*) — an elicitor of non-specific plant resistance against pathogens. *Phytopathologica Polonica*, 2006, 41: 39-49.
 13. Шумилина Д.В., Джавахия В.Г. Изучение способности MF3 (пептидил-пролил цис-транс изомеразы FKBP типа) из *Pseudomonas fluorescens* повышать устойчивость растений табака к вирусным и грибным патогенам. *Арго XXI*, 2007, 7-9: 12-13.
 14. Isaki L., Beers R., Wu H.C. Nucleotide sequence of the *Pseudomonas fluorescens* signal peptidase II gene (*Isp*) and flanking genes. *J. Bacteriol.*, 1990, 172: 6512-6517.
 15. Wei Z.-M., Qiu D., Kropf M.J., Schadling R.L. Harpin, an HR elicitor, activates both defense and growth systems in many commercially important crops. *Phytopathology*, 1998, 88(suppl.): 96.
 16. Gymez-Gymez L., Boller T. Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends Plant Sci.*, 2002, 7(6): 251-256 (doi: 10.1016/S1360-1385(02)02261-6).
 17. Gymez-Gymez L. Plant perception systems for pathogen recognition and defense. *Mol. Immunol.*, 2004, 41(11): 1055-1062 (doi: 10.1016/j.molimm.2004.06.008).
 18. Kunze G., Zipfel C., Robatzek S., Niehaus K., Boller T., Felix G. The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in *Arabidopsis* plants. *Plant Cell*, 2004, 16: 3496-3507 (doi: 10.1105/tpc.104.026765).
 19. Felix G., Boller T. Molecular sensing of bacteria in plants. The highly conserved RNA-binding motif RNP-1 of bacterial cold shock proteins is recognized as an elicitor signal in tobacco. *J. Biol. Chem.*, 2003, 278(8): 6201-6208 (doi: 10.1074/jbc.M209880200).
 20. Кромина К.А., Джавахия В.Г. Экспрессия бактериального гена *CspD* в растениях табака приводит к их повышенной устойчивости к грибным и вирусным фитопатогенам. *Молекулярная генетика, вирусология и микробиология*, 2006, 1: 31-34.
 21. Lammli U.K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227: 680-685 (doi: 10.1038/227680a0).
 22. Sigrist C.J.A., Cerutti L., Hulo N., Gattiker A., Falquet L., Pagni M., Bairoch A., Bucher P. PROSITE: a documented database using patterns and profiles as motif descriptors. *Brief Bioinformatics*, 2002, 3: 265-274 (doi: 10.1093/bib/3.3.265).
 23. de Castro E., Sigrist C.J.A., Gattiker A., Bulliard V., Langendijk - Genewaix P.S., Gasteiger E., Bairoch A., Hulo N. ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucl. Acids Res.*, 2006, 34: W362-W365 (doi: 10.1093/nar/gkl124).
 24. Nürnberg T., Lipka V. Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Mol. Plant Pathol.*, 2005, 6: 335-345 (doi: 10.1111/j.1364-3703.2005.00279.x).
 25. Jones J.D.G. The plant immune system. *Nature*, 2006, 444: 323-329 (doi: 10.1038/nature05286).
 26. Bittel P., Robatzek S. Microbe-associated molecular patterns (MAMPs) probe plant immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2007, 10: 335-341 (doi: 10.1016/j.pbi.2007.04.021).
 27. Felix G.G., Duran J.D., Volkov S., Boller T. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *The Plant Journal*, 1999, 18: 265-276 (doi: 10.1046/j.1365-313X.1999.00265.x).
 28. Galat A., Riviere S. Peptidyl-prolyl cis/trans isomerases. Oxford University Press, Oxford, NY, 1998: 117.
 29. Harrar Y., Bellini C., Faure J.D. FKBP: at the crossroads of folding and transduction. *Trends Plant Sci.*, 2001, 6(9): 426-431 (doi: 10.1016/S1360-1385(01)02044-1).
 30. Ivery M. Immunophilins: switched on protein binding domains? *Med. Res. Rev.*, 2000, 20(6): 452-484 (doi: 10.1002/1098-1128(200011)20:6<452::AID-MED2>3.0.CO;2-6).
 31. Lee J.R., Park S.-C., Kim J.-Y., Lee S.S., Park Y., Cheong G.-W., Hahn K.-S.,

