

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
образования «Московский государственный университет имени
М.В.Ломоносова»

Факультет биоинженерии и биоинформатики

На правах рукописи

Поздышев Денис Валерьевич

УЧАСТИЕ ГЕНОВ, ИНДУЦИРУЕМЫХ МЕТАНОЛОМ,
В РОСТЕ И УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К СТРЕССУ

03.01.03 - молекулярная биология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
профессор Ю.Л.Дорохов

Москва 2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	
Пектин и пектинметилэстераза: общие сведения.....	7
Рост листа: sink и source зоны листа.....	10
Модификация пектина в росте и развитии растения	12
Экспрессия гена ПМЭ при стрессовом воздействии на растение	13
Метанол растительной клетки: происхождение и метаболизм.....	16
Эмиссия метанола растением	18
Эмиссия метанола в условиях стресса	20
Летучие органические соединения растений с сигнальной функцией	21
Летучие органические соединения и вирусная инфекция.....	23
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	
Используемые растения	26
Нозерн-блот анализ	26
Измерение метанола в среде.....	27
Измерение метанола в соке растений	27
Газовая хроматография.....	27
Подавляющая вычитающая гибридизация	27
Методы биоинформатики и статистического анализа.....	28
qRT-PCR (количественная ПЦР в реальном времени с предварительным получением кДНК)	28
Плазмиды	29
Обратная транскрипция	32
Определение ферментативной активности ПМЭ.....	33
Измерение ферментативной активности GUS.....	33
Детекция флуоресценции GFP	33
Агроинфильтрация растений	34
Тест на связывание белков на мембране в ренатурирующих условиях (overlay assay)	34
Подготовка проб из зон агроинъекции для разделения электрофорезом в ПААГ (полиакриламидном геле)	35
Измерение апертуры устьиц.....	35
Инокуляция ВТМ.....	35
Иммунизация мышей	35
Вестерн-блот анализ.....	36

Выделение тотальной фракции РНК из растений с помощью TRI Reagent	36
Фракционирование листового материала	36
5'-RACE (rapid amplification of cDNA ends) метод	37
«Прогулка по хромосоме» для изоляции пр <i>NCAPP</i> и пр <i>ПМЭ</i>	37
Получение трансгенных растений пр <i>NCAPP-GUS</i>	38
Обработка растений метанолом	38
Высокоэффективная жидкостная анионообменная хроматография.....	39
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	
ГЛАВА I. Гены, индуцируемые метанолом (ГИМ), в ответе растений на стресс	40
I.1. Синтез метанола при механической травме растения	40
I.2. ГИМ: реакция на механическую травму	44
I.3. Участие ГИМ в вирусной инфекции	49
ГЛАВА II. ГИМ: участие в росте и развитии листьев табака	53
II.1. Влияние эндогенного метанола на регуляцию ГИМ.....	53
II.2. Новые ГИМ с дифференциальной экспрессией в sink и source зонах листа.....	60
ГЛАВА III. Механизм обратной связи в системе «метанол- <i>NCAPP</i> - <i>ПМЭ</i> -метанол»	71
III.1. Промотор гена <i>NCAPP</i> чувствителен к метанолу	71
III.2. Экспрессия гена <i>ПМЭ</i> зависит от экспрессии гена <i>NCAPP</i> . Возможные функции гена <i>NCAPP</i>	76
III.3. Уровень транскрипции гена <i>ПМЭ</i> влияет на уровень эмиссии метанола	84
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	87
ВЫВОДЫ	90
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	91
СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	93
БЛАГОДАРНОСТИ	106

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Растения, не имея возможности избежать стрессовых воздействий среды, выработали способность эффективно на них отвечать (Kissoudis et al., 2014). Более того, растения способны синтезировать летучие органические соединения (ЛОС), которые играют роль химических сигналов, передающих информацию о стрессе на значительные расстояния. Такие сигналы могут быть приняты другими растительными организмами, повышая их шансы на эффективный ответ (Holopainen and Blande, 2012). В качестве примеров соединений с подобной функцией можно назвать ЛОС зеленых листьев, терпены, фитогормоны, такие как этилен и метилированные производные жасмоновой и салициловой кислот (Dorokhov et al., 2014).

Метанол, или древесный спирт, является ЛОС растений, функция которого неизвестна. До недавнего времени метанол рассматривался как побочный продукт роста клетки (von Dahl et al., 2006). Источник метанола в растении – реакция деметилирования пектина с участием фермента пектинметилэстеразы (ПМЭ) в процессе модификации и повреждения клеточной стенки (Pelloux et al., 2007). ПМЭ отщепляет метильные группы от сложных эфиров галактуроновых кислот пектина с образованием метанола. Известно, что ПМЭ повышает устойчивость растений ко многим биотическим стрессам, а атака фитофага и механическое повреждение листа сопровождается резким выбросом в атмосферу газообразного метанола. Для исследования влияния метанола на растение группа исследователей наносила метанол на листья *Arabidopsis thaliana* и анализировала изменение экспрессии генов в листьях с помощью микрочипов (Downie et al., 2004). Среди генов, транскрипция которых изменялась в ответ на обработку метанолом, были гены, кодирующие белки, вовлеченные в детоксикацию, в том числе цитохром P450, глюкозилтрансфераза и члены семейства транспортеров ABC (ATP binding cassette). Авторы пришли к выводу, что опрыскивание метанолом активирует детоксикацию и сигнальные системы. Однако в упомянутой работе был использован 10% раствор метанола, что в десятки тысяч раз превышает физиологический уровень метанола (von Dahl et al., 2006).

Стоит отметить, что метанол не является ядом для растений. Обработка растений растворами с высокими концентрациями метанола (10-50%) приводит к ускорению роста и развития культурных СЗ растений в засушливых условиях (Nonomura and Benson, 1992).

В нашей лаборатории была выдвинута гипотеза о метаноле как регуляторе иммунного ответа растительной клетки.

Степень разработанности темы. Данная работа посвящена экспериментальному подтверждению гипотезы о физиологической и эпигенетической функции метанола. Был

проведен сравнительный анализ транскриптомов клеток интактного листа и листа, обработанного газообразным метанолом в концентрациях, близких к физиологическим в условиях стресса. Анализ выполнен методом вычитающей подавляющей гибридизации, получен список генов, индуцируемых метанолом (ГИМ). Среди них были обнаружены гены, участвующие в регуляции межклеточного транспорта. Стоит отметить, что изменение плазмодесмального транспорта наблюдается при многих стрессовых воздействиях. Особенно важную роль межклеточный транспорт играет при вирусной инфекции, так как жизненный цикл вирусов растений включает в себя стадию транспорта из клетки в клетку. Нами поставлены эксперименты, позволяющие оценить влияние метанола, а также конкретных ГИМ на распространение вируса табачной мозаики (ВТМ).

В связи с тем, что в процессе роста и развития растения содержание эндогенного метанола в клетке меняется, нами был рассмотрен вопрос о влиянии уровня такого, не связанного со стрессом, метанола на регуляцию ГИМ. В данной работе также получены экспериментальные доказательства в пользу предложенного нами механизма регуляции синтеза метанола в растениях с участием ГИМ по типу обратной связи.

Цель и задачи. Основной целью представленной диссертационной работы является изучение участия ГИМ в росте и стрессовых реакциях растений. Поставленная цель достигается решением четырех задач:

1. Выявить гены *Nicotiana benthamiana*, экспрессия которых повышается в ответ на газообразный метанол и ответственных за рост и развитие листьев табака;
2. Исследовать участие ГИМ в регуляции плазмодесм и межклеточном транспорте макромолекул;
3. Исследовать механизм регуляции ГИМ в растениях по типу обратной связи с участием метанола.

Научная новизна. В представленной диссертационной работе впервые были описаны изменения в экспрессии генома растительной клетки в ответ на газообразный метанол в физиологических концентрациях. Были идентифицированы гены, чувствительные к метанолу, также был изолирован промотор, индуцируемый метанолом. ГИМ были найдены также среди генов, значимых для развития листа. Показано влияние ГИМ на регуляцию плазмодесмального транспорта, а также на чувствительность растения к вирусной инфекции, предложены механизмы такого влияния. Впервые была предложена схема регуляции гена, основанная на принципе обратной связи с участием метанола.

Теоретическая и практическая значимость работы. В работе собраны доказательства в поддержку гипотезы о новой функциональной роли метанола как регулятора иммунных реакций и, вероятно, онтогенеза листа, описаны эффекты и предложены механизмы действия

метанола. Предложена теоретическая схема обратной негативной регуляции ГИМ, универсальность которой может способствовать решению других задач в области биологии растений.

В практическом плане, обнаруженные закономерности активизации межклеточного транспорта могут быть использованы для усовершенствования систем продукции целевых белков в растении с помощью вирусных векторов на основе геномов вирусов растений. Найденные генетические маркеры растущих зон табака, а также изолированные последовательности промоторов растений, один из которых индуцируется метанолом, также могут быть использованы в биотехнологии.

Методология и методы исследования. Данная экспериментальная работа проводилась на хорошо изученных модельных растениях *Nicotiana benthamiana* и *Nicotiana tabacum*. Вычитающая подавляющая гибридизация была выполнена фирмой Евроген (Россия). Для создания генно-инженерных конструкций были использованы стандартные молекулярно-биологические методы; для трансформации растений был использован метод транзientной трансформации с помощью клеток *Agrobacterium tumefaciens*; ферментативные тесты и работа с белками осуществлялась по описанным ранее в литературе методам.

Положения, выносимые на защиту:

1. В геноме растений рода *Nicotiana* (*N. benthamiana* и *N. tabacum*) существует группа генов, индуцируемых газообразным метанолом (ГИМ);
2. Газообразный метанол способствует репродукции ВТМ в растении, что может быть вызвано взаимодействием белка NCAPP и транспортного белка ВТМ;
3. Гены группы ГИМ различаются по реакции на метанол, не связанный со стрессом. Среди ГИМ есть ген *SEOP*, экспрессия которого активируется в ответ на повышение эндогенного метанола, а также ген *NCAPP*, не реагирующий на изменения эндогенного метанола.
4. Регуляция гена *NCAPP* может осуществляться по механизму обратной связи в системе «*NCAPP*-ПМЭ-метанол-*NCAPP*», где *NCAPP*, индуцированный метанолом, осуществляет подавление синтеза ПМЭ и, следовательно, снижает уровень синтеза метанола растением.

Степень достоверности и апробация результатов. Результаты работы были представлены на конференциях: «EMBO Workshop: Intercellular communication in plant development and disease-2014», Бишофшем, Франция; Конференция «Ломоносов-2014», Москва, Россия; Конгресс «FEBS-2013», Санкт-Петербург, Россия; Конгресс «FEBS-2012», Севилья, Испания; Конгресс «FESPB-2010», Валенсия, Испания, а также на семинаре отдела химии и биохимии нуклеопротеидов НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского.

ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

Пектин и пектинметилэстераза: общие сведения

Клеточная стенка является границей контакта клетки высших растений с окружающей средой. Этим определяется её исключительная важность в процессах роста и развития растительной ткани, а также в реакции клетки на внешние стимулы. Протопласт определяет состав и структуру клеточной стенки в зависимости от стадии развития и условий среды, а также контролирует её целостность. Существуют доказательства того, что изменения в клеточной стенке приводят к активации сигнальных путей внутри клетки, однако, не все участники механизма обратной связи «клеточная стенка-протопласт» установлены (Pilling and Höfte, 2003).

В зависимости от вида растения, типа клетки, а также стадии её развития состав первичной клеточной оболочки значительно варьирует, однако он обязательно включает в себя полисахариды, такие как целлюлоза, пектин и гемицеллюлоза, а также структурные и регуляторные белки (рисунок 1).

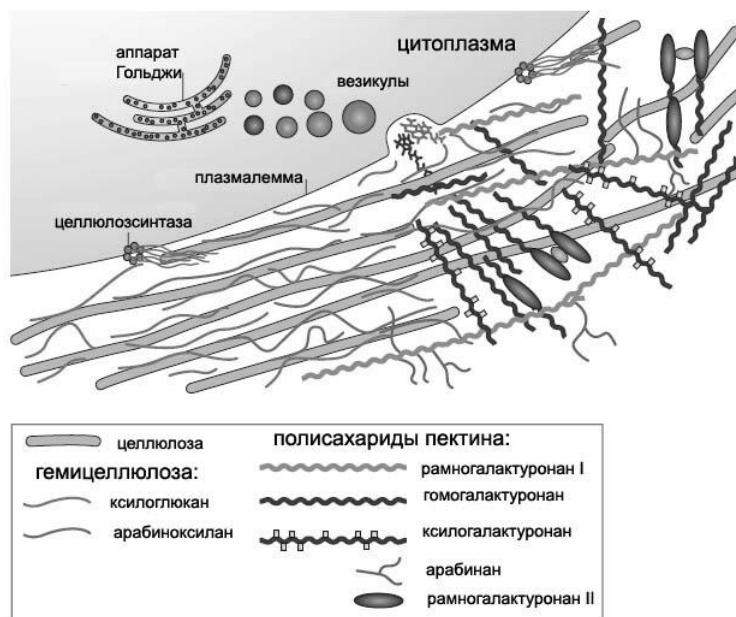
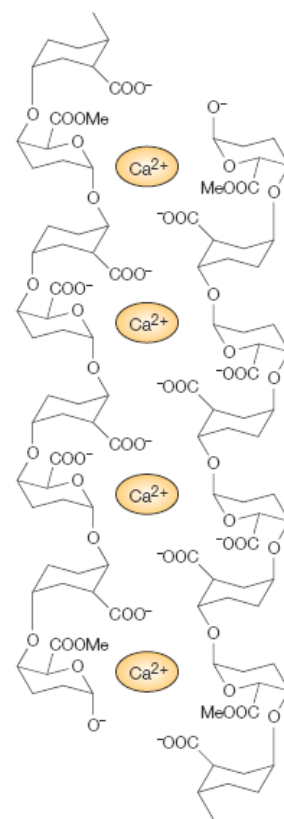


Рисунок 1. Синтез первичной клеточной стенки. Гексамерные комплексы целлюлозсинтазы на плазматической мембране синтезируют микроволокна целлюлозы. Гемицеллюлозы и пектин доставляются в клеточную стенку везикулами из аппарата Гольджи. В большинстве видов растений гемицеллюлозы – это, главным образом, ксилоглюкан и, в гораздо меньших количествах, арабиноксилан и маннан (на рисунке не представлен). Цепи пектина ковалентно связаны друг с другом. Ксилоглюкан и целлюлоза связаны с пектином ковалентными и нековалентными связями (Cosgrove, 2005, с разрешения издательства - лицензия №3571380628553).

Первичная клеточная стенка представляет собой каркас из микроволокон целлюлозы и ксиланоглюкана, погруженный в гелеобразную среду из пектина. Пектин состоит из рамногалактуронана I и гомогалактуронана, а также, в меньших количествах, из ксилогалактуронана, арабинана, арабиногалактана I и рамногалактуронана II. Основным компонентом пектина, гомогалактуронан, – это линейный полимер галактуроновых кислот, соединенных между собой α связью по месту 1→4 углеродных атомов. Пектин составляет 30-50% сухой массы первичных клеточных стенок растений (Cosgrove and Jarvis, 2012).

Пектин полимеризуется в цис-цистернах аппарата Гольджи, подвергается метилэтерификации в срединных цистернах и достраивается боковыми цепями в транс-цистернах. В клеточную стенку пектин секретируется в метилированном виде – около 75% карбоксильных групп гомогалактуронана метилэтерифицированы. Степень метилирования определяет физико-химические свойства пектина – деметилированный пектин способен образовывать ионные связи с ионами Ca^{2+} , сшивая, таким образом, полигалактуроновые цепи друг с другом (рисунок 2), что приводит, в частности, к повышению жесткости клеточной стенки. На момент секреции пектин находится в метилированном состоянии, сохраняя достаточную для роста клетки эластичность. Этот процесс регулируется специальными ферментами клеточной стенки – пектинметилэстеразами (ПМЭ, ЕС 3.1.1.11), способными освобождать карбоксильную группу от метильных групп.

Рисунок 2. Деметилирование карбоксильных групп С-6 атомов остатков галактуроновых кислот приводит к образованию ионных связей с кальцием, что приводит к изменению физико-химических свойств пектина (Cosgrove, 2005, с разрешения издательства - лицензия №3571380628553).



В некоторых типах растительных клеток по завершении роста между плазмалеммой и первичной клеточной стенкой начинает закладываться вторичная клеточная стенка. Состоит она, главным образом, из гемицеллюлоз (ксилана и глюкоманнана) и лигнина. Для многих двудольных растений характерна выраженная вторичная клеточная стенка в клетках ксилемы и флоэмы, а также в других тканях, требующих дополнительной механической жесткости, таких, например, как склеренхима (Zhong and Ye, 2014).

В строении клеточной стенки выделяют еще один слой - срединную пластинку, которая закладывается сразу при делении клетки и далее служит слоем, «склеивающим» первичные клеточные стенки соседних клеток. Срединная пластинка состоит в основном из пектина, уровень метилирования которого также регулируется (Knox et al., 1990).

За деметилирование пектина, как уже было отмечено, отвечают ПМЭ (рисунок 3). Ферменты ПМЭ обнаружены во всех исследуемых видах растений и типах растительных тканей. Во многих растениях на генетическом и белковом уровне идентифицировано множество изоформ ПМЭ, кодируемых большими мультигенными семействами – так, например, для *Arabidopsis thaliana* это 66 генов (Richard et al., 1996). Типичная последовательность гена *ПМЭ* обязательно включает участки, кодирующие сигнальные последовательности. Первоначально синтезируемый незрелый белок пре-проПМЭ «заякоревается» на эндоплазматическом ретикулуме, затем проПМЭ (без сигнального участка на N-конце) проходит через аппарат Гольджи и секретируется в апопласт. Наконец, непосредственно в клеточной стенке обнаруживается зрелая ПМЭ без сигнальных последовательностей.

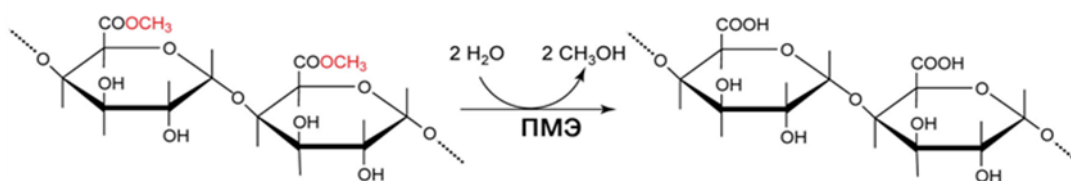


Рисунок 3. Реакция деэтерификации пектина, катализируемая ПМЭ, приводит к синтезу метанола.

Все гены *ПМЭ* можно поделить на два типа: первый представлен генами, содержащими два или три интрона и длинной последовательностью «про-» региона, а второй тип содержит пять-шесть интронов и короткую (или вовсе отсутствующую) «про-» последовательность. Гены второго типа структурно близки генам *ПМЭ* фитопатогенных организмов – грибов и бактерий. Функция «про-» региона ПМЭ является предметом дискуссий, существуют версии о том, что он служит фактором правильного сворачивания белка или ингибирует активность фермента до секреции в апопласт. Последняя гипотеза возникла из-за сходства «про-» домена ПМЭ с доменом ингибитора ПМЭ.

Изоформы ПМЭ различаются по биохимическим свойствам – у них разные изоэлектрические точки (соответственно, различают кислые, нейтральные и щелочные изоформы), молекулярные массы (от 25 до 54 кДа), степень гликозилирования,

термоустойчивость. В клеточной стенке активность конкретной ПМЭ может зависеть от pH, наличия катионов и степени метилирования субстрата. Для ПМЭ из яблок показано, что от кислотности среды зависит не только активность, но и механизм деэтерификации. При низких значениях pH фермент случайно отщепляет метильные группы от разных цепей, а при высоких значениях pH – последовательно отщепляет метильные группы с одной полисахаридной цепи (Denès et al., 2000).

Помимо указанных способов регуляции активности ПМЭ клетка кодирует белки-ингибиторы ПМЭ. Впервые ингибитор ПМЭ был выделен из киви (плодов *Actinidia chinensis*). В отличие от самой ПМЭ, которая практически неотделима от клеточных стенок, ингибитор легко экстрагируется из зрелых фруктов и является одним из наиболее представленных белков в растворимой фракции (Balestrieri et al., 1990). Позже ингибиторы ПМЭ были найдены и в других растениях, в том числе в *Arabidopsis thaliana* (Raiola et al., 2004). Стоит отметить, что активность ПМЭ также зависит от некоторых гормонов, таких как ауксин, гиббереллин и абсцизовая кислота. Для первых двух показан активирующий эффект, а абсцизовая кислота ингибирует ПМЭ в проростках кипариса (Micheli, 2001). Также можно говорить об активации транскрипции ПМЭ брассиностероидами (Wolf et al., 2012).

Учитывая многообразие механизмов регуляции деэтерификации, а также количество изоформ ПМЭ для каждого вида растений, можно заключить, что степень метилирования пектина в данной ткани и в данный момент времени имеет критическое значение в жизни растения.

Рост листа: sink и source зоны листа

Процесс онтогенеза листьев на анатомическом, физиологическом и биохимическом уровне достаточно хорошо изучен. В этом процессе важную роль играет переход листа из состояния, когда он использует углерод растения для собственного роста (sink лист), в состояние, когда он сам фотосинтезирует достаточно сахара и является донором углерода для других растущих зон растения (source лист).

Зафиксированный в source листьях углерод по флоэме перемещается в sink ткани, а избыток углерода запасается в виде сахарозы (в вакуолях) или крахмала (в хлоропластах). Транспорт сахаров может осуществляться пассивно по симпластному пути по градиенту концентрации или с помощью специальных белков-транспортеров по апопластному пути против градиента концентрации с затратой энергии (Ayre, 2011).

Известно, что в листьях табака распределение sink и source участков ассоциировано со специфическим строением плазмодесм (ПД). Для sink зон характерны первичные

неразветвленные ПД, а для source зон – сложные разветвленные, а также вторичные (то есть образованные *de novo*) ПД. Более того, для sink зон показан более активный межклеточный транспорт (Oparka, 1999). Такие зоны можно выделить на каждом листе, однако на листьях верхних ярусов sink зоной является почти вся листовая пластина, в то время как на листьях нижних ярусов лишь небольшая растущая базальная часть листа импортирует фотоассимиляты (Meng et al., 2001).

Комплексный сравнительный анализ транскриптомов и протеомов sink и source тканей не проводился, однако известно, что эти ткани отличаются содержанием сахаров (Roitsch, 1999). Именно поэтому большинство исследований в этой области относятся к изучению ферментов, связанных с метаболизмом сахаров в растительной клетке. Среди этих ферментов инвертазы клеточной стенки (катализируют расщепление сахарозы на глюкозу и фруктозу), сахарозасинтазы (катализируют расщепление сахарозы на фруктозу и уридиндифосфатглюкозу), сахарозафосфатсинтазы и сахарозафосфатфосфатазы (катализируют синтез сахарозы из уридиндифосфатглюкозы и фруктоза-6-фосфата, соответственно) и некоторые другие (Bihmidine et al., 2013).

Потенциально, концентрации сахаров – это ключевой фактор для sink-source перехода в растении. На сегодняшний момент идентифицировано множество генов разных растений, транскрипция которых регулируется сахарами. Среди них гены фотосинтеза, метаболизма углерода и азота, гены ответа на стресс, а также вторичного метаболизма. Для некоторых из этих генов выявлены регуляторные элементы промоторных областей, также определены основные регуляторы транскрипции, индуцируемой глюкозой (Lastdrager et al., 2014).

Также известно, что сигнальные пути, активируемые сахарами, через изоэнзим гексокиназы 1 пересекаются с сигнальными путями фитогормонов, таких как ауксин, цитокинин, этилен и абсцизовая кислота (Rolland et al., 2006).

Сравнительный анализ метаболитов в листьях тополя на разной стадии развития подтверждает данные о различающихся концентрациях сахаров. Еще можно отметить, что концентрации аминокислот для этой системы в зрелых листьях значительно ниже, что говорит о снижении уровня белкового синтеза. В растущих листьях можно выделить группу метаболитов с повышенной концентрацией, которые участвуют в формировании клеточных стенок (Jeong et al., 2004). Последний факт согласуется с данными о повышенных концентрациях метанола в молодых листьях фасоли (Nemecek-Marshall et al., 1995).

Модификация пектина в росте и развитии растения

Известно, что статус метилирования пектина в значительной степени определяет прочность и растяжимость клеточной стенки. Есть разные гипотезы относительно такого эффекта. Например, существует мнение, что пектин влияет на растяжимость клеточной оболочки косвенным образом: метилирование определяет плотность образуемого пектином геля и, таким образом, доступность микрофибрилл целлюлозы для нековалентных взаимодействий с гемицеллюлозами или для взаимодействия с разрыхляющим целлюлозу белком экспансином. Однако существуют свидетельства в пользу того, что ионные связи остатков галактуроновых кислот с Ca^{2+} сами по себе играют роль в регуляции растяжимости клеточной стенки (Peaucelle et al., 2012). В клеточных стенках мутанта *A. thaliana*, лишённого ксилоглюкана, растяжение клеточной оболочки происходит в присутствии хелаторов Ca^{2+} , а также ферментов, расщепляющих пектин. В растениях дикого типа такого не наблюдается, т.е. сшитые кальцием цепи пектина напрямую осуществляют поддерживающую функцию, наравне с ксилоглюканом. У таких мутантов пектин, вероятно, компенсирует механическую прочность, утерянную из-за отсутствия ксилоглюкана. Природный пример подобной ситуации – это харовая водоросль *Chara corallina*, для которой полигалактуроновая кислота является основным структурным полимером клеточной стенки. Для этой водоросли показан механизм взаимодействия между уровнем синтеза пектата и степенью растяжения клеточной оболочки. Вновь поставляемые остатки галактуроновой кислоты (а поставка зависит от внутриклеточного давления) в клеточной стенке захватывают ионы кальция, уменьшая количество ионных связей, что приводит к «провисанию» клеточной стенки (Proseus and Boyer, 2012). Последняя теория легла в основу математической модели процесса роста пыльцевой трубки (Rojas et al., 2011).

Существует еще немало примеров, подтверждающих участие реакции деэтерификации пектина в контроле роста растения. Например, было показано, что в гипокотиле *A. thaliana* ускорение роста клеток в процессе развития коррелирует с повышенным уровнем транскрипции ПМЭ. А подавление активности этого фермента с помощью сверхэкспрессии гена *ингибитора ПМЭ* приводит к нарушению развития зародышевого стебелька (Pelletier et al., 2010).

В апикальной меристеме побега активность ПМЭ является ключевым фактором при закладке органов растения. Иммуноцитохимический анализ показывает, что в конусе нарастания пектин находится в метилированной форме, однако в точках закладки примордия пектин подвергается деметилированию. Сверхэкспрессия гена *ингибитора ПМЭ* в данной системе подавляет образование примордия, в то время как сверхэкспрессия гена ПМЭ, напротив, индуцирует закладку органов на растущем побеге (Peaucelle et al., 2008). Методом

силовой атомной микроскопии на живой меристеме было показано, что зоны закладки листового примордия обладают отличными от окружающих показателями жесткости клеточной стенки. Этот показатель также меняется при сверхэкспрессии генов *ПМЭ* и *ингибитора ПМЭ* – клеточная стенка становится более мягкой или более жесткой, соответственно (Peaucelle et al., 2011). Эти факты подтверждают значимость пектина с точки зрения динамики клеточных оболочек, однако вступают в противоречие с уже упомянутой теорией об усилении пектина с помощью кальциевых ионных связей при дезэтерификации. Теоретически, такое несоответствие можно объяснить наличием дополнительных регуляторов, таких как, собственно, кальций, ионы других металлов или пектатлиазы (полигалактуроназы), которые могут расщеплять полигалактуронан после деметилирования.

Помимо указанных случаев с апикальной меристемой побега и растущей частью пыльцевой трубки влияние уровня метилирования пектина доказано для процесса роста корня. В такой системе в растущих клеточных стенках остатки галактуроновой кислоты метилированы, а в созревших – деметилированы. Экспериментальные изменения уровня синтеза ПМЭ или её ингибитора приводят к изменениям в морфологии корня (Dolan et al., 1997).

Экспрессия гена *ПМЭ* при стрессовом воздействии на растение

ПМЭ – обязательный компонент клеточной стенки, которая является первым звеном защиты при абиотическом и биотическом стрессе. Этот факт дает основания предполагать, что ПМЭ может участвовать в механизмах рецепции стрессового воздействия и ответа на него. Литературные данные по изменению транскрипции генов семейства *ПМЭ* при поражении фитопатогенами приведены в таблице 1.

Гены	Вид стресса	Фитопатоген/опытное растение	Влияние на транскрипцию генов	Ссылка
<i>AtPME17</i> <i>AtPMEPCRIF</i> (61)	тля	<i>Brevicoryne brassicae/Arabidopsis thaliana</i>	активирует	Kuśnierczyk et al., 2008
<i>AgPME</i>	тля	<i>Myzus persicae/ Apium graveolens</i>	активирует	Divol et al., 2005
<i>AtPME17</i> <i>AtPMEPCRA</i> (18)	белокрылка	<i>Bemisia tabaci/Arabidopsis thaliana</i>	активирует подавляет	Kempema et al., 2007
<i>AtPME32</i> <i>AtPMEPCRA</i> (18)	насекомое-фитофаг	<i>Spodotera littoralis/ Arabidopsis thaliana</i>	активирует	Consales et al., 2012

<i>AtPME44</i>	насекомое- фитофаг	<i>Pieris brassicae/Arabidopsis thaliana</i>	подавляет	Little et al., 2007
<i>NaPME</i>	насекомое- фитофаг	<i>Manduca sexta/Nicotiana attenuata</i>	активирует	von Dahl et al., 2006
<i>AtPME</i> <i>AtPME17</i>	нематода	<i>Meloidogyne javanica/Arabidopsis thaliana</i>	активирует подавляет	Barcala et al., 2010
<i>AtPME3</i>	нематода	<i>Heterodera schachtii/Arabidopsis thaliana</i>	активирует	Hewezi et al., 2008
<i>LePME</i>	нематода	<i>Globodera rostochiensis/Solanum lycopersicum</i>	активирует	Uehara et al., 2007
<i>AtPME2</i> <i>AtPME17</i>	нематода	<i>Heterodera schachtii/Arabidopsis thaliana</i>	подавляет подавляет	Puthoff et al., 2003
<i>AtPME3</i>	бактерия	<i>Pectobacterium carotovorum/Arabidopsis thaliana</i>	активирует	Raiola et al., 2011
<i>AtPME3</i>	гриб	<i>Botrytis cinerea/Arabidopsis thaliana</i>	активирует	Raiola et al., 2011
<i>AtPME3</i>	гриб	<i>Alternaria brassicola/Arabidopsis thaliana</i>	активирует	Narusaka et al., 2005
<i>AtPME3</i>	гриб	<i>Alternaria alternata/Arabidopsis thaliana</i>	активирует	Narusaka et al., 2005
<i>LuPME3</i>	гриб	<i>Fusarium oxysporum/ Linum usitatissimum</i>	подавляет	Wojtasik et al., 2011
<i>MtPME</i>	гриб	<i>Glomus mosseae/ Medicago truncatula</i>	активирует	Hohnjec et al., 2005
<i>SrPME1</i>	бактерия	<i>Azorhizobium caulinodans/ Sesbania rostrata</i>	активирует	Lievens et al., 2001
<i>StPME</i>	вирус	PVY(NTN)/ <i>Solanum tuberosum</i>	подавляет	Baebler et al., 2009
<i>AtPME3</i>	вирус	TuMV/ <i>Arabidopsis thaliana</i>	подавляет	Yang et al., 2007
<i>AtPMEPCRA (18)</i>	вирус	CaLCuV/ <i>Arabidopsis thaliana</i>	подавляет	Ascencio-Ibáñez et al., 2008

<i>AtPMEPCRA (18)</i>	вирус	CMV, TuMV, PVX/ <i>Arabidopsis thaliana</i>	активирует	Whitham et al., 2003
<i>VuPME</i>	Растение- паразит	<i>Striga gesnerioides/ Vigna inquilata</i>	активирует	Huang et al., 2012

Таблица 1. Описанные в литературе случаи влияния фитопатогена на транскрипцию генов из семейства *ПМЭ* (модифицировано из Senechal et al., 2014, с разрешения издательства – лицензия № 500970807)

Разные условия постановки экспериментов, ссылки на которые даны в таблице, не позволяют делать каких-либо значительных обобщений. В целом, в большинстве случаев *ПМЭ* активируется в ответ на стресс, при этом, если разбивать опыты по типам стресса и делать вывод по каждой из таких групп, то о подавлении транскрипции гена *ПМЭ* можно говорить лишь в случае с вирусами. Стоит отметить, что при вирусной инфекции, в сравнении с другими типами стресса, клеточная стенка в наименьшей степени подвержена механическому воздействию.

Чувствительность транскрипции гена *ПМЭ* к такому широкому спектру стрессов, поставила вопрос о механизмах участия этого фермента в защите растений. Многочисленные эксперименты, в которых уровень метилирования пектина увеличивается или уменьшается за счет изменения транскрипции гена *ПМЭ* или гена ее ингибитора, показывают, что устойчивость растений растет при увеличении уровня метилирования пектина (см., например, Wydra and Berі, 2006). Среди гипотез, объясняющих эти явления, можно выделить три основных. Во-первых, это изменение физико-химических свойств клеточной стенки в результате активности *ПМЭ*, а именно, повышение жесткости и кислотности, что приводит к снижению эффективности фитопатогена. Во-вторых, это косвенное участие *ПМЭ* через влияние на другие ферменты клеточной стенки или производные пектина, вовлеченные в иммунитет, такие как олигогалактуроновые кислоты (ОГК), например. Дело в том, что гликозидные связи полигалактуроновой кислоты могут быть разорваны гликозидгидролазами (полигалактуроназами), позволяя продолжить разрушение цепи пектатлиазам с образованием олигогалактуроновых кислот. Активность указанных лиаз зависит от кислотности среды, которая может быть изменена *ПМЭ*. ОГК достаточно хорошо изучены, в частности известно, что эффективность ОГК определяется степенью метилирования составляющих их кислотных остатков, зависящей от *ПМЭ* (Sonja Vorwerk, 2004). И, наконец, третья гипотеза заключается в

том, что ПМЭ влияет на иммунитет растений посредством метанола – единственного низкомолекулярного продукта её активности (Komarova et al., 2014a).

Метанол растительной клетки: происхождение и метаболизм

Все растения синтезируют метанол в процессе формирования клеточной стенки, и чаще всего в литературе этот спирт представляется побочным продуктом жизнедеятельности растительной клетки. В масштабе планеты растения являются основным источником метанола, давая около 2/3 частей всего атмосферного метанола, что составляет от 100 до 128 тераграмм в год. Такие оценки приводятся только для метанола из растущих тканей, без учета метанола, образующегося в процессе пиролиза древесины при лесных пожарах (Galbally and Kirstine, 2002). Синтез метанола в растении происходит, главным образом, в процессе деметилирования пектина ПМЭ. Максимумы эмиссии приходятся на период активного роста корней, листьев и плодов растений, то есть во время максимальной активности ПМЭ. Для широколиственных лесов пиковые значения эмитированного метанола детектируются весной, во время интенсивного вегетативного роста (Karl et al., 2003). Для плодов томата на генетическом уровне были получены прямые доказательства того, что именно ПМЭ контролирует уровень синтеза метанола в тканях (Frenkel et al., 1998).

Существуют и другие потенциальные источники метанола в растениях. При повреждении белков остатки аспарагина могут превращаться в D-аспартат, репарация таких участков происходит с помощью L-изоаспартилметилтрансферазы, которая катализирует реакцию переноса метильной группы с S-аденозинметионина на карбоксильную группу D-аспартата, что приводит к последующему образованию L-аспартил группы и метанола. Активность L-изоаспартилметилтрансферазы очень низка [менее 1 пмоль в минуту на мг белка (Mudgett and Clarke, 1994)] в сравнении с активностью ПМЭ [1-20 мкмоль в минуту на мг белка (Gaffe et al., 1994)], что позволяет в дальнейшем в данной работе не учитывать этот источник метанола.

Лигнин также может служить источником метанола при разложении древесины грибами и бактериями. Однако, деэтерификация лигнина требует ряда специальных ферментов, и нет оснований полагать, что подобные процессы происходят при нормальном росте и развитии растения (Pollegioni et al., 2015).

Часть синтезированного метанола метаболизируется растительной клеткой. С помощью радиоактивного изотопа C^{14} (Cossins, 1964) и спектроскопии ядерного магнитного резонанса на ядрах C^{13} (Gout et al., 2000) было установлено, что в растении метанол окисляется по схеме: метанол → формальдегид → метановая кислота → CO_2 . Биохимическая основа первой ступени приведенной схемы неясна, на сегодняшний день отсутствуют экспериментальные данные об

участии растительной алкогольдегидрогеназы (АДГ, ЕС 1.1.1.1) в метаболизме метанола. Интересно, что ген АДГ *A.thaliana*, индуцируется при гипоксии, обезвоживании и при холодовом стрессе (Dolferus et al., 1994). У растений отсутствуют метанолоксидазы (ЕС 1.1.3.13), которые окисляют метанол в метилотрофных организмах, а пероксидазы обладают высокой субстратной специфичностью и, скорее всего, также не участвуют в окислении метанола. Низкие значения скорости метаболизма метанола [0,2 мкмоль в минуту на грамм свежей массы в культуре клеток клена (Gout et al., 2000)] дают основания полагать, что формальдегид образуется неэнзиматически с помощью активных форм кислорода.

Показано, что в последующем окислении формальдегида до муравьиной кислоты участвует формальдегиддегидрогеназа (ФДГ, ЕС 1.1.2.84, Achkor et al., 2003). Стоит отметить, что формальдегид образуется в клетке не только при окислении метанола, но и при окислительном деметилировании аминокислот или, например, в результате активности цитохрома P450 (Clejan and Cederbaum, 1993). Формальдегид – гораздо менее стабильная молекула, чем метанол, в клетке он быстро вступает в реакцию с нуклеофильными глутатионом, аспарагином или аргинином. Через формальдегид метанол может включаться в метаболизм одноуглеродных соединений (фолатный цикл), с последующим включением в разнообразные анаболические пути, например пути синтеза пуриновых оснований (Gout et al., 2000).

Метановая (муравьиная) кислота – следующий продукт окисления метанола, её обнаруживают среди ЛОС, синтезируемых растениями (Stavrakou et al., 2012). В клетке существуют альтернативные окислению формальдегида источники муравьиной кислоты – это неэнзиматическое декарбоксилирование глиоксиловой кислоты. Окисление метановой кислоты до углекислого газа осуществляется с помощью формиатдегидрогеназы (ЕС 1.2.1.2), а также пероксидом водорода, уровень которого регулируется активностью каталазы (Igamberdiev, 2002). Стоит отметить, что синтез формиатдегидрогеназы индуцируется абиотическими стрессами, а также при обработке листьев формальдегидом или метанолом (Hourton-Cabassa et al., 1998). Муравьиная кислота может также входить в фолатный цикл через 10-формилтетрагидрофолат. Конечный продукт окисления метанола – углекислый газ – фиксируется растительной клеткой в цикле Кальвина.