ФГБНУ Всероссийский НИИ фитопатологии,
143050 Россия, Московская обл., Одинцовский р-н,
пос. Большие Вяземы, ул. Институт, вл. 5,
e-mail: vitaly@vniif.ru, dzhavakhiya@yahoo.com, tatiana.voinova@bk.ru,
dasha2409@yandex.ru

*Поступила в редакцию
26 февраля 2016 года*

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2016, V. 51, № 3, pp. 392-400

SEARCH FOR THE ACTIVE CENTER OF PEPTIDYL-PROLYL cys/trans ISOMERASE FROM *Pseudomonas fluorescens* RESPONSIBLE FOR THE INDUCTION OF TOBACCO (*Nicotiana tabacum* L.) PLANT RESISTANCE TO TOBACCO MOSAIC VIRUS

V.G. Dzhavakhiya, T.M. Voinova, D.V. Shumilina

All-Russian Research Institute of Phytopathology, Federal Agency of Scientific Organizations, 5, ul. Institute, pos. Bol'shie Vyazemy, Odintsovskii Region, Moscow Province, 143050 Russia, e-mail vitaly@vniif.ru, dzhavakhiya@yahoo.com, tatiana.voinova@bk.ru, dasha2409@yandex.ru

Acknowledgements:

Supported by Russian Foundation for Basic Research, project № 15-29-05902.

Received February 26, 2016

doi: 10.15389/agrobiology.2016.3.392eng

Abstract

The induction of pathogen resistance with biogenic elicitors is now considered as a promising plant protection method. Elicitors obtained from fungal, bacterial, and oomycetic pathogens can be of peptide, glicoproteid, lipid, and oligosaccharide origin. The first reported protein elicitor was harpin isolated from *Erwinia amylovora*. Based on this elicitor, a Messenger® preparation intended to protect plants from a wide range of pathogens was developed and commercialized in USA. The MF3 protein able to induce the systemic resistance of plants to viral and fungal pathogens was isolated from the strain 197 of *Pseudomonas fluorescens* in the course of our earlier studies. Such a wide range of action assumed prospectivity of MF3 using as a potential plant protection remedy. The full amino acid sequence of this protein was determined, and its high homology to the FKBP-type peptidyl-prolyl cys/trans isomerases of the same bacteria was demonstrated, so the isolated protein was called Pf197_PPIase. As a rule, active centers of the majority of known elicitor proteins are localized at the most conserved domains. We supposed that the active center of Pf197_PPIase responsible for its ability to induce the resistance is localized within the most conserved sequence of this protein. The calculation of this sequence using a PROSITE bioinformational resource showed it contains sites composed of arginine and lysine and subjected to the tripsinolysis. The preparations of Pf197_PPIase were obtained from the recombinant strain of *Escherichia coli* BL21(DE3)+pIMF3 — the super-producer of Pf197_PPIase. The treatment of Pf197_PPIase with trypsin resulted in the loss of its elicitor properties that indirectly confirmed our hypothesis about the responsibility of the studied conserved domain for the elicitor activity of the MF3 protein. A Pf_29ac oligomer consisting of 29 amino acids and corresponding to the revealed conserved region was obtained by a chemical synthesis (Pushchino affiliated branch of the Institute of bioorganic chemistry). The further experiments showed that equimolar concentrations of Pf197_PPIase and Pf_29ac induced a similar level of resistance of tobacco plants to Tobacco Mosaic Virus (TMV). These results were confirmed in biotests when necrosis were calculated on the surfaces of the inoculated tobacco leaves. The leaves were treated with preparations and incubated in wet chambers for 24 hours at 22 °C. After that the leaves were inoculated with viral suspension and incubated in wet chambers during 3-4 days at 22 °C. The obtained results permitted us to conclude the conserved domain of Pf197_PPIase alone is sufficient for the induction of the TMV resistance in tobacco. The further determination of a minimum size of the active center able to provide the elicitor activity is planned.

Keywords: induced disease resistance of plants, protein elicitors, tobacco mosaic virus, peptidyl-prolyl cis/trans isomerases, conserved protein domains.

Научные собрания

**X Международный биотехнологический
Форум-выставка «РосБиоТех-2016»**
Москва, Краснопресненская набережная, д 14,
ЦВК «Экспоцентр»
1-3 ноября 2016



**The X International biotechnology
Forum and exhibition «RosBioTech-2016»**
14, Krasnopresnenskaya nab., Moscow,
«Expocentre»
November 1-3, 2016

Контакты и информация: <http://www.rosbiotech.com>; info@rosbiotech.com