Сравнительно недавно было показано, что метанол может быть ацетилирован с помощью ацетил-коэнзима А с образованием летучего метилацетата (Jardine et al., 2014). Также метанол метаболизируется метилотрофными бактериями, обитающими на поверхности листьев (Holland, 2003), однако по литературным данным количество метанола, которые они поглощают в природных системах, сложно оценить. В некоторых экспериментальных системах

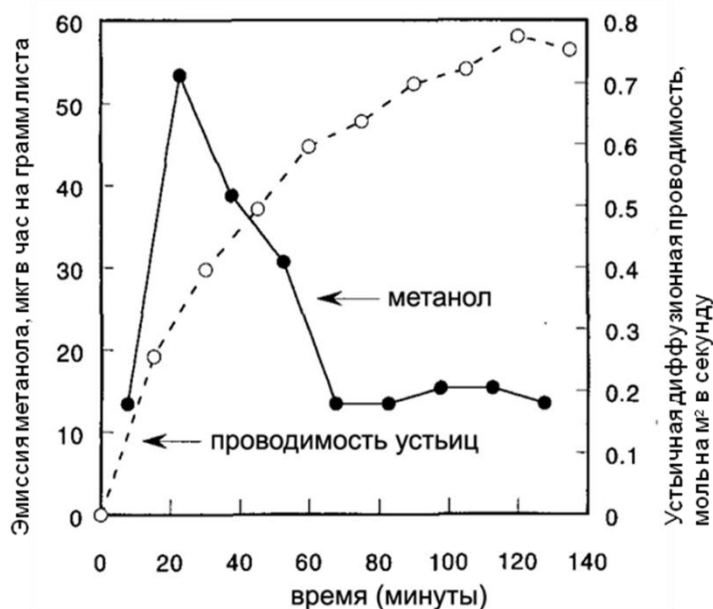
метилотрофные бактерии приводят к сокращению эмиссии метанола растением в десятки раз (Abanda-Nkpwatt et al., 2006).

Выше были описаны пути окисления метанола в растительной клетке, однако стоит учитывать, что метаболизируется лишь небольшая его часть, остальной метанол эмитируется в атмосферу. При этом период полураспада метанола в атмосфере – 12 дней, что выше, чем для большинства летучих органических соединений растений (Ciccioli et al., 2014).

Эмиссия метанола растением

Зрелая ПМЭ находится в апопласте, к которому относят все, что находится вне протопласта. Таким образом, образовавшийся метанол может находиться в газообразном или растворенном виде. Плазмалемма не препятствует диффузии этого низкомолекулярного спирта (Gout et al., 2000). Разделение метанола по фазам происходит мгновенно из-за большой площади соприкосновения фаз, а соотношение растворенного и газообразного метанола определяется коэффициентом Генри для этого вещества $0,461 \text{ Па м}^3 \text{ моль}^{-1}$ при 25°C (Niinemets, 2003). Согласно закону Генри, концентрация газа в растворе прямо пропорциональна парциальному давлению этого газа над раствором с постоянным для каждого вещества коэффициентом (при постоянной температуре). В работе, в которой впервые были получены доказательства эмиссии метанола листьями, была показана зависимость между уровнем эмиссии и активностью газообмена в устьицах (MacDonald, 1993). Данные наблюдения были подтверждены и расширены экспериментами, в которых активность газообмена (диффузионная проводимость) в устьицах искусственно менялась. Например, закрытие устьиц, вызванное добавлением абсцизовой кислоты, значительно снижало эмиссию метанола (Nemecsek-Marshall et al., 1995). После продолжительной темновой фазы, в результате которой устьица смыкаются, при последующем освещении (устьица начинают открываться) можно наблюдать пиковые выбросы газообразного метанола, накопившегося за время инкубации в темноте (рисунок 4).

Рисунок 4. Пик эмиссии метанола листом *Phaseolus vulgaris* в утренние часы. На графике также показано увеличение диффузионной проводимости устьиц (их открытие) при воздействии света (Nemecsek-Marshall et al., 1995, с разрешения издательства, лицензия № 66163405).



Эти данные позволили сформулировать общую теорию контроля эмиссии летучих органических веществ листьями, согласно которой для веществ с большой растворимостью, таких как метанол, уровень эмиссии значительно зависит от степени открытости устьиц. Когда устьица закрыты, метанол накапливается в жидкой фазе, и пики эмиссии связаны именно с активным переходом этого метанола в газообразную фазу. Другие факторы, влияющие на эмиссию – это температура, влажность и другие физико-химические параметры, а также, что особенно важно, уровень синтеза вещества (Niinemets, 2003). Эта теория была подтверждена в дальнейшем замерами уровня эмиссии, а также концентрации метанола в соке в течение светового дня для листьев тополя и сорго. Для этих растений пики эмиссии приходились на начало светового дня, когда устьица открываются, результаты согласовались с математическим моделированием этой системы (Harley, 2007). Замеры в полевых условиях на лугах люцерны давали аналогичный результат с поправкой на изменение влажности и температуры (Warneke et al., 2002).

Что касается количественных данных, то значения эмиссии метанола сильно варьируют. Для зрелых (самых молодых полностью сформированных) листьев широколиственных видов деревьев это значения от 1,5 до 15 мкг на грамм свежей массы в час, для хвойной *Abies concolor* – 1,6 мкг г⁻¹ час⁻¹. Различные зерновые культуры дают значения эмиссии от 2,2 до 46 мкг г⁻¹ час⁻¹ (MacDonald et al., 1993). Листья *Populus deltoides* испускают 10-15 мкг метанола г⁻¹ час⁻¹ для зрелого листа и 1-2 мкг г⁻¹ час⁻¹ для стареющего листа. Эмиссия метанола молодого и старого листа на одном побеге фасоли отличается примерно в 4 раза (Nemecsek-Marshall et al., 1995). Листья *Quercus ilex* выделяют в атмосферу 0,5-4,5 мкг г⁻¹ час⁻¹ метанола (Holzinger et al., 2000). Значения дневной эмиссии зрелых листьев деревьев варьирует от 0,2 до 3,2 мкг г⁻¹ час⁻¹, в то время как для растущих листьев достигает 38 мкг г⁻¹ час⁻¹. Для хвойных деревьев, в той же работе, значения гораздо ниже – от 0,2 до 1,2 мкг г⁻¹ час⁻¹, а для травянистых растений – гораздо выше (4,5-6 мкг г⁻¹ час⁻¹) (Harley, 2007).

Из описанных в литературе немногочисленных данных можно отметить, что эмиссия метанола снижается в процессе созревания растительной ткани. Также было показано, что активность эмиссии метанола коррелирует с активностью роста листа (Huve et al., 2007). Сразу отмечу, что указанные порядки эмиссии метанола совпадают с порядками эмиссии других летучих органических веществ листа, например, терпеноидов (Harley et al., 2014).

Помимо эмиссии, метанол, как любое другое ЛОС может быть поглощён листом из окружающей среды. Направление потока метанола «из» или «в» межклеточное пространство определяется уровнем синтеза и предсуществующей концентрацией в листе, концентрацией метанола в среде, уровнем фиксации метанола в клетке (окисления, главным образом), физическими условиями, диффузионной проводимостью устьиц. Теоретическая возможность

потока метанола в лист из среды была доказана с помощью математических моделей (Niinemets et al., 2014), замеры в полевых условиях показали, что такое поглощение метанола действительно возможно (Karl et al., 2004).

Для листьев разного возраста, помимо разницы в эмиссии, показана разница в содержании метанола в соке. Так молодые листья фасоли содержат $26,8 \pm 14,6$ мкг метанола на грамм свежей массы, а старые листья тех же растений $10,0 \pm 3,8$ мкг метанола на грамм свежей массы (Nemecek-Marshall et al., 1995).

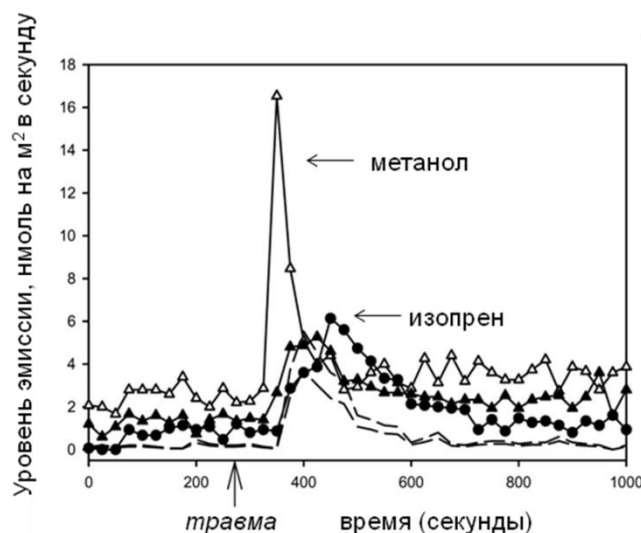
Эмиссия метанола в условиях стресса

Показано, что листья выделяют газообразный метанол в ответ на различные стрессы. Среди многочисленных литературных данных можно выделить группу публикаций, в которых описаны резкие выбросы метанола при сенокосе. Например, для альпийских лугов сенокос вызывает увеличение эмиссии метанола примерно в 15 раз в сравнении с максимальными эмиссиями в условиях нормального роста. В такой ситуации, вероятно, в атмосферу попадает метанол, накопленный в клеточном соке (Hörtnagl et al., 2011). Однако можно связать это явление также с активацией ПМЭ вследствие увядания растений (Kang et al., 2011) или механической травмы растительных тканей. Активация ПМЭ при механическом стрессе показана с помощью измерений уровня эмиссии метанола отдельных растений *N. attenuata* при повреждении дыроколом в лабораторных условиях (von Dahl et al., 2006).

Известно, что даже повреждение деревьев дождем приводит к повышению концентрации метанола в хвойном лесу (Fall and Benson, 1996). Также растения отвечают увеличением эмиссии метанола на холодовой стресс и гипоксию (Yoshiko Fukui, 1998).

Во всех работах, посвященных изучению синтеза ЛОС растениями при механической травме, отмечают пиковые значения эмиссии метанола на первых минутах после травмы, как например это показано для двух видов злаковых (Brilli et al., 2011; Loreto et al., 2006) (рисунок 5).

Рисунок 5. Эмиссия ЛОС после повреждения листа тростника. На графике представлены изопрен, метанол, ацетальдегид (черные треугольники), цис-3-гексен-1-ол и его производные (пунктирные линии) (Loreto et al., 2006, с разрешения издательства – лицензия № 3571400870133).



Интересно, что пик эмиссии метанола наблюдается в месте повреждения и не детектируется на расстоянии 5-8 см от места травмы. Кратковременность пика говорит о том, что это выброс растворенного в растительном соке метанола, а не метанола, синтезированного *de novo*. В другом исследовании, где табак был обработан озоном, можно наблюдать две волны метанольной эмиссии. Вторая волна может быть связана с выбросом уже вновь синтезированного метанола, её максимум приходится на 7-8 часов после стрессового воздействия (Beauchamp et al., 2005). Ответ растения на озон по механизму действия совпадает с реакцией сверхчувствительности, поэтому в биологии растений эту систему широко используют для изучения сигнальных путей иммунного ответа. Так что по результатам последней упомянутой работы можно предположить, что синтез метанола будет повышаться в ответ на большинство видов стресса.

В подтверждение этому можно привести данные о реакции растений на биотический стресс. Была показана индукция эмиссии метанола при атаке листьев дикого табака гусеницами бражника (von Dahl et al., 2006), а также при поедании листьев *Succisa pratensis* гусеницами *Euphydryas aurinia* (Peñuelas et al., 2005). Для экспериментальной системы с табаком также известно, что при поедании листьев гусеницами метанол синтезируется в результате повышенной активности ПМЭ (Körner et al., 2009).

Чаще всего метанол выделяется в атмосферу в ансамбле с другими ЛОС (как, например, видно на рисунке 5). Ограниченность информации относительно метанола при обширности данных для других соединений связана с методологическими трудностями. Стандартный для экологов растений метод исследования ЛОС – это газовая хроматография в сочетании с ионным источником масс-спектрометра. Такой метод не подходит для детекции метанола из-за низкой молекулярной массы этого вещества, низкой температуры кипения и высокой растворимости. Современные методы масс-спектрометрии решили эту проблему (von Dahl et al., 2006), однако функция газообразного метанола до сих пор не ясна. Для некоторых ЛОС с подобным метанолу характером эмиссии показана сигнальная функция.

Летучие органические соединения растений с сигнальной функцией

На сегодняшний день сигнальные функции ЛОС растений показаны для летучих компонентов зеленого листа (ЛЗЛ), терпенов и летучих форм фитогормонов: метилжасмоновой (МЖК) и метилсалициловой кислот (МСК), а также этилена.

Класс ЛЗЛ – это группа C₆ соединений, включающая в себя альдегиды (например, транс-2-гексеналь), спирты (например, цис-3-гексен-1-ол) и эфиры (например, цис-3-гексенилацетат). При повреждении мембран липоксигеназа окисляет C₁₈ жирные кислоты, после чего они

расщепляются гидроксипероксидлиазами, давая в конечном итоге ЛЗЛ. Эти соединения, имеющие характерный запах свежескошенной травы, эмитируются растениями при механической травме или атаке насекомых-фитофагов (Yan and Wang, 2006). Качественно и количественно такие эмиссии сравнимы с пиковыми эмиссиями метанола. Так же как и метанол первой волны, накопленные в ткани ЛЗЛ, вероятно, пассивно диффундируют из межклеточного пространства поврежденного листа. Интересно, что эти С6-соединения синтезируются не только в зоне травмы, но и в соседних интактных зонах (Kessler and Baldwin, 2002).

Терпены представляют собой многочисленную группу вторичных метаболитов, состоящую из примерно 40000 соединений, включая, по меньшей мере, 1000 монотерпенов и 6500 полуторатерпенов (Yu and Utsumi, 2009). Стоит отметить видоспецифичность набора этих соединений для растений, что отличает терпены от остальных классов ЛОС, которые более универсальны в растительном царстве.

Показано, что терпены и ЛЗЛ несут сигнальную функцию при атаке насекомых на растения. Они действуют как молекулы непрямой защиты, привлекая природных врагов насекомых (Turlings et al., 1990), и как молекулы прямой защиты, действуя как репеллент (De Moraes et al., 2001). Вероятно, соединения этих классов также служат сигналом о стрессе, передающимся от растения к растению (Farmer, 2001).

МЖК – это метиловый эфир жасмоновой кислоты, который является важным компонентом сигнальной системы растений при механической травме и поражении насекомыми листьев растения. Обработка интактного растения этим гормоном в лабораторных условиях приводит к накоплению в листьях глюканаз (Akiyama et al., 2009) и ингибиторов протеиназ (Farmer and Ryan, 1990), что является признаком активации защитных систем растения. Для МЖК показана возможность передачи сигнала между растениями разных видов (Farmer and Ryan, 1990). Но, надо сказать, этот пример не является исключительным. Описано немало фактов межвидовой передачи сигнала о стрессе, но в таких взаимодействиях, вероятно, участвуют наиболее универсальные из ЛОС (Karban et al., 2003).

МСК является летучим метильным производным салициловой кислоты, которая регулирует приобретенную системную устойчивость растений (Vlot et al., 2008). МСК синтезируется в ответ на повреждение тлей (Mann et al., 2012), а также при заражении растения ВТМ (Vlot et al., 2008), однако не эмитируется при механическом стрессе (Shulaev, 1997). На сегодняшний день установлено, что МСК является ключевым мобильным сигналом в системной устойчивости и способен передаваться на значительные расстояния (Cart et al., 2010).

Этилен – это еще один гормон, который может быть передан в летучей форме. Путь биосинтеза этилена начинается с метионина и проходит через стадию окисления 1-

аминоциклопропан-карбоновой кислоты (АКК). Ключевые ферменты его синтеза – АКК синтаза и АКК оксидаза (Bleecker and Kende, 2000). Показано, что этот гормон участвует в регуляции устойчивости к некротрофным патогенам, в ответе на затопление и засуху. Этилен участвует во многих процессах, включая рост и развитие растения, созревание плодов, привлечение опылителей (Pieterse et al., 2009).

Многообразие выделяемых растениями ЛОС и производимых ими эффектов позволили выдвинуть гипотезу о химическом языке растений, который позволяет им передавать друг другу информацию об изменениях среды. Очевидно, что для осуществления этого, ЛОС из «лексикона» растения должно быть, во-первых, синтезировано в нужный момент (момент стресса или в критический момент развития) и, во-вторых, ЛОС должно быть принято соседними растениями (Baldwin et al., 2006). Прием сигнальной молекулы ведет к изменениям в метаболизме и экспрессии генов интактного растения. В литературе описаны факты активации транскрипции генов белков, задействованных в механизмах устойчивости, таких как хитиназы, тауматин-подобные белки, липоксигеназы и некоторые другие (Arimura et al., 2000; Bate and Rothstein, 1998; Frost et al., 2008), в ответ на ЛОС, ассоциированные с биотическими стрессами.

Летучие органические соединения и вирусная инфекция

Как было показано, эмиссия ЛОС сопровождает механическую травму растений. В то же время травма – это обязательное условие попадания вируса в растительную клетку. Таким образом, в природе вирусная инфекция развивается на фоне повышенных концентраций летучих соединений растений. Это дает основание предполагать, что в ходе эволюции ЛОС (или связанные с ними сигнальные пути) вошли в стратегию выживания вируса или в стратегию устойчивости растения.

Попадание вирусных частиц в растительную клетку может происходить с микроповреждениями листовой кутикулы, трихом и клеточных стенок вследствие ветра, града, дождя, активности животных или атаки насекомых-фитофагов. Попадая в клетку, вирус «раздевается», и высвобожденный генетический материал может обеспечить синтез вирусных белков и репликацию вирусного генома (Shaw, 1999). Репликация в первично инфицированной клетке приведет к системной инфекции лишь в случае, если вирус попадет в соседние клетки. Обычно с вирусной геномной или субгеномной РНК транслируется также транспортный белок (ТБ), который позволяет вирусу проходить через плазмодесмы – цитоплазматические тяжи между клетками. Межклеточный транспорт осуществляется вирусом в виде рибонуклеопротеинового комплекса (Citovsky et al., 1990; Dorokhov et al., 1983) или в виде собранных вирусных частиц (van Lent et al., 1991). Для дальнейшего заражения вирус

перемещается из клеток мезофилла в сосуды и с флоэмным током разноситься по растению (Vuorinen et al., 2011).

Количество публикаций, касающихся темы связи между ЛОС и вирусной инфекцией, очень ограничено. Известно, что вирус скручивания листьев картофеля вызывает повышенную эмиссию растением одиннадцати ЛОС, среди которых цис-2-гексен-1-ол, нонан и другие. Примечательно, что Х-вирус картофеля и Y-вирус картофеля не оказывали такого эффекта (Eigenbrode et al., 2002). Также на табаках было показано, что вирус мозаики огурца индуцирует синтез этилена (Chaudhry, 1998).

В литературе есть данные и об обратной связи, то есть о влиянии ЛОС на вирусную инфекцию. В одной из работ было показано, что растения табака, зараженные вирусом табачной мозаики (ВТМ) синтезировали МСК, чего не наблюдалось для здоровых и поврежденных, но не инфицированных, растений. Более того, в проточной системе, когда воздух из емкости с зараженным растением поступал к интактному табаку, выяснилось, что выделяемая зараженным табаком МСК вызывала устойчивость интактных растений (Shulaev, 1997). Индукция МСК вирусной инфекцией была показана и в других лабораториях, например в экспериментах с листьями *Lycopersicon esculentum*. Интересно, что в этом исследовании МСК индуцировала повышенный синтез МСК в здоровых листьях (Deng et al., 2004). В дальнейшем было показано, что для принятия сигнала МСК интактным растением необходим фермент, отщепляющий метильную группу от МСК, переводя её в растворимую форму (Park et al., 2007). Про механизм активации защиты салициловой кислотой известно, что она действует, в частности, через подавление плазмодесмального транспорта (Wang et al., 2013). А как уже отмечалось, ключевым этапом вирусной инфекции является именно переход из клетки в клетку.

Механизмы межклеточного транспорта вируса очень разнообразны, при этом часто вирус включается в пути транспорта макромолекул растения-хозяина (Leisner and Turgeon, 1993). Плазмодесмальный транспорт в растении строго регулируется, так как это основной путь координации друг с другом изолированных клеточной стенкой протопластов. Для характеристики эффективности транспорта в научной литературе общепринята характеристика SEL (size exclusion limit), или апертура. Эта прикладная величина, которая указывает максимальный молекулярный вес или гидродинамический радиус молекулы, способной пройти через ПД. Основным регулятором диффузионного (неспецифического) транспорта является каллоза, которая откладывается в просвете ПД. При расщеплении каллозы β -1,3-глюканазами апертура увеличивается, а при синтезе каллозсинтазами – уменьшается (Zavaliev et al., 2011). Среди других регуляторов ПД можно отметить группу ПД локализованных белков (например, PDLP5 – plasmodesmata located protein 5), обратимо гликозилируемые полипептиды RGP (reversibly glycosylated polypeptides) 1 класса, активные формы кислорода и некоторые другие

молекулы (Sager and Lee, 2014). Другой тип регуляторов – белки NCAP (non-cell-autonomous proteins). Это транскрипционные факторы (например, SHR и KNOX (Han et al., 2014)), которые синтезируются в одной клетке, а влияют на экспрессию генов в другой, осуществляя таким образом координацию процессов роста и морфогенеза. Они способны менять апертуру плазмодесм, однако механизмы, лежащие в основе этого, неясны. Показано, что транспорт NCAP белка CmPP16 происходит с помощью белка NtNCAPP1 (Lee, 2003). Все упомянутые белки-регуляторы – это потенциальные мишени для транспортных белков (ТБ) вирусов.

Что касается метанола, то данных о его связи с вирусной инфекцией в литературе нет, однако стоит отметить, что есть работы, в которых доказана связь между вирусной инфекцией и ПМЭ – основным регулятором эмиссии метанола (Bubici et al., 2014). Вероятнее всего, это связано с взаимодействием в клетке молекулы ПМЭ и ТБ вируса, как, например, показано для BTM (Chen et al., 2000, Dorokhov et al., 1999)

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Используемые растения

Растения *N. benthamiana* и *N. tabacum* сорт Samsun (nn) выращивали в горшках со смесью листовой земли, перегноя, торфа и песка в одинаковых условиях в теплице с контролируемой температурой 25/18°C при чередовании день/ночь 16/8 часов. В экспериментах использовали растения, имеющие возраст 11–12 недель и 5–6 истинных листьев.

Нозерн-блот анализ

Механическую травму наносили натираем листа суспензией абразивного материала целита в 10 mM натрий-фосфатном буфере. Пробы тотальной фракции РНК были взяты до травмы, и через час, три, восемь часов после травмы. Выделение РНК производили с помощью TRI Reagent (MRC, США). Денатурированная РНК (5 мкг на дорожку) была разделена в 1,5% агарозном геле, содержащем 10% - формальдегид в MOPS-буфере, pH 7,0 при напряжении 55 В в течении 2-3 часов и перенесена на Hybond-N+ нейлоновую мембрану (Amersham, США). После этого, мембрану высушивали и «пришивали» РНК УФ-светом. Затем мембрану окрашивали раствором метиленового синего (4,1% ацетат натрия, 0,04% метиленовый синий, 5% уксусная кислота) для оценки количества РНК.

Предгибридизацию (инкубацию в блокирующем растворе) осуществляли в течение 1 часа при постоянном перемешивании при 65°C в буфере, который содержал 6-кратный SSC, 5-кратный раствор Denhardt (50-кратный раствор Denhardt содержит 1% фикола, 1% поливинилпирролидона, 1% БСА), 0,5% ДСН и ДНК из тимуса теленка из расчета 100 мкг/мл, при этом раствор ДНК перед добавлением в буфер инкубировали 10 мин при 95°C и 5 мин во льду.

Гибридизацию с одноцепочечным анти-ПМЭ ДНК-зондом [получен методом ПЦР, проведенной с меченным P³² дезоксиаденозинтрифосфатом, с использованием ДНК-матрицы (последовательность AJ401158)] осуществляли в течение 18 часов при постоянном перемешивании при 65°C. После гибридизации мембрану последовательно инкубировали при 65°C два раза по 5 мин в растворе №1 (2-кратный SSC и 0,1% ДСН), 15 мин в растворе №2 (1-кратный SSC и 0,1% ДСН) и 5 мин при комнатной температуре в растворе №3 (0,1-кратный SSC и 0,1% ДСН).

Мембрана высушивалась и экспонировалась с рентгеновской пленкой («Retina», Германия) или с фоточувствительным экраном (PhosphoImager).

Измерение метанола в среде

Для измерения уровня эмиссии метанола была использована система улавливания метанола в воде (метод абсорбирующей капли). После инкубации листа *N. benthamiana* (травмированного или интактного, весом 0,5-0,7 г) в закрытом сосуде объемом 150 мл в течение 3 часов при температуре 24°C, количество выделившегося метанола рассчитывали по установившейся равновесной концентрации метанола в капле воды объемом 300 мкл, которая инкубировалась вместе с листом. Для расчета количества метанола в среде по его концентрации в капле, система была калибрована внесением в емкость метанола в объеме 0,25, 0,35, 0,5, 1,0, 10,0, 50,0 и 100,0 мкл с последующей инкубацией. Анализ метанола в капле измерялся с помощью газовой хроматографии. Эмиссия рассчитывается в мкг на грамм свежей массы листа.

Измерение метанола в соке растений

Для измерения метанола в соке растений брали высечку диаметром 10 мм, после измерения её массы, растирали пестиком, центрифугировали 10 минут при 16000 g, после чего к супернатанту добавляли равный объем 20% раствора трихлоруксусной кислоты. После инкубации при 0°C в течение 20 минут производили повторное центрифугирование (10 минут при 16000 g) при +4°C, затем измеряли концентрацию метанола в супернатанте методом газовой хроматографии.

Газовая хроматография

Концентрацию метанола определяли с помощью газового хроматографа Кристалл 2000 (Эридан, Россия) на капиллярной колонке FFAP (50 м × 0.32 мм). Метанол в воде измеряли в следующих условиях: газ-носитель – азот, ток азота – 30 мл/мин; ток воздуха – 400 мл/мин; ток водорода – 40 мл/мин; объем инъекции – 1 мкл раствора; температура инжектора 160°C; температура колонки 75°C, и повышается до 150°C со скоростью 15°C/мин; время задержки 6,5 мин (метанол); температура детектора пламенной ионизации 240°C.

Подавляющая вычитающая гибридизация

Тотальная фракция РНК была выделена с помощью TRI Reagent, из листьев *N. benthamiana*: контрольного и инкубированного в течение 18 часов в атмосфере с метанолом в концентрации 160 мкг на 20 л объема. Сама процедура гибридизации (Лукьянов et al., 1994; Gurskaya et al., 1996; Diachenko et al., 1996) была проведена ЗАО «Евроген», причем вычитание осуществляли в обоих направлениях – библиотеку кДНК инкубированного листа вычитали из библиотеки кДНК контрольного, и наоборот (<http://evrogen.ru/services/cDNA-subtraction/service-cdna-subtraction.shtml>). Также была проведена процедура Mirror Orientation Selection для

снижения фона и усиления специфического сигнала (Rebrikov и др., 2000). Для подтверждения результатов дифференциального скрининга был выполнен «псевдонозерн». Амплифицированные с помощью системы SMART (Zhu и др., 2001) кДНК библиотеки разделены в агарозном геле и перенесены на Hybond-N мембрану. Далее проводилась гибридизация с P^{32} -зондами, полученными на основе случайно выбранных дифференциальных клонов, обнаруженных в результате скрининга. Вычитающую подавляющую гибридизацию для проб из sink и source зон листа проводили аналогичным образом, тотальная фракция РНК была получена из листьев *N. tabacum* размером 3 и 10 см (верхний и 3-й сверху ярус).

Методы биоинформатики и статистического анализа

Для поиска гомологов по полученным в результате подавляющей вычитающей гибридизации фрагментам генов использовали сервис BLAST (алгоритм blastn) <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>, для множественного выравнивания использовали сервис ClustalW2 <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>, для двухвыборочного *t*-теста Стьюдента использовали сервис <http://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1.cfm>. Измерение считали статистически значимым при *p*-значении менее 0,05.

qRT-PCR (количественная ПЦР в реальном времени с предварительным получением кДНК)

Количественный метод полимеразной цепной реакции для библиотек кДНК был применен для оценки уровня накопления мРНК или вирусной РНК. кДНК была получена с использованием смеси случайных гексамеров и oligo-dT₁₈ праймера согласно оригинальному протоколу использования Superscript II reverse-transcriptase (Invitrogen, США). Для детекции целевых генов использовалась смесь Eva Green master mix (Синтол, Россия) также по прилагаемой инструкции. Каждую пробу промеряли трижды, концентрации мРНК для оценки изменений были предварительно нормированы по 18S рибосомальной РНК. Список праймеров для qRT-PCR приведен в таблице М1.

Целевой ген	Прямой (D) и и обратный (R) праймеры
<i>NCAPP</i>	(D) ATGTCTTCAAAGATTGGTCTG (R) ACGGAGATGATTGTGGC
<i>MIG-21</i>	(D) AGGAACAGGAACAAGGACGGAAG (R) TGTCGCTCTCATCGCTGCTAC
<i>β-1,3-глюканаза</i>	(D) GATTGTTGTGTCCGAGAGTG

	(R) CCAGTTCAGGGTTCTTGTT
<i>18S PHK</i>	(D) CCGTTGCTGCGATGATTC (R) TGCCTTCCTTGGATGTGG
<i>PI-II</i>	(D) ATGTACCTCGCCAAACTTAC (R) CTCCATCTATTTATAGCAAACG
<i>PME</i>	(D) ATCCTTGGATTCCGGCAAGAACGT (R) AAACACTTGCAATTGTAGAGTAAC
<i>DCL1</i>	(D) ATTAGATCATCTCATCACAAGGCACTTG (R) AAACCTGGTTTTTGATAGTTCATTTTAAAC
<i>ERP</i>	(D) TGATGGTGGCTATGGTAGTG (R) CTGGCTCTGGCTGTAGTG
<i>SEOP</i>	(D) CTGGAAGCATTGGAAGAGAAGG (R) GGTTGTGAGCGAGTGAAGC
<i>SABC</i>	(D) TGTCCCTGGTCTTTACTATTCG (R) GCGGTGATTATTGTGATGAGC
<i>ARP</i>	(D) GGATGATGTTATGGCTGGAC (R) GTGACGGAGTTGTTGGTG
<i>ST</i>	(D) TCAAGACCAACACTACACTCC (R) CCACCCACCACTGATAATAGG
<i>GFP</i>	(D) GCAGAAGAACGGCATCAAG (R) GCTCAGGTAGTGGTTGTCG
<i>GUS</i>	(D) CCTGCGTCAATGTAATGTTC (R) CGTATTCGGTGATGATAATCG
<i>AKK оксидаза</i>	(D) CCCAGTGGTTAACATGGAG (R) CTTCCATACACTTCTTGTAGTG
<i>ТБ ВТМ</i>	(D) TTCAAGACGAAGTGGTTTCAG (R) CTGAAACCACTTCGTCTTGAAT

Таблица М1. Олигонуклеотиды, использованные для qRT-PCR

Плазмиды

Для получения генно-инженерных конструкций использовали штамм *Escherichia coli* XL-1-Blue. Получение компетентных клеток, трансформация и выращивание культуры, а также выделение плазмидной ДНК проводили согласно стандартным методикам (Ханаан, 1988; Маниатис и др., 1984). Выделение ДНК-фрагментов из агарозного геля осуществляли с

помощью набора QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, США). На всех этапах получения конструкций использовали эндонуклеазы рестрикции, фрагмент Кленова и Т4 ДНК-лигазу фирмы “Fermentas” (Литва).

Плазмиды для сверхэкспрессии исследуемых генов в растении

Полноразмерные кДНК β -1,3-глюканазы, *MIG-21* and *NCAPP*, были получены в ПЦР с использованием праймеров, приведенных ниже, и кДНК *N. benthamiana* в качестве матрицы:

BG_1 GAGCTCATGTCTACCTCACATAAACATAATAC;

BG_2 AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTAC(T)₃₀;

MIG-21_1 GAGCTCATGGCATCACTTCAGTGCC;

MIG-21_2 GAGCTCATGGCATCACTTCAGTGCC;

NCAPP_1 GAGCTCATGTCTTCAAAGATTGGTCTG;

NCAPP_2 CTGCAGCTATTTCTTGATAGAAAACGTG;

SEOP_1 GGATCCATGGCTCATGTAAACCAATTGA;

SEOP_2 GAGCTCTTCTGGTGCAATGT;

SEOP_3 GAGCTCTTTATTCTCCATCATATG;

SEOP_4 GTCGACTTAATCAATGCAGCAGCTGTAC.

Для создания конструкций, содержащих кДНК β -1,3-глюканазы, *MIG-21*, *NCAPP* и *SEOP* под контролем 35S промотора вируса мозаики цветной капусты (CaMV), соответствующая кДНК была внесена в плазмиду pBIN19 по сайтам рестрикции *XbaI-EcoRI* (для β -1,3-глюканазы) и *SacI-PstI* (для *MIG-21* и *NCAPP*). кДНК *SEOP* для удобства последующих манипуляций была разбита на 2 части с сайтом *SacI* для слияния. Внесение в pBIN19 полного гена *SEOP* осуществляли по сайтам *BamHI* и *SalI*.

Для получения плазмиды, несущий ген *NCAPP* с меткой 3xFLAG (DYKDDDDDKDYKDVDDYKDDDDDK), 3'-фрагмент *NCAPP* с внесенным на праймере фрагментом кодирующей 3xFLAG последовательности и сайтом рестрикции *SalI* амплифицировали с помощью ПЦР с праймерами:

NCAPP(BglII+) GTATTTAAGGCAAGATCTCTCAAC;

FL_SalI_r GTCGACATCCTTATAGTCTTTATCATCATCATCCTTATAGTCGCSTTTCTTG.

Оставшаяся часть фрагмента 3xFLAG была собрана из олигонуклеотидов. При отжиге двух синтезированных цепей полученный фрагмент (дуплекс) имел «липкие» концы *SalI* и *PstI*:

FL2_SalI_r GCTATTTATCATCATCATCCTTGTAAGTCG;

FL2_SalI_d TCGACGACTACAAGGATGATGATGATAAATAGCTGCA.

По сайтам *Bgl*III и *Pst*I полученный продукт ПЦР и дуплекс вводились в конструкцию 35S-*NCAPP*.

Плазмиды для исследования транскрипционной активности промоторных участков исследуемых генов

Последовательность пр*ПМЭ* амплифицирована ПЦР с геномной ДНК *N. tabacum* в качестве матрицы с праймерами:

PMЕpro_ HindIII+ AAGCTTCCTCTTATCGTTTTATTAA;

PMЕpro_ NcoI- CCATGGAAATTAACGTTCTTGCCGGAAT.

Полученный фрагмент пр*ПМЭ* (с сайтами *Hind*III и *Nco*I), а также фрагмент, содержащий кодирующую последовательность *GUS* с 35S терминатором транскрипции (несущий сайты *Nco*I и *Eco*RI на 5'- и 3'-концах, соответственно), были введены в плазмиду pCampia1300 (CAMBIA, Австралия) по сайтам *Hind*III и *Eco*RI.

Для получения конструкции пр*ПМЭ*-GFP вместо фрагмента *GUS* по тем же сайтам в pCampia1300 вводился ген *GFP* с 35S терминатором транскрипции.

Для получения плазмиды пр*NCAPP-GUS* на концы последовательности промотора (длиной 1000 пар нуклеотидов) с помощью праймеров при амплификации ПЦР были введены сайты рестрикции *Nhe*I и *Sac*I:

NCAPPpro(*Nhe*I+) GCTAGCATAAACTAGGTAAAG;

NCAPPpro(*Sac*I-) GAGCTCAGTCAACTCTAGTTGTTTTAGAGTG.

Полученный фрагмент, а также фрагмент, содержащий кодирующую последовательность *GUS* с 35S терминатором транскрипции (фланкированный сайтами *Sac*I и *Eco*RI), был введен в плазмиду pBIN19 по сайтам *Xba*I и *Eco*RI. Полученную конструкцию пр*NCAPP-GUS* использовали для получения аналогичных конструкций с вариацией по длине промотора. Для варианта пр*NCAPP* длиной 1500 пар нуклеотидов получали фрагмент с дополнительной областью промотора амплификацией ПЦР с праймерами:

NCAPPpro(*Sbf*I+) CCTGCAGGATAGAAGTTAATCTGAGCT;

NCAPPpro(*Hind*III-) AAGCTTTAACCTAGTTTATAAGA.

Полученный фрагмент и фрагмент пр*NCAPP-GUS*, фланкированный *Hind*III и *Eco*RI сайтами, вводили в плазмиду pBIN19 по сайтам *Sbf*I и *Eco*RI. Для получения конструкции с укороченным промотором *NCAPP* длиной около 500 пар нуклеотидов пр*NCAPP* был обработан рестриктазами *Sal*I и *Sac*I, затем этот фрагмент, а также фрагмент, содержащий кодирующую

последовательность *GUS* с терминатором транскрипции 35S (фланкированный сайтами *SacI* и *EcoRI*), были введены в pBIN19 по сайтам *SalI* и *EcoRI*.

Плазмиды для получения рекомбинантных белков

Для тестов на связывание белков на мембране, а также для иммунизации мышей, были получены плазмиды, кодирующие исследуемые белки с гистидиновой меткой для выделения из *E.coli* в денатурирующих условиях с помощью набора QIAexpressionist Kit (Qiagen, Нидерланды).

Плазмиды для получения ТБ ВТМ и ПМЭ были получены в нашей лаборатории ранее (Sukhacheva et al., 2005).

Для получения NCAPP и β -1,3-глюканазы, соответствующие последовательности были амплифицированы ПЦР с добавлением сайтов *SacI* и *PstI* праймерами:

NCAPP(*SacI*+) GAGCTCGTTGACTATG TCTTCAAAGATT;

NCAPP(*PstI*-) CTGCAGCTATTTCTTGATAGAAAACGTG;

BG_1 GAGCTCATGTCTACCTCACATAAACATAATAC;

BG(*PstI*-) CTGCAGTGGTAACAACGCAGAGTAC.

Полученные фрагменты были введены в плазмиду pQE30 (Qiagen, Нидерланды) по сайтам *SacI* и *PstI*.

Плазмиды для исследования чувствительности растений к вирусу

Вирусный вектор крВТМ:GFP (pICH4351) любезно предоставлен доктором Глеба Ю.Ю. (Marillonnet et al., 2005).

Обратная транскрипция

Для проведения реакции обратной транскрипции использовали 0,4 мкг тотальной РНК, выделенной из листового материала *N. tabacum* или *N. benthamiana*, и 10 пмоль олиго-dT₁₈ праймера. Реакцию проводили в соответствующем 1х буфере для H-Minus M-MuLV ревертазы (Thermo Scientific, США), в присутствии смеси дезоксирибонуклеотидов, 40 единиц ингибитора РНКаз и 200 единиц H-Minus M-MuLV ревертазы. Перед добавлением ферментов проводился отжиг праймера на РНК в следующих условиях: 70°C 5 мин, затем 10 мин во льду. Сама реакция обратной транскрипции проводилась в течение 60 мин при 42°C. Затем ферменты инактивировали инкубацией при 70°C в течение 10 мин. Аликвоту 3-5 мкл из реакционной смеси использовали для проведения ПЦР со специфическими праймерами.

Определение ферментативной активности ПМЭ

Активность ПМЭ определяли по методу Downie et al., 1998. Делали высечки из листьев растения, гомогенизировали ткань в жидком азоте, добавляли буфер для экстракции (три объема к объему пробы). Состав буфера для экстракции: 1 М NaCl, 2,5 мМ фенилметилсульфонилфторид, 0,1 М цитрат Na, 0,2 М Na₂HPO₄ pH 7,0. Гомогенат центрифугировали при 16000 g при 4°C, определяли концентрацию белка в супернатанте (с помощью набора «Bio-Rad protein assay kit», США), далее экстракты (30 мкл) наносили в лунку геля с метилэтерифицированным пектином (для получения геля 2% агарозу на цитрат-фосфатном буфере (0,1 М цитрат / 0,2 М фосфата pH 7,0) заправляли с 0,1 % пектином (Sigma-Aldrich, США) с 90% этерификацией, такой гель заливали в чашки Петри, делали в нем лунки диаметром 2 мм). В качестве контроля в лунки вносили раствор ПМЭ кожуры апельсина (Sigma-Aldrich, США) в разных концентрациях от 0,018 до 0,18 нкаталь. Гель с нанесенными пробами инкубировали 16 часов при 28°C, после инкубации лунки промывали водой и окрашивали гель 45 минут красителем 0,05% Ruthenium Red (Sigma-Aldrich, США), который окрашивает только деметилированный пектин. Краситель отмывали водой, пока зоны не становились четко видны. Измеряли диаметр зон и определяли ферментативную активность ПМЭ, исходя из градуировочного графика, как описано в статье Downie et al., 1998.

Измерение ферментативной активности GUS

Ферментативную активность GUS измеряли, как описано в Jefferson et al., 1987. Флуоресценцию измеряли при помощи флуориметра QUANTECH (Barnstead International, США). Использовались фильтры NB455 (возбуждение) и NB520 (испускание).

Детекция флуоресценции GFP

Для оценки уровня флуоресценции GFP в листовом материале, высечки (около 50 мг) растирали в буфере для экстракции GFP (150 мМ NaCl, 10 мМ Tris-HCl, pH 8,0) с абразивным материалом целитом, центрифугировали 10 минут при 16000 оборотах в минуту. Объем супернатанта довели до 1 мл и измеряли флуоресценцию с помощью флуориметра QUANTECH (Barnstead International, США). Использовали фильтры NB390 (возбуждение) и NB520 (испускание). Для оценки распространения GFP по отдельным клеткам нижней эпидермы, высечки листа анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Axiovert 200M с использованием следующих фильтров: BP470/40 (возбуждение) и BP525/50 (испускание) («Zeiss», Германия).

Агроинфильтрация растений

Agrobacterium tumefaciens штамм GV3101 трансформировали соответствующим бинарным вектором. Ночную культуру выращивали в LB среде с антибиотиками рифампицином (50 мг/л), гентамицином (25 мг/л), канамицином (50 мг/л) при 28°C. Полученную культуру бактерий разводили буфером, содержащим 10 mM MES (pH 5,5) и 10 mM MgCl₂, до плотности, соответствующей OD₆₀₀ 0,001-0,1 в зависимости от эксперимента, и вводили в лист с помощью шприца без иглы.

При совместной инфильтрации агробактериями, несущими разные генетические конструкции, использовали разведение, соответствующее OD₆₀₀ 0,1 для каждой из них в смеси, кроме экспериментов с участием 2xGFP.

В экспериментах по анализу межклеточного транспорта для получения отдельных светящихся 2xGFP клеток использовали разведение бактериальной суспензии, соответствующее OD₆₀₀ ~0,01. Растения инкубировали в атмосфере с повышенной концентрацией метанола, агроинфильтрировали, а затем через 30 часов подсчитывали кластеры светящихся клеток с помощью флуоресцентного светового микроскопа. В экспериментах по оценке межклеточного транспорта вирусного вектора крВТМ:GFP размер фокусов определяли через 3 суток после обработки растения метанолом.

Тест на связывание белков на мембране в ренатурирующих условиях (overlay assay)

Схема эксперимента базируется на протоколе (Ueki et al., 2011). Иммобилизация исследуемых белков на мембране проходит по стандартной методике (см. вестерн-блот анализ). После этого происходит отмывка 15 минут в буфере В (30 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,05% Tween-20) при покачивании. Затем инкубация 2 часа в денатурирующем буфере при комнатной температуре (7 M гуанидин гидрохлорид, 2 mM ЭДТА, 50 mM ДТТ, 50 mM Tris-HCl pH 8,0). После этого промывка 5 минут в буфере TBS-T (140 mM NaCl, 30 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,1% Tween-20) и стадия ренатурации и блокировки мембраны на ночь при +4°C в буфере для ренатурации (140 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 2 mM ЭДТА, 1% БСА, 0,1% Tween-20, 2 mM ДТТ). Затем стадия связывания белков из среды в буфере для ренатурации 90 минут с тестовым белком (в данной работе это NCAPP или ТБ ВТМ). После этого промывка в TBS-T и инкубация с антителами. Далее системой детекции метод повторяет вестерн-блот анализ.

Подготовка проб из зон агроинъекции для разделения электрофорезом в ПААГ (полиакриламидном геле)

Для экстракции суммарного растворимого белка из инфильтрированных листьев был использован GFP-буфер, содержащий 200 мМ NaCl, 10 мМ Tris-HCl, pH 8,0. Растительный материал гомогенизировали в буфере с добавлением целита, центрифугировали при 16000 g в течение 5 мин, определяли концентрацию белка в супернатанте (с помощью набора «Bio-Rad protein assay kit», США), далее в экстракты добавляли 4х буфер для электрофореза SB (40% глицерин, 240 мМ Tris-HCl pH 6,8, 8% ДСН, 0,04% бромфенол-синий, 5% меркаптоэтанол) прогревали 10 мин при 95°C. Белки экстракта разделяли в 12% ДСН-ПААГ по Laemmli, 1970. Далее проводили вестерн-блот анализ.

Измерение апертуры устьиц

Растения *N. tabacum* были перенесены в темноту на 2 часа, затем на 2 часа на свет. После этого листья помещали в герметичные емкости. В одну группу емкостей добавили метанол и емкости были оставлены на свету. Вторую группу емкостей оставили на свету без добавления метанола, третью группу емкостей перенесли в темноту, также без добавления метанола. Через час провели фотографирование нижней поверхности листьев с использованием микроскопа. Для замеров апертуры устьиц полученные фотографии обрабатывали программой ImageJ.

Инокуляция ВТМ

Для оценки чувствительности к вирусу после инкубации с метанолом верхнюю поверхность листьев *N. tabacum* мягким натирающим обрабатывали 50 мМ фосфатным буфером pH 7,0 с вирусными частицами ВТМ (100 мкг/мл) и целитом. Первая проба qRT-PCR для анализа накопления вирусной РНК была собрана сразу после инокуляции.

Иммунизация мышей

Для получения специфической сыворотки к белку NCAPP производили иммунизацию мышей линии BALB-C по следующей схеме: на каждую мышь брали 1 мкг белка, первую иммунизацию проводили с полным адъювантом Фрейнда в соотношении 1:1. Через 14 дней после первой производили вторую иммунизацию с неполным адъювантом Фрейнда в соотношении 1:1. Затем еще через 14 дней после второй иммунизации производили отбор крови. Собранную кровь оставляли на 18 часов в открытых пробирках для образования сыворотки. Затем проводили центрифугирование в течение 10 мин 5 000 g при 4°C. Сыворотку отбирали и хранили при -20°C.

Вестерн-блот анализ

Белки из ПААГ переносили на мембрану Hybond-P PVDF (GE Healthcare, США). Затем мембрану инкубировали в 5% растворе сухого молока в 1xPBS-T буфере (PBS с 0,1% Tween 20) в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем инкубировали мембрану в PBS-T 4 раза по 5 минут при покачивании, после чего проводили связывание со специфическими антителами (анти-FLAG и анти-GFP, Abcam, Великобритания) или мышьиной сывороткой (анти-NCAPP или анти-ТБ BTM) в соответствующем разведении в течение 1 часа при постоянном перемешивании в 1xPBS-T. Повторяли процедуру отмывки. Аналогично повторяли инкубацию с антимышиными антителами, конъюгированными с пероксидазой (Rockland Immunochemicals, США). Повторяли процедуру отмывки. Блоты проявляли системой ECL (GE Healthcare, США). Время экспозиции подбирали для получения наилучшего результата (1, 5, 15 минут, сутки). При необходимости далее производилась денситометрия с помощью программы ImageJ.

Выделение тотальной фракции РНК из растений с помощью TRI Reagent

В предварительно охлажденной ступке растирали высечки листа до белой пыли. Добавляли 1 мл TRI Reagent и инкубировали в течение 15 минут при постоянном перемешивании при комнатной температуре. После добавления 300 мкл хлороформа тщательно перемешивали 15 секунд. Центрифугировали 5 минут при 16000 g при +4°C. Отбирали водную фракцию и добавляли равный объем изопропанола. После перемешивания оставляли на 30 минут при комнатной температуре. Центрифугировали 6 минут при 16000 g при +4°C. Удаляли супернатант и промывали 300 мкл холодного 70% этанола. Сушили при 37°C, растворяли в 200 мкл воды. К раствору добавляли 200 мкл 4 M LiCl. Инкубировали образец в течение 18 часов при 0°C. Центрифугировали 20 минут при 16000 g. Удаляли супернатант и промывали 200 мкл холодного 70% этанола. Высушивали осадок при 37°C. Растворяли в 100 мкл воды. Осаждали РНК 96% этиловым спиртом в присутствии ацетата натрия 30 мин при -70°C, снова промывали 70% этанолом и растворяли в воде.

Фракционирование листового материала

1,0-1,5 грамма листового материала растирали в ступке с жидким азотом. После того, как материал оттаял, добавляли 5мл буфера GB (100 mM Tris pH 8,0, 0,4 M сахароза, 10 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM β-меркаптоэтанол), фильтровали через безворсовый фильтр. Все, что осталось на фильтре (фракция клеточных стенок) соскребали шпателем, переносили в пробирку и добавляли буфер GB с 0,1% TritonX100, оставляли на ротаторе 60 минут. За это время фильтрат центрифугировали 10 минут при 1000 g. Супернатант отбирали, осадок ресуспендировали в 150 мкл 1xPBS с равным объемом 4xSB (фракция тяжелых мембран).

Отобранный супернатат центрифугировали 30 минут при 30000 g. Отбирали аликвоту супернатата, добавляли равный объём 4хSB (цитоплазматическая фракция). Осадок ресуспендировали в 75 мкл 1хPBS, добавляли равный объём 4хSB. Фракция клеточных стенок отмывали до 6 раз буфером GB с 0,1% TritonX100, в последний раз промывали буфером GB без TritonX100, центрифугировали 10 минут при 16000 g, супернатат сливали. Осадок ресуспендировали в 150 мкл 1хPBS, добавляли равный объём 4хSB.

5'-RACE (rapid fmplification of cDNA ends) метод

5'-RACE анализ кДНК *GUS* из трансгенных растений пр*NCAPP-GUS*, кДНК *NCAPP* из растений *N.benthamiana* дикого типа и кДНК *ПМЭ* из растений *N. tabacum* дикого типа проводили с помощью набора реактивов для быстрой амплификации концевых фрагментов кДНК "Mint RACE cDNA amplification set" (Евроген, Россия). Использовали фракцию тотальной РНК из соответствующих растений и следующие праймеры:

GUS rev1 CACTTTGCCGTAATGAGTGACC;
 GUS rev2 CAACCTTTCGGTATAAAGACTTC;
 PME_rev1 TATGGCCGTGTGGAGTTCGT;
 PME_rev2 CGGCCCTGCAGGTGATATT;
 PME_rev3 CTGCAGAGGTAATGGCCTGTAT;
 NCAPP_rev6 CTCTAACACTAGAAACAGCAC;
 NCAPP_rev7 ACCAATCTTTGAAGACATAGTC;
 NCAPP_rev8 TTTAGAGTGACTTAGTGGAGC.

«Прогулка по хромосоме» для изоляции пр*NCAPP* и пр*ПМЭ*

Геномная ДНК был получена из растений *N. benthamiana* и *N. tabacum* с помощью набора ZR Plant/Seed DNA MiniPrep kit (Zymo Research, США). Другой набор GenomeWalker Universal Kit (Clontech, США) был использован для двух раундов «прогулки по хромосоме» согласно прилагаемому протоколу. Для процедуры «прогулки по хромосоме» для определения пр*NCAPP* *N. benthamiana* были использованы следующие праймеры:

NCAPP_rev6 CTCTAACACTAGAAACAGCAC;
 NCAPP_rev7 ACCAATCTTTGAAGACATAGTC;
 NCAPP_rev8 TTTAGAGTGACTTAGTGGAGC;
 NCAPP_rev10 CGATTTTGTGTGTTGAAGAAGGG;
 NCAPP_rev11 ATCTATAGAGTTGTTCAAGAATTG;
 NCAPP_rev12 CATCTTTTATGCCAAATTATGGG.

Для последующего клонирования пр*NCAPP* в плазмиду рAL-ТА (Евроген, Россия) использовали праймеры NCAPP_rev7 и NCAPP_Dir2 (ATAGAAGTTAATCTGAGCTCG).

Для процедуры прогулки по хромосоме для определения пр*ПМЭ N. tabacum* были использованы следующие праймеры:

ПМЭ_rev4 АСТАСТССGATAACTGCTGC;
 ПМЭ_rev5 СТТТGGAAAAATTAACGTTTC;
 ПМЭ_rev6 TCCGGCGAAGAAATCTTTGA;
 ПМЭ_rev7 ТААТТТGGAGCAGCTAATTAG;
 ПМЭ_rev8 CCTTTTTTAATTAATTTATCTC;
 ПМЭ_rev9 ТААТТТТАAAAGTCTTATTTAACA.

Для последующего клонирования пр*ПМЭ* в плазмиду рAL-ТА (Евроген, Россия) использовали праймеры ПМЭ_rev6 и ПМЭpro_D (TCCTCTTATCGTTTTATTAA).

Получение трансгенных растений пр*NCAPP-GUS*

Стабильную трансформацию растений *N. benthamiana* с помощью агробактерий проводили по стандартному протоколу (Horsch et al., 1985). Высечки листьев инкубировали с *A. tumefaciens*, несущей вектор с трансгеном пр*NCAPP-GUS*, в течение 24 часов при 26°C в темноте. Трансформированные высечки были перенесены на регенирирующую среду (MS среда с добавлением 1 мг/л 6-бензиладенина), содержащую 700 мг/л цефотаксима и 100 мг/л канамицина для селекции. Побеги, устойчивые к канамицину, переносились на селективную среду с канамицином (100 мг/л). Трансгенные растения T0 были проверены методом ПЦР и тестом на ферментативную активность GUS.

Обработка растений метанолом

Обработку растений метанолом (трансгенов пр*NCAPP-GUS* или *N. benthamiana* дикого типа) проводили в 20-литровом эксикаторе, куда помещали растение и фильтровальную бумагу, смоченную 160 мкг метанола. Влияние метанола, эмитируемого другими растениями, изучали в закрытой системе, когда в эксикатор помещали два растения: растение-источник метанола (поврежденное или интактное) и опытное растение. Растение (средняя масса растения составляла 10,0± 1,0 г) находилось в горшке (диаметр – 9,5 см; высота – 9,5 см) в почве (198,0 ± 20,0 г) в течение 3-18 часов в зависимости от задач эксперимента и температуре 24°C. Затем контрольное растение удаляли из эксикатора и тестировали на содержание мРНК ГИМов и чувствительность к вирусу.

Высокоэффективная жидкостная анионообменная хроматография

Исчерпывающий гидролиз полисахаридов проводили, как описано в «Государственный стандарт Российской Федерации Р 51881-2002 "Кофе растворимый. Определение массовых долей свободных и общих углеводов. Метод высокоэффективной анионообменной хроматографии." Дериватизацию восстанавливающих моносахаридов и последующий ВЭЖХ анализ проводили, как описано в D.Fu et al., 1995 и S.Honda et al., 1989.

Ко всему высушенному образцу (точная навеска) добавили 1 мл 1М соляной кислоты и проводили гидролиз при 100С в течение 2.5 часов. Полученный раствор центрифугировали 10 мин при 14000. К 0.5 мл супернатанта добавляли 1.5 мл воды, 2 мл полученного раствора пропускали через обращенно-фазный концентрирующий патрон (Диасорб С16), отбрасывали первые 1.8 мл и собирали следующий 0.2мл. К 20 мкл раствора смеси стандартов в концентрации 1 г/л каждого углевода (внешний стандарт) и исследуемого раствора добавляли 20 мкл раствора внутреннего стандарта (раствор глюкозамина с концентрацией 1 г/л) и упаривали на вакуумированом центрифужном испарителе типа SpeedVac с подогревом в полипропиленовой пробирке. К высушенной пробе добавляли 20 мкл 0.5М раствора РМР (1-фенил-3-метил-5-пиразолон) в метаноле и 20 мкл 0.3М КОН, тщательно встряхивали на vortex и термостатировали при 70С в течение 2 часов. Нейтрализовывали пробу 20 мкл 0.3 М соляной кислоты и дважды экстрагировали избыток реагента РМР 500 мкл бензола. Остаток упаривали на SpeedVac с подогревом и растворяли в 500 мкл смеси ацетонитрил/вода (1:9).

Тестовую смесь анализировали методом обращенно-фазной ВЭЖХ в градиентном режиме на колонке Luna C18(2) 4.6*250mm (5um) с подвижной фазой А -вода В- ацетонитрил и D – 100 mM раствор гидрофосфата калия в воде (pH 9.12) при скорости потока 1 мл/мин, температуре 25С и с УФ- детекцией при 260нМ. Был использован градиентный хроматограф Agilent 1100, включающий четырехканальный насос, автосамплер, колоночный термостат и ПДА-детектор. Градиентная програмама: 50% D, 8-16%B (5мин), 16-16%B (8мин), 16-30%B (4мин). Общее время анализа 20.65 мин. Сбор и обработка хроматограмм осуществлялась с помощью программ ChemStation и AutoChrom1200/ACDlabs.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ГЛАВА I. Гены, индуцируемые метанолом (ГИМ), в ответе растений на стресс

I.1. Синтез метанола при механической травме растения

Большинство стрессовых воздействий на растение сопровождается механическим повреждением его тканей, в особенности, если речь идет о стрессах биотической природы. Травму можно рассматривать как универсальную черту стресса, а значит, изучение этого процесса может стать ключом к открытию механизмов неспецифического иммунного ответа в растениях. Именно поэтому физическая травма листа - довольно популярный объект исследования. Для имитации этого процесса в лабораторных условиях обычно используют пинцет (Reymond et al., 2000) или дырокол (von Dahl et al., 2006). В нашей лаборатории листовые пластины модельных растений *N. benthamiana* и *N. tabacum* были обработаны абразивным материалом целитом. Такая постановка эксперимента кажется нам наиболее корректной, так как в природе механическое воздействие чаще всего сводится к микроповреждениям листовой кутикулы, трихом и клеточных стенок.

Объектом внимания в нашем исследовании, в первую очередь, является активность ПМЭ. ПМЭ высших растений – это фермент клеточной стенки с множественными биологическими функциями. Например, показана его активация при заражении бактериальными и грибковыми патогенами или при атаке насекомых-фитофагов (см. литературный обзор). Можно отметить также участие гена *ПМЭ* в посттранскрипционном умолкании генов, вызванном вирусной инфекцией или трансформацией растений (Dorokhov et al., 2006). Указанные свойства говорят об универсальности этого фермента клеточной стенки как участника ответа растений на стресс.

Для того, чтобы определить, как влияет механическая травма листа на экспрессию и активность гена *ПМЭ*, был проведен ряд экспериментов. На рисунке 6 представлена динамика изменений количества мРНК, кодирующей ПМЭ, в тотальной фракции РНК табака после обработки листовой пластинки целитом. Видно, что уровень накопления транскрипта возрастает уже через час, затем продолжает расти, не достигнув стадии снижения уровня транскрипции за 8 часов.

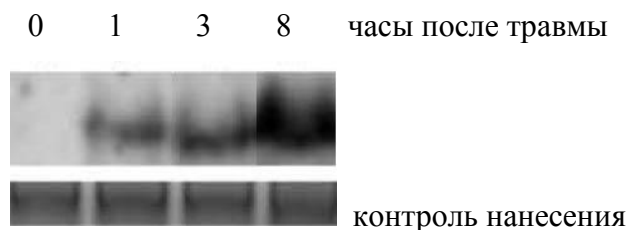


Рисунок 6. Повреждение листа *N. tabacum* целитом вызывает накопление мРНК ПМЭ. Данные нозерн-блот анализа с ДНК зондом, комплементарным кодирующей последовательности ПМЭ.

Стоит отметить, что регуляция активности ПМЭ может осуществляться на разных этапах. После транскрипции и трансляции белок направляется с помощью лидерного пептида в аппарат Гольджи, где процессируется и секретируется в клеточную стенку (Dorokhov et al., 2006). Увеличение количества транскрипта ПМЭ говорит о возможном увеличении *de novo* синтезированного белка, но не дает информации о его активности. Известно, что единственная молекулярная функция ПМЭ – это катализ реакции деэтерификации пектина, продуктами которой являются деметилованный пектин и метанол (Micheli, 2001). Соответственно, активность этого фермента можно оценить либо по количеству деметилированного субстрата (метод предложен Downie et al., 1998), либо по количеству синтезируемого метанола.

Согласно нашим результатам, повреждение листа *N. benthamiana* целитом приводит к увеличению ферментативной активности ПМЭ. Через три часа после травмы активность ПМЭ в клеточной стенке увеличивается примерно в 2,5 раза (рисунок 7).

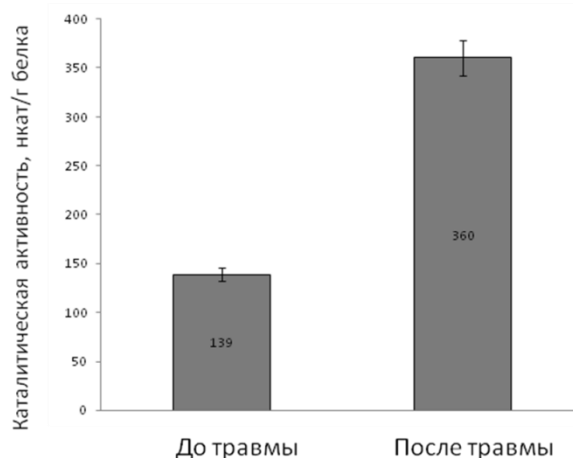


Рисунок 7. Изменение ферментативной активности ПМЭ в клеточных стенках листьев *N. tabacum* до травмы и через 3 часа после обработки абразивным материалом. Указаны средние значения и стандартные ошибки. Изменение статистически значимо.

Что касается метанола, то измерения его концентрации в соке *N. tabacum* показывают, что синтез метанола увеличивается и достигает значимо бóльших значений через 16 часов после травмы, а далее идет на снижение (рисунок 8).

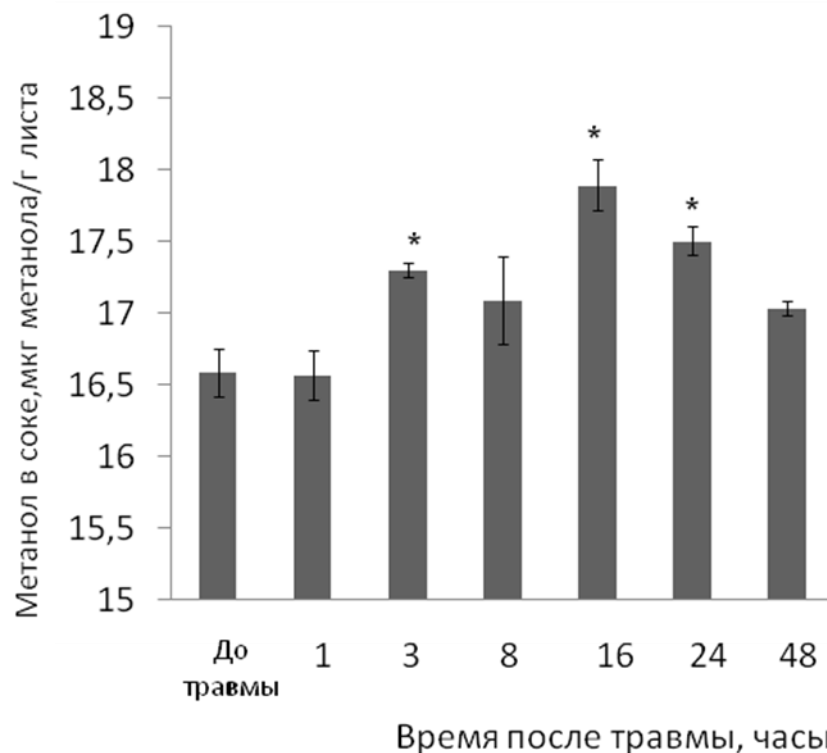


Рисунок 8. Динамика изменения концентрации метанола в соке листьев *N. tabacum* после повреждения абразивным материалом. Указаны средние значения со стандартными ошибками. Статистически значимая разница по сравнению с концентрацией до травмы достигается в точках 3, 16 и 24 часа после травмы (*, p -значение $< 0,01$).

Более значительные изменения наблюдаются в уровнях эмиссии газообразного метанола. Листья *N. benthamiana*, обработанные целитом и закрытые в герметичном сосуде объемом 150 мл, за 30 минут выделяют в среду в десятки раз больше метанола, чем неповрежденный лист (рисунок 9). Вероятно, высокая скорость изменений в этом случае связана с испарением предсуществующего растворенного в соке метанола, в то время как в случае с содержанием метанола в соке (рисунок 8) повышение концентрации связано с синтезом метанола *de novo*.

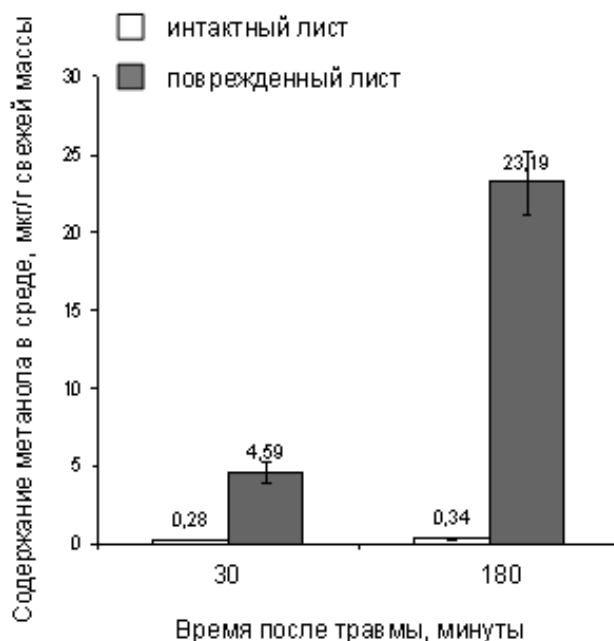


Рисунок 9. Динамика изменения эмиссии метанола листьями *N. benthamiana* после повреждения абразивным материалом. Замеры газообразного метанола методом абсорбирующей капли. Указаны средние значения со стандартными ошибками. Разница в эмиссии между травмированным и интактным листом в каждой временной точке, а также изменение эмиссии поврежденного листа через 30 минут и через 3 часа после травмы, статистически значимы. Результаты получены совместно с Т.В. Комаровой.

Из всего вышесказанного можно заключить, что механическая травма листа вызывает повышение активности ПМЭ, которая уже находится в клеточной стенке, а также активирует транскрипцию гена *ПМЭ*, увеличивая синтез фермента. Эти события приводят к резкому выбросу газообразного метанола в первые минуты после травмы, а также к повышенному синтезу метанола, что значимо увеличивает его концентрацию в соке растения через несколько часов.

I.2. ГИМ: реакция на механическую травму

Несмотря на то, что значимость ПМЭ для иммунитета растений экспериментально подтверждена (Bethke et al., 2014), механизм её действия в этом процессе недостаточно изучен. Деметилирование пектина приводит к тому, что образовавшиеся заряженные карбоксильные группы могут связать цепи полимера с помощью ионов кальция (Micheli, 2001). Изменение структуры пектина приводит к изменениям вязкости, проницаемости и ионного статуса клеточной стенки.

Помимо изменений в структуре пектина, активность ПМЭ приводит к увеличению концентрации метанола в соке (Kang et al., 2011) и в среде (von Dahl et al., 2006). Это позволяет предположить, что после механической травмы именно метанол выполняет роль регулятора стрессового ответа.

Для исследования роли метанола в реакции растения на стресс был проведен сравнительный анализ транскриптомов контрольного растения *N. benthamiana* и растения, обработанного газообразным метанолом в концентрациях, близких к физиологическим в условиях механической травмы. Анализ проводился с помощью метода вычитающей подавляющей гибридизации, этот метод позволяет сравнить два образца тотальной РНК.

Для фрагментов генов, уровень мРНК которых повышается в ответ на инкубацию с метанолом, с помощью программы BLASTN были найдены гомологичные последовательности. Так как не все гены *N. benthamiana* идентифицированы, в выдаче программы много предсказанных генов или гомологичных генов из других организмов. Всего было обработано 359 фрагментов генов. 320 из них соответствуют ГИМ, то есть их транскрипция повышена в обработанном газообразным метанолом листе.

Гены, активация которых в ответ на метанол наиболее значительна, приведены в таблице 2. В таблице также указан организм, в котором был найден «лучший» гомолог, и e-value их выравнивания в качестве характеристики гомологии. Все находки можно разделить на группы в соответствии с их функциями: это главным образом гены, кодирующие белки ответа на стресс, и гены нормальной жизнедеятельности. Количество EST (expressed sequence tags) для гена косвенно указывает на степень его чувствительности к метанолу, так как отбор фрагментов для секвенирования из библиотеки фрагментов производился случайным образом.

Функциональная аннотация ближайшего гомолога по базе GeneBank	Организм, в котором найден гомолог	Коли- чество EST	e-значение	Номер фрагмента в базе Genebank
β -1,3-glucanase, basic PR-2	<i>N.tabacum</i>	36	6e-30	FN432035
β -1,3-glucanase (vacuolar isoform)	<i>N.plumbaginifolia</i>	15	2e-66	FN432037
Proteinase inhibitor II	<i>N. tabacum</i>	24	1e-42	FN432036
Methanol-induced gene-21 (MIG-21)	<i>S. tuberosum</i>	22	1e-16	FN432041
PME inhibitor	<i>N. tabacum</i>	7	6e-28	FN432040
Elicitor inducible protein	<i>N. tabacum</i>	7	5e-23	FN432735
1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase	<i>S.lycopersicum</i>	6	7e-21	FN432033
β -cyanoalanine synthase	<i>S. tuberosum</i>	5	5e-37	FN432034
Metallophosphatase/ diphosphonucleotide phosphatase 1	<i>Olea europaea</i>	5	5e-34	FN561907
BURP domain-containing protein	<i>S. tuberosum</i>	4	2e-14	FN561900
NCAPP, non-cell autonomous pathway protein	<i>N. tabacum</i>	3	4e-79	FN432039
Salicylic acid binding catalase	<i>N. tabacum</i>	3	2e-56	FN432738

Таблица 2. Основные гены, содержание мРНК которых в листьях *N. benthamiana* возрастает после инкубации в среде с газообразным метанолом в концентрациях, близких к физиологическим в условиях механической травмы. По результатам вычитающей подавляющей гибридизации, анализ всех фрагментов опубликован DOI: 10.1371/journal.ppat.1002640. Результаты получены совместно с Т.В. Комаровой.

Группа генов нормального метаболизма очень разнородна (всего 153 фрагмента, в таблице не представлены), её можно поделить на три подгруппы – это подгруппа генов, кодирующих белки клеточной энергетики (ферменты фотосинтеза и гликолиза), подгруппа ионных транспортеров и подгруппа генов анаболизма. Активность транскрипции альдолазы, фосфоенолпируваткиназы, рибулозобисфосфаткарбоксилазы, АТФазы при обработке метанолом позволяют говорить об активизации фотосинтетической системы растения. Компоненты кальциевых каналов, киназы и кальций-связывающие белки указывают на внутриклеточный кальциевый сигнал, однако его высокая специфичность в отдельных растительных клетках не позволяет делать какие-либо выводы.

Особый интерес представляет не менее разнородная группа стрессовых белков. Здесь можно выделить три белка PR группы (от англ. pathogenesis related, белки, ассоциированные с патогенезом): β -1,3-глюканаза, ингибитор протеиназ II и пероксидаза. PR белки – это группа белков, выделенная по способности накапливаться в тканях растения при атаке фитопатогена. Также белки этой группы являются маркерами приобретенной системной устойчивости. Для всех PR белков отмечено участие в ответе более чем на один вид патогена, а многие из них накапливаются и в ответ на абиотический стресс. В целом, устойчивость вызванная накоплением указанных PR белков, определяется способностью разрушать клеточные стенки патогенов и нарушать целостность их мембран, а также защищать собственные белки от расщепления протеиназами (Stintzi et al., 1993).

β -1,3-глюканаза накапливается при любом механическом воздействии - биотическом и абиотическом - во многом из-за способности усиливать иммунный ответ за счет растительных мембранных рецепторов, чувствительных к отщепленным β -1,3-глюканазой олигосахаридам. Кроме того, у этого фермента есть еще одна функция – это регуляция симпластного межклеточного транспорта (Balasubramanian et al., 2012).

Пероксидазы также многофункциональны, активность пероксидазы может, например, повышать устойчивость растения за счет увеличения жесткости вторичной клеточной стенки (Lagrimini et al., 1987).

Ингибитор протеиназ – защитный белок, инактивирующий трипсин и другие протеиназы для предотвращения разрушения белков растительной клетки, делая растение менее «съедобным» для различных фитофагов – от нематод до позвоночных растительноядных животных (Balandin et al., 1995).

Среди генов, индуцируемых метанолом и кодирующих стрессовые белки, можно отметить подгруппу регуляторов фитогормонов – это салицилат-связывающая каталаза (salicylic acid binding catalase, SABC) и АКК оксидаза, а также подгруппу белков абиотического стресса – белки теплового шока, дегидратации и белки репарации ДНК.

Последовательность, кодирующая белок MIG-21 (от англ. methanol inducible gene, ген, индуцируемый метанолом), была обнаружена с помощью гомолога в картофеле. Кодирующая последовательность этого гипотетического белка была идентифицирована в нашей лаборатории, его молекулярная функция неизвестна.

β -цианоаланинсинтаза катализирует синтез β -цианоаланина из цианида и цистеина. β -цианоаланин токсичен для некоторых фитофагов и синтезируется в ответ на стрессовое воздействие биогенной природы.

Интересно, что в ответ на метанол активируется транскрипция гена белка, участвующего в транспорте белков через плазмодесмы, а также в метаболизме сахаров, NCAPP (non-cell-autonomous pathway protein). Его роль в растительной клетке будет подробно рассмотрена ниже.

Также надо отметить, что в растении, обработанном газообразным метанолом в концентрациях, близких к физиологическим, активируется ген *ингибитора ПМЭ*, что говорит о наличии механизма регуляции активности ПМЭ при механическом стрессе на уровне ингибирования зрелого белка ПМЭ.

Целью сравнения транскриптомов было выявление механизмов, которые активируются в растительной клетке в ответ на повышенный уровень метанола, что в природных условиях сигнализирует о значительных повреждениях клеточной стенки. Результаты, представленные в таблице 2, говорят в пользу того, что растительная клетка отвечает неспецифической иммунной реакцией, активацией метаболизма и, возможно, ретрансляцией-усилением сигнала посредством фитогормонов. Активное накопление мРНК генов, связанных с защитой (β -1,3-глюканаза, ингибитор протеиназ, пероксидаза), позволяет проводить параллели между метанолом и некоторыми так называемыми DAMP-молекулами (damage associated molecular patterns, молекулы, ассоциированные с повреждением). Это молекулы, которые являются результатом повреждения собственных тканей растения и служат сигналом для начала иммунного ответа (Jones and Dangl, 2006). В качестве примера DAMP молекулы можно назвать ОГК.

Для верификации результатов из таблицы 2 по принципу наибольшей представленности, а также исследовательского интереса, были отобраны 6 генов, а в качестве отрицательного контроля был взят ген *DCL1* (dicer like protein 1) - ген, участвующий в специфическом иммунном ответе (сайленсинге) и не обнаруженный по результатам данных вычитающей гибридизации в списке ГИМ (таблица 3).

	Концентрация (мкг/г листа)	Относительное количество мРНК					
		<i>β-1,3- глюканаза</i>	<i>NCAPP</i>	<i>MIG-21</i>	<i>AKK оксидаза</i>	<i>DCL1</i>	<i>Ингибитор протеиназ II</i>
Метанол	70,0	398,5±12,9	48,8±5,2	17,5±2,6	7,7±1,0	2,7±0,7	7,1±0,7
Контроль	1,1±0,1	1,00±0,3	1,00±0,3	1,00±0,3	1,0±0,2	1,0±0,4	1,0±0,3

Таблица 3. Верификация ГИМ методом qRT-PCR. Растения *N. benthamiana* инкубировали в закрытой емкости в течение 18 часов с метанолом или без. Метанол в контрольной емкости – это метанол, эмитируемый растением за время инкубации без добавления метанола извне. Уровень мРНК контрольного растения принят за единицу. Результаты получены совместно с Т.В. Комаровой.

Из таблицы 3 видно, что транскрипция отобранных генов действительно возрастает. Можно оценить чувствительность данных генов к метанольному сигналу, то есть зависимость изменения уровня транскрипции от метанола. Так контрольный ген *DCL1* оказывается практически нечувствительным к метанолу, а среди наиболее чувствительных – *β-1,3-глюканаза*, *NCAPP* и *MIG-21*. Среди последних трех, *MIG-21* кодирует белок с неизвестной функцией, а остальные два гена кодируют белки, участвующие в регуляции межклеточного симпластного транспорта.

В естественных условиях после травмы метанол выделяется в ансамбле с другими ЛОС (Peñuelas et al., 2005). Если в качестве источника метанола было взято растение *N. benthamiana* с листьями, поврежденными целитом, то после инкубации с таким травмированным растением в неповрежденном растении накапливались мРНК найденных ГИМ (данные не представлены).

1.3. Участие ГИМ в вирусной инфекции

Для двух генов с максимальной чувствительностью к метанолу в литературе показано участие в регуляции транспорта молекул через ПД – это гены *NCAPP* и *β-1,3-глюканаза*.

Механизмы регуляции плазмодесмального транспорта на сегодняшний день не совсем ясны, однако известно, что важным участником этого процесса является каллоза, количество которой вокруг рукава плазмодесмы определяет максимальный размер проходящих через неё молекул. Количество каллозы в области плазмодесмы зависит от баланса между активностью каллозсинтаз и *β-1,3-глюканаза*. И тот, и другой фермент представлены в растениях в виде многочисленных изоформ, что, вероятно, связано с необходимостью разобщить пути регуляции накопления каллозы в разных частях клетки. В отличие от каллозсинтаз, активность которых регулируется посттрансляционно, активность большинства *β-1,3-глюканаз* регулируется на транскрипционном уровне.

Другие регуляторы ПД транспорта - белки группы NCAP - регуляторные белки, которые функционируют в протопласте, но не в той клетке, где они были синтезированы. Они способны менять просвет плазмодесм, однако механизмы, обеспечивающие это, не ясны. Для одного из NCAP белков известно, что его перенос происходит с помощью белка NtNCAPP (Lee, 2003), гомолог которого был обнаружен нами в списке генов, индуцируемых метанолом, причем среди самых чувствительных.

Тесты на активность межклеточного транспорта, проведенные в нашей лаборатории, показали, что сверхэкспрессия указанных генов, а также гена *MIG-21*, приводит к увеличению апертуры плазмодесм (данные не приведены).

В природной ситуации, когда насекомое или клещ повреждают ткани листа, можно найти биологический смысл в метанольной индукции стрессовых белков (таблица 2) в соседних неповрежденных клетках, включая белки NCAPP и *β-1,3-глюканазу*. Защитную функцию может нести и увеличение этими белками пропускной способности ПД. Потенциальное усиление симпластного транспорта в соседних с механической травмой зонах растения заставляет задуматься о вирусах, для которых преодоление ПД – ключевая преграда для системной инфекции, а травма растения – обязательное условие начала инфекции.

Ранее в нашей лаборатории было показано, что ГИМ, ответственные за межклеточный транспорт (NCAPP и *β-1,3-глюканаза*), способствуют повышению эффективности экспрессии GFP с вирусного вектора. Вероятно, это происходит в том числе благодаря способности ГИМ увеличивать пропускную способность ПД. Данный результат подтверждается, когда активируется весь кластер ГИМ, то есть в ситуации, когда неповрежденный лист обрабатывается метанолом (данные не приведены).

Для того, чтобы проверить гипотезу о влиянии метанола на эффективность вирусной инфекции, был проведен эксперимент на растениях *N. tabacum* с использованием ВТМ дикого типа. После заражения вирусом, растения инкубировали 18 часов с газообразным метанолом в концентрациях близких к концентрациям при травме, а через трое суток после этого были взяты высечки на qRT-PCR анализ для определения количества РНК ВТМ в листе (рисунок 10). Из гистограммы видно, что метанол повышает эффективность репродукции вируса.

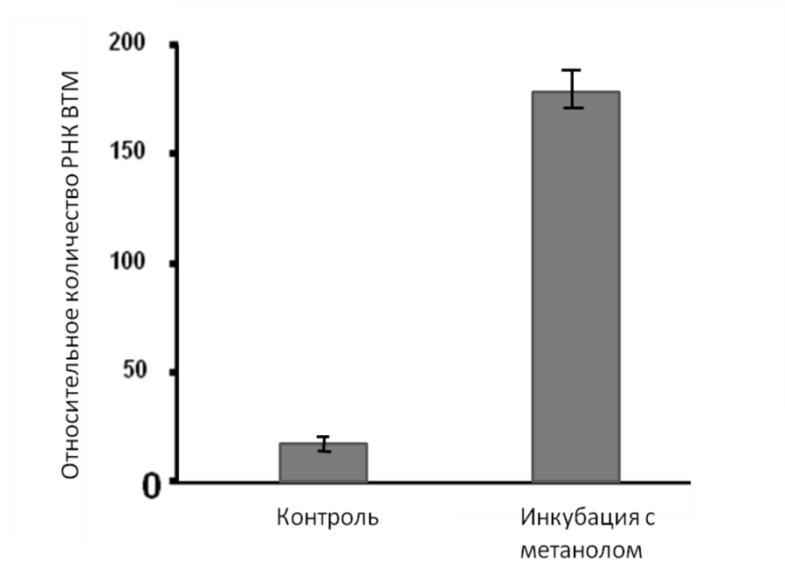


Рисунок 10. Газообразный метанол повышает эффективность репродукции ВТМ. Растения, инокулированные ВТМ, инкубировали в течение 18 часов в среде с повышенным содержанием метанола. Представлены результаты анализа qRT-PCR, за единицу принято количество вирусной РНК после инокуляции. Указаны средние значения со стандартными ошибками. Разница между опытом и контролем статистически значима. Результаты получены совместно с Т.В.Комаровой.

Эффективность репродукции вируса определяется эффективностью его межклеточного транспорта и эффективностью систем биосинтеза клетки, которые он эксплуатирует. Мы показали, что метанол приводит к повышенной репродукции РНК ВТМ, а также, что ГИМ увеличивают пропускную способность ПД. Эти два факта позволяют нам предполагать, что наблюдаемый нами эффект чувствительности табака, обработанного метанолом, к вирусу связан с активацией генов β -1,3-глюканазы, *NCAPP* и *MIG-21*.

Стоит отметить, что в опыте с ВТМ дикого типа в системе появляется еще один важный участник – это ТБ ВТМ, который сам по себе способен «открывать» ПД для вируса. Вирус попадает в клетку растения в момент травмы, а это значит, что ранние этапы заражения происходят в условиях повышенных концентраций метанола, когда начинают активно

функционировать ГИМ. При этом β -1,3-глюканаза и NCAPP имеют плазмодесмальную локализацию (Lee, 2003, Zavaliev et al., 2011). Для ТБ было показано, что он способен эксплуатировать растительные системы транспорта, связываясь с белками с периферийной локализацией для собственного внутриклеточного транспорта (например, Chen et al., 2000). Вышесказанное позволило выдвинуть гипотезу о том что ТБ ВТМ может взаимодействовать с β -1,3-глюканазой и NCAPP, которые, вероятно, активны в момент вирусной инфекции.

Для проверки наличия взаимодействия ТБ ВТМ с NCAPP и β -1,3-глюканазой был использован метод связывания белков на мембране в ренатурирующих условиях. Суть метода заключается в том, что после того, как белки, кодируемые указанными ГИМ, иммобилизовались на мембране, мембрана инкубировалась в ренатурирующем буфере с ТБ ВТМ. При наличии специфического взаимодействия, связанный на мембране из буфера ТБ детектируется на мембране специфическими антителами. Проведенные нами тесты говорят, что *in vitro* ТБ ВТМ взаимодействует с NCAPP, но не взаимодействует с β -1,3-глюканазой (рисунок 11, дорожки 1-6). Для подтверждения результата опыт был повторен, но ТБ ВТМ был изначально иммобилизован на мембране, а рекомбинантный NCAPP подавался из раствора в ренатурирующих условиях (рисунок 11, дорожки 7-11), и, при наличии взаимодействия, детектировался антителами на NCAPP. Хотя сигнал был значительно слабее, чем в экспериментах по первой схеме, мы заключили, что NCAPP связывается с ТБ ВТМ.

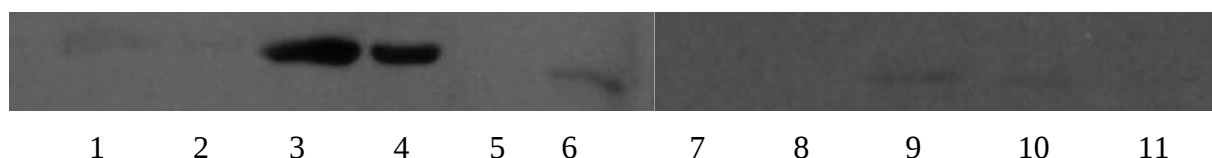


Рисунок 11. Белок NCAPP взаимодействует с ТБ ВТМ *in vitro*. Проверка взаимодействия белков методом связывания на мембране. На пленке слева (дорожки 1-6) сигнал свидетельствует о наличии белка ТБ, связанного из буфера на мембрану с иммобилизованными на ней белками: 1) β -1,3-глюканазой 1 мкг, 2) β -1,3-глюканазой 0,33 мкг, 3) NCAPP 1,5 мкг, 4) NCAPP 0,5 мкг, 5) маркерами молекулярного веса, 6) ТБ ВТМ 0,6 мкг (положительный контроль). На пленке справа (дорожки 7-11) сигнал свидетельствует о наличии белка NCAPP, связанного из буфера на мембрану с иммобилизованными на ней белками: 7) β -1,3-глюканазой 0,5 мкг, 8) маркерами молекулярного веса, 9) ТБ ВТМ 1 мкг, 10) ТБ ВТМ 0,5 мкг, 11) ТБ ВТМ 0,1 мкг.

Как было показано, содержание метанола в ткани листа зависит от уровня транскрипции и активности ПМЭ, индуцирующейся при механическом воздействии. Также показано многократное возрастание уровня эмиссии метанола при травме. Динамика накопления мРНК

генов интактного листа в атмосфере с повышенными концентрациями метанола говорит об активизации метаболизма клетки и увеличении транскрипции многих генов стрессовой защиты, а также генов регуляции межклеточной симпластной коммуникации.

Метанольный сигнал ведет к понижению устойчивости растения к вирусной инфекции, что, вероятно, связано с индукцией ГИМ, ответственных за регуляцию плазмодесм – β -1,3-глюканазы, NCAPP и MIG-21. Повышенная чувствительность к вирусу может также объясняться взаимодействием NCAPP с ТБ ВТМ, что было показано *in vitro*.

ГЛАВА II. ГИМ: участие в росте и развитии листьев табака

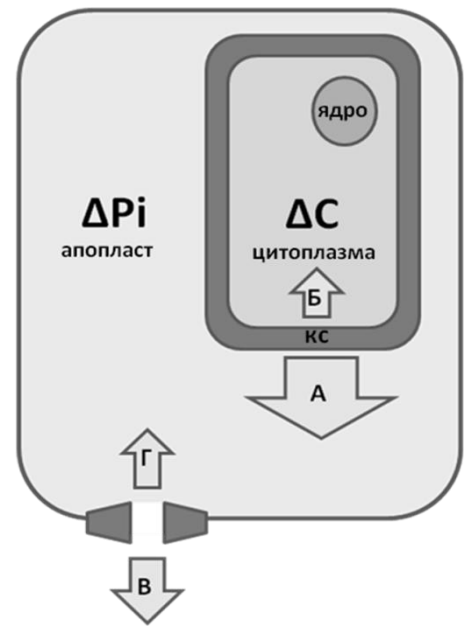
II.1. Влияние эндогенного метанола на регуляцию ГИМ

К настоящему моменту известно, что уровень эмиссии метанола растением помимо условий среды, таких как температура, влажность и освещенность зависит от двух параметров – это уровень синтеза метанола в клеточной стенке и интенсивность газообмена между средой и межклеточным пространством. В случае с механической травмой листа, оба фактора работают на повышение эмиссии, так как транскрипция гена *ПМЭ* и активность кодируемого этим геном фермента возрастают, а микроповреждения плохо проницаемой для метанола листовой кутикулы открывают межклеточное пространство для среды, то есть неконтролируемого газообмена.

В нормальных условиях эмиссия метанола может контролироваться устьицами (Nemecek-Marshall et al., 1995). При этом разница в эмиссии для состояния, когда устьица закрыты, по сравнению с состоянием, когда они открыты, является довольно большой. Такая ситуация повторяется в жизни растения ежедневно, когда метанол, накопленный в листе за ночь, скачкообразно выходит в атмосферу с открытием устьиц в начале светового дня. Более того, такой скачок в уровне эмиссии предполагает, что к концу ночи в соке растений концентрация метанола выше, чем в конце светового дня. В некоторой степени такая ситуация повторяет резкий выброс метанола при травме. Это заставляет задуматься о том, существует ли принципиальная разница между нормальными изменениями уровня метанола и стрессовыми. В первую очередь для ответа на этот вопрос необходимо понять, как соотносятся концентрации и эмиссия метанола в нормальных и стрессовых условиях.

Если представить строение листа в виде упрощенной модели, то она будет состоять из клетки, в которой собран весь метанол в жидкой фазе, клеточной стенки, в которой это вещество синтезируется, межклеточного пространства, где скапливается весь газообразный метанол, и непроницаемой для метанола оболочки с устьицами, способными регулировать газовые потоки между межклетником и средой. Согласно закону Генри изменение парциального давления метанола в межклетнике ΔP_1 прямо пропорционально изменению концентрации метанола в соке растения ΔC (рисунок 12).

Рисунок 12. Упрощенная модель растительной клетки и потоков метанола в ней (КС – клеточная стенка). А - синтез метанола в клеточной клетке; Б - метаболизм метанола клеткой; В - эмиссия метанола в среду; Г - диффузия метанола в межклеточное пространство из среды. Направление потока В-Г контролируется разницей парциального давления в межклеточном пространстве и среде, а его скорость – устьичной щелью. По закону Генри $\Delta C = k\Delta P_i$, где k – константа Генри.



В рассматриваемой модели мы не принимаем во внимание незначительную долю метанола, который окисляется клеткой, считаем, что все изменения происходят при постоянных температуре и влажности, а также полагаем, что клеточная стенка не препятствует диффузии метанола в протопласт. Стоит отметить, что метанол характеризуется высокой растворимостью в воде и, соответственно, низким коэффициентом Генри. Это означает, что большие изменения в концентрации метанола в соке приводят к незначительным изменениям парциального давления метанола в межклеточном пространстве.

Для всех случаев изменений концентрации метанола в соке, не связанных со стрессом, в частности, для ситуации, когда устьица закрыты, первичным является изменение ΔC . Это значит, что при последующем выбросе накопившегося (главным образом в соке) метанола в атмосферу в соседних тканях концентрации метанола уже близки к максимальным, т.е. этот метанол не может вызвать значительных изменений концентрации метанола в соке соседних листьев и растений, так как парциальное давление в межклеточном пространстве соседних листьев в тот момент также высоко. Данные выводы базируются на теоретических моделях из статьи (Niinemets, 2003), которые, в свою очередь, основаны на экспериментальных данных из статьи (Nemesek-Marshall et al., 1995). Также стоит отметить, что в условиях нормального роста листа при открытых устьицах система близка к стационарной, то есть независимо от концентрации метанола в соке, большая часть метанола находится в жидкой фазе и испаряется в среду со скоростью примерно равной скорости синтеза.

В ситуации, когда лист поврежден, метанол, находящийся в соке, быстро испаряется, и система возвращается к равновесному состоянию, когда метанол, синтезированный *de novo* выходит в среду, а концентрация в соке не меняется (рисунок 8). Количество метанола в соке повышается лишь через 3 часа. Можно предположить, что здесь мы видим результат

повышенной транскрипции *ПМЭ*, в пользу этой гипотезы говорят исследования эмиссии ЛОС при травме Beauchamp et al. 2005, в этой работе показан второй пик метанола после травмы. Можно также предположить, что отставание пика концентрации метанола в соке от первого пика эмиссии связано с восстановлением газонепроницаемости межклеточного пространства листа в результате «застройки» микроповреждений листовой кутикулы каллозой и восками.

Согласно нашим данным повышенные концентрации газообразного метанола вызывают закрытие устьиц в интактном растении уже через 1 час (рисунок 13). Во-первых, закрытие устьиц – это один из признаков неспецифического иммунного ответа (Melotto et al., 2006), т. е. на физиологическом уровне подтверждается вывод о том, что метанол служит сигналом о стрессе. Во-вторых, закрытие устьиц может привести к еще большему увеличению метанола в соке интактного растения за счет собственного синтеза. Таким образом, этот факт можно трактовать как гипотетические прием и усиление метанольного сигнала.

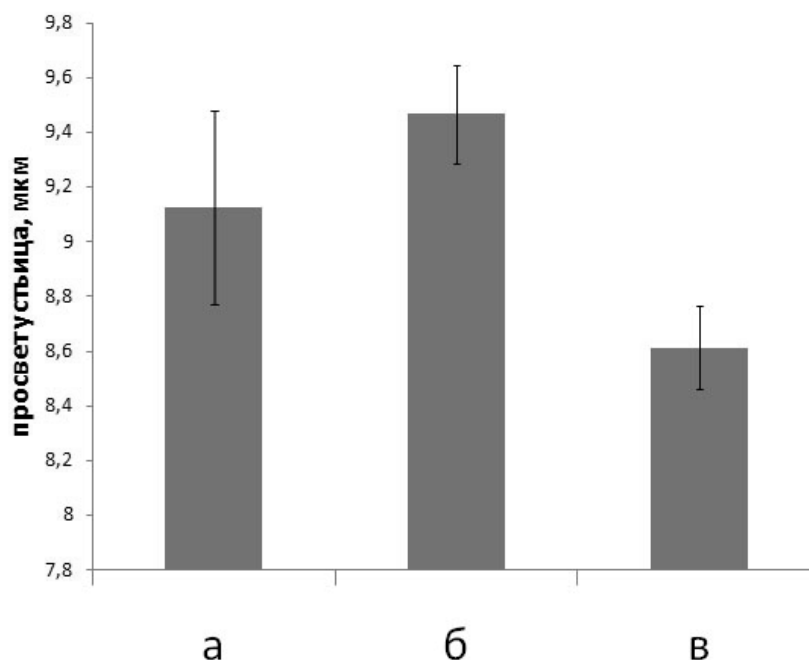


Рисунок 13. Влияние метанола на апертуру устьиц. Устьица были синхронизированы – 2 часа в темноте, затем 2 часа на свету, после этого листья помещены в герметичные емкости. В емкости «в» был метанол в количествах, близких к повышенным физиологическим. Емкость «а» помещена в темноту, а остальные две оставлены на свету. Через час проведены замеры просвета устьица. Видно, что а) в темноте устьица стали закрываться, б) на свету остались открыты, в) в присутствии метанола закрылись. Указаны средние значения со стандартными ошибками. Апертуры б и в статистически значительно отличаются.

В целом, учитывая указанную многофакторность (состояние устьиц, уровень собственного синтеза, предсуществующая концентрация), оценить вклад экзогенного метанола в изменение концентрации в соке интактной ткани довольно сложно. Однако, закрытие устьиц в ответ на повышенные концентрации метанола, позволяет предполагать, что в механизме принятия метанольного сигнала есть стадия повышения метанола в соке. То есть, при повышенных концентрациях метанола в среде устьица закрываются, и уровень метанола может расти уже за счет собственного синтеза.

Как уже было сказано, в процессе нормального развития тоже есть состояния, при которых концентрации метанола в соке значительно изменяются. Чтобы определить, чувствительны ли найденные ГИМ к таким, не связанным со стрессом, изменениям метанола, а также чтобы понять принципиальную разницу в регуляции генов, чувствительных к метанолу, в нормальных условиях и в условиях механической травмы, была использована модель sink и source листьев.

Нормальный рост растительной клетки сопровождается растяжением и изменением физических свойств клеточной стенки, вызванным деметилизацией пектина ПМЭ (Komarova et al., 2014), а значит, можно предполагать, что в растущих тканях концентрация метанола будет повышенной. Помимо созревания клеточных стенок, процесс роста растения характеризуется многими другими важными изменениями. В первую очередь, это изменение углеводного метаболизма, когда незрелые листья, потребляющие фотоассимиляты, превращаются в листья, их производящие. Незрелые листья, в этом контексте, называются sink листьями, а зрелые – source листьями, в соответствии с англоязычными статьями, где эти понятия были впервые введены (Ayre, 2011, Kühn and Grof, 2010).

Еще одна важная характеристика роста листа – это модификация межклеточного симпластного транспорта макромолекул (Burch-Smith and Zambryski, 2012). Если в sink листьях ПД простые и характеризуются высокой пропускной способностью, обеспечивающей свободный обмен молекулами между цитоплазмой соседних клеток, то при переходе к source листьям плазмодесмы становятся ветвистыми, с ограниченной пропускной способностью (Oparka et al., 1999). Для листьев *N. tabacum* sink-source зонирование хорошо изучено. Например, эти зоны можно отличить по соотношению простых первичных и разветвленных вторичных плазмодесм в ткани (рисунок 14).

Соотношение sink и source зон различно для разных по возрасту листьев одного растения (Oparka et al., 1999). Так, в молодых листьях верхних ярусов преобладают sink участки. Для листьев *N. tabacum* менее 3 см длиной практически весь лист представляет собой sink зону. На нижних же ярусах у сформировавшихся листьев большую часть листовой пластины занимает активно фотосинтезирующая source зона (рисунок 14).

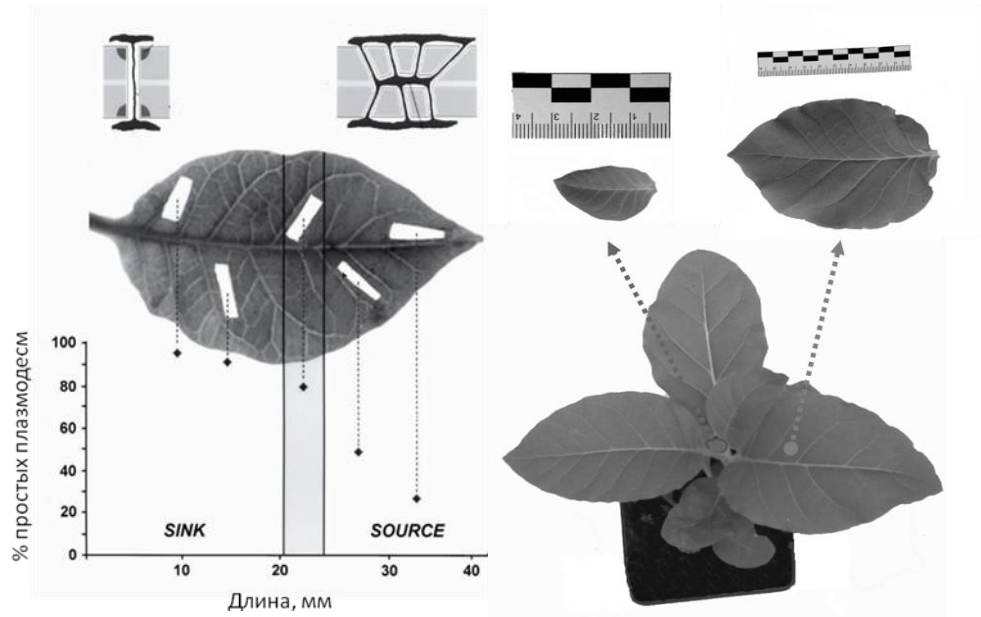


Рисунок 14. Слева, выделение sink и source зон в листе *N. tabacum* и процентный состав простых ПД в различных зонах листа (Oparka et al., 1999). Справа, sink и source листья табака, используемые в исследовании: sink лист 3 см и менее, source лист 10-13 см.

Мы проанализировали содержание мРНК ПМЭ в sink и source листьях табака с помощью qRT-PCR и оказалось, что в sink листьях содержание мРНК ПМЭ более чем в два раза выше уровня её мРНК в source листьях (рисунок 15).

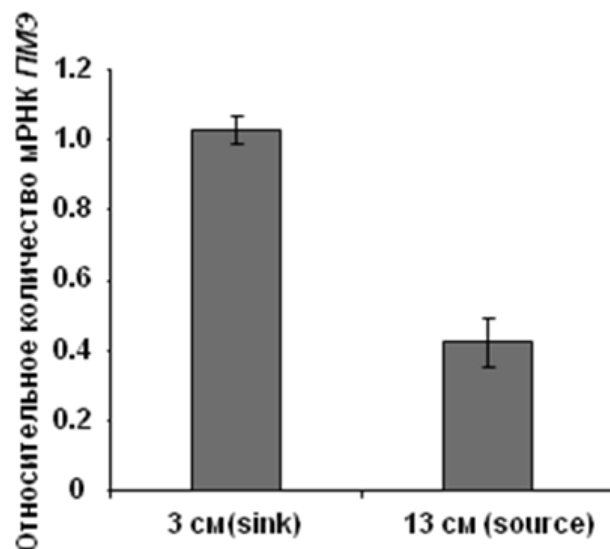


Рисунок 15. Относительное содержание мРНК ПМЭ в sink и source листьях *N. tabacum* (указаны размеры листьев) по результатам qRT-PCR анализа. За единицу принят уровень мРНК в sink листе. Расчет *t*-критерия Стьюдента для несвязанных выборок показывает, что разница статистически значима (p -значение $< 0,01$). Указаны средние значения со стандартными ошибками.

Результат по измерению мРНК *ПМЭ* соотносится с данными о концентрации метанола в соке sink листьев по сравнению с source листьями (рисунок 16), что соответствует выводам из первой главы о взаимосвязи уровня транскрипции *ПМЭ* и концентрации метанола в клетке. Данный результат подтверждается сравнением эмиссии метанола в растущих и сформировавшихся тканях растений других видов (Hüve et al., 2007).

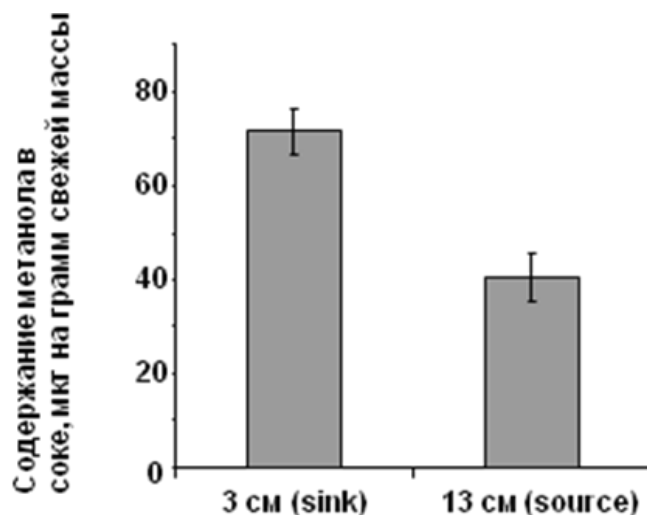


Рисунок 16. Содержание метанола в соке sink и source листьев табака *N. tabacum* (указаны размеры листьев). Расчет *t*-критерия Стьюдента для несвязанных выборок показывает, что разница статистически значима (p -значение $< 0,01$).

Наличие на одном растении зон с разной концентрацией метанола в соке позволяет сравнить влияние эндогенного метанола на активность ГИМ, для которых показана регуляция метанолом из среды. Нами был проведен qRT-PCR анализ содержания мРНК ГИМ, а именно *NCAPP*, β -1,3-глюканазы, *MIG-21* и ингибитора протеиназ II в sink и source листьях табака. Оказалось, что уровень транскрипции гена *NCAPP* не меняется, а для трех других генов увеличивается в разы в source листьях (таблица 4).

Листья табака	Относительное количество мРНК			
	β -1,3- глюканаза	<i>NCAPP</i>	<i>MIG-21</i>	Ингибитор протеиназ II
Sink (3 см)	0,8±0,1	0,8±0,1	1,0±0,1	1,0±0,1
Source (10-13 см)	41,3±1,6	1,1±0,1	21,9±3,3	3,9±0,3

Таблица 4. Содержание мРНК ГИМ в sink и source листьях табака по результатам qRT-PCR анализа. За единицу принят уровень мРНК в sink листе. Указаны средние значения и стандартные ошибки. Подсчет двухвыборочного *t*-критерия Стьюдента для выборок, соответствующих sink и source листьям, показывает, что изменение значимо для всех генов, кроме *NCAPP*.

Такой результат говорит о том, что уровни транскрипции найденных ранее ГИМ зависят не только от концентрации метанола в соке в данный момент времени. Гены β -1,3-глюканазы и ингибитора протеиназ II кодируют белки неспецифического стрессового ответа, для которых активация метанолом является не единственным механизмом регуляции. Например, описаны случаи повышения иммунитета листа при его старении, связанные с гормональной регуляцией (Carella et al., 2014).

Для гена *NCAPP* становится понятно, что либо существуют дополнительные механизмы его регуляции, либо его активность зависит не от концентрации метанола в соке, а, например, от скорости её изменения. Другая гипотеза состоит в том, что на выбранные ГИМ влияет изменение концентрации именно газообразного метанола в межклеточном пространстве (изменение ΔP_i , рисунок 12). Эта версия базируется на том, что при нормальном росте изменение парциального давления метанола происходит через изменение ΔC вследствие работы собственной ПМЭ и изменение ΔP_i в межклеточном пространстве в десятки раз недостижимо (Niinemets, 2003), однако такие резкие изменения теоретически возможны при механической травме листа, когда метанол поступает в газообразном виде из среды. Проверить это предположение технически сложно из-за низкой чувствительности существующих систем детекции газообразного метанола.

Так или иначе, данная экспериментальная система подходит для того, чтобы сравнить характер изменений, происходящих в клетке под воздействием метанола, полученного из среды, с характером изменений в клетке под воздействием метанола, повышенного в результате активности собственной ПМЭ.

II.2. Новые ГИМ с дифференциальной экспрессией в sink и source зонах листа

Итак, в source участках листьев хлоропласты полностью сформированы и способны обеспечить углеводами не только клетки данной зоны, но также экспортировать сахара во флоэмный ток. В растущих листьях находятся sink зоны, которые импортируют углеводы из флоэмы.

Нами были определены гены, уровень транскрипции которых наиболее значимо различается в sink и source зонах, а значит в условиях повышенного и пониженного фонового уровня эндогенного метанола, соответственно. Анализ проводился с помощью метода вычитающей подавляющей гибридизации – было проведено сравнение образцов тотальной РНК из sink и source листьев. Было получено 26 последовательностей, которые активнее накапливаются в зрелой source ткани, и 66 последовательностей, наиболее представленных в растущей sink ткани (Таблица 5).

Ген	Предполагаемая функция	Лучшее выравнивание с последовательностью из растения		Количество EST	Номер в базе European Nucleotide Archive
		Вид	e-значение		
Повышенная экспрессия в source листьях					
*Sugar transporter	Предполагаемый двунаправленный транспортер сахара, активность которого сопряжена с транспортом продуктов фотосинтеза и sink-source трансформацией листа	S. lycopersicum	1e-29 1e-29 7e-149 7e-149 5e-171	5	HG425058 HG425064 HG424987 HG425059 HG425069
*Auxin-repressed protein	Генная мишень воздействия ауксинов, регулирующих рост растения	N. tabacum	8e-54 0 0	3	HG425066 HG425070 HG425074
*Elicitor responsible protein	Участие в транспорте продуктов фотосинтеза и вирусов по флоэме	N. tabacum	5e-105 0 0	3	HG424989 HG424990 HG424991
	кДНК с неизвестной функцией	S. lycopersicum	3e-84 9e-105	2	HG425057 HG424988
		Гомологи не обнаружены		2	HG425055 HG425063
Glucosyl transferase	Участвует в биосинтезе сахаров	N. tabacum	8e-172	1	HG425054
Glutathione transferase	Участвует в процессах детоксификации	N. benthamiana	1e-152	1	HG425060
*Salicylic acid binding catalase	Участие в росте растения, является генной мишенью воздействия салициловой кислоты	N. tabacum	0	1	HG425067
GRP3	Кодирует синтез предшественника глицин-богатого белка	N. tabacum	0	1	HG425056
ATP carrier protein	Транслоказа АДФ/АТФ	S. tuberosum	0	1	HG425071

<i>ATOX1-like</i>	Вероятный переносчик ионов меди	<i>S. lycopersicum</i>	3e-109	1	HG425073
<i>Putative peptide/nitrate transporter At5g14940-like</i>	Вероятный переносчик пептидов/нитратов	<i>S. lycopersicum</i>	1e-162	1	HG425068
<i>Putative chloroplast thiazole biosynthetic protein</i>	Участие в синтезе хлоропластного тиазола	<i>N. tabacum</i>	1e-161	1	HG425062
<i>Putative elongation factor Tu, mitochondrial-like</i>	Участие в синтезе белка	<i>S. lycopersicum</i>	0	1	HG425072
	кДНК с неизвестной функцией	<i>S. lycopersicum</i>	7e-115	1	HG425061
	кДНК с неизвестной функцией	<i>S. lycopersicum</i>	6e-16	1	HG425065
Повышенная экспрессия в sink листьях					
<i>Chlorophyll a/b binding proteins (CABs)</i>	Участие в фотосинтезе	<i>N. tabacum</i>	0 3e-96 0 0 0 0 0 0 7e-97 0 8e-119	11	HG424982 HG424994 HG425000 HG425003 HG425010 HG425018 HG425019 HG425032 HG425042 HG425048 HG425005
<i>Chloroplast genome encoded ribosomal proteins</i>	Участие в биосинтезе белка в хлоропластах	<i>N. tabacum</i>	0 0 0 0 0 0 0 5e-97	8	HG424986 HG425013 HG425014 HG425030 HG425034 HG425045 HG425049 HG425031
<i>*Sieve element occlusion protein</i>	Участие в транспорте продуктов фотосинтеза, участвует в репарации ситовидного элемента флоэмы при его повреждении	<i>N. tabacum</i>	0 0 0 0	4	HG425012 HG425008 HG425021 HG425022
<i>H2A and H3 histone proteins</i>	Гистоновые белки	<i>N. tabacum</i>	0 0 5e-159 0	4	HG424983 HG425011 HG425017 HG425023
		Гомологи не обнаружены		4	HG424985 HG425006 HG425024 HG425043
<i>Oxygen evolving complex 33 kDa photosystem II protein</i>	Участие в фотосинтезе	<i>N. tabacum</i>	0 3e-178 0	3	HG425001 HG425036 HG425037

<i>Chloroplast plastocyanin precursor</i>	Участие в фотосинтезе	<i>N. benthamiana</i>	3e-154 0 5e-126	3	HG425007 HG425020 HG425044
<i>Mg protoporphyrin IX chelatase</i>	Участие в биосинтезе протопорфирина	<i>N. tabacum</i>	0 0	2	HG424999 HG425038
<i>NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase</i>	Участвует в биосинтезе порфирина и хлорофилла	<i>N. tabacum</i>	3e-136 0	2	HG424993 HG425029
<i>Plasma membrane intrinsic protein PIP2</i>	Участвует в передаче сигнала	<i>S. chacoense</i>	3e-168 8e-60	2	HG424995 HG425028
<i>Ascorbate oxidase-related protein</i>	Участвует в метаболизме аскорбиновой кислоты	<i>N. tabacum</i>	0 3e-166	2	HG425027 HG425051
<i>Lipase At5g33370-like</i>	Фермент с липазной активностью	<i>S. lycopersicum</i>	5e-36 2e-76	2	HG424984 HG425047
<i>Maturase K</i>	Участвует в созревании тРНК	<i>N. tabacum</i>	0	1	HG425025
<i>Chloroplast genome encoded tRNA</i>	Участвует в биосинтезе тРНК	<i>N. tabacum</i>	0	1	HG425035
<i>RNA binding protein</i>	Участвует в биосинтезе белка	<i>N. plumbaginifolia</i>	0	1	HG424997
<i>Chloroplast carbonic anhydrase</i>	Участвует в фотосинтезе	<i>N. tabacum</i>	0	1	HG425039
<i>Putative porphobilinogen deaminase, chloroplastic-like</i>	Участвует в биосинтезе порфирина и хлорофилла	<i>S. lycopersicum</i>	0	1	HG424992
<i>Putative cytochrome P450 77A3-like</i>	Член семейства цитохромов	<i>S. lycopersicum</i>	0	1	HG424998
<i>Putative pentatricopeptide repeat-containing protein At1g74850, chloroplastic-like</i>	Участвует в функционировании хлоропластов	<i>S. lycopersicum</i>	0	1	HG425041
<i>Acyl carrier protein</i>	Участвует в биосинтезе жирных кислот	<i>S. lycopersicum</i>	6e-91	1	HG425002
<i>1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase</i>	Участвует в биосинтезе стероидов	<i>N. tabacum</i>	0	1	HG425009
<i>Cellulose synthase catalytic subunit</i>	Участвует в биосинтезе целлюлозы	<i>N. alata</i>	0	1	HG425040

<i>Leucine rich repeat receptor protein kinase CLAVATA1</i>	Участвует в морфогенезе растений	<i>S.peruvianum</i>	0	1	HG425015
<i>ROX1 homolog</i>	Участвует в гиперчувствительной реакции клетки	<i>N. tabacum</i>	0	1	HG425033
<i>Guard cell proline-rich protein</i>	Белок, преимущественно синтезирующийся в клетках устьиц	<i>S. tuberosum</i>	0	1	HG425052
<i>Serine hydroxymethyltransferase 1-like</i>	Участвует в метаболизме аминокислот	<i>S. lycopersicum</i>	0	1	HG425016
<i>Putative early nodulin-like protein 2-like</i>	Стрессовый белок, участвует в передаче сигнала	<i>S. lycopersicum</i>	4e-137	1	HG425004
<i>Putative polygalacturonase At1g48100-like</i>	Участвует в метаболизме клеточной стенки	<i>S. lycopersicum</i>	0	1	HG424996
<i>Putative T-complex protein 1 subunit theta-like</i>	Белок со свойствами шаперона	<i>S. lycopersicum</i>	0	1	HG425046
	кДНК с неизвестной функцией	<i>N. tabacum</i>	0	1	HG425050
	кДНК с неизвестной функцией	<i>S. lycopersicum</i>	2e-115	1	HG425053

Таблица 5. Гены с дифференциальной экспрессией в sink и source листьях по результатам вычитающей подавляющей гибридизации. *, гены, отобранные для дальнейшего анализа.

Из результатов вычитающей гибридизации видно, что в sink зоне происходит активное накопление мРНК генов, кодирующих компоненты аппарата фотосинтеза, белки, участвующие в синтезе тРНК, белки клеточной стенки, белки-регуляторы морфогенеза. В то же время в source зоне наиболее представлены гены, кодирующие белки-транспортеры сахаров, а также белки гормональной регуляции. В целом полученные результаты отражают и согласуются с теми свойствами, которыми характеризуются sink и source зоны.

Однако данное множество генов имеет лишь единичные случаи пересечений с множеством генов, индуцируемых экзогенным метанолом - это гены, кодирующие белок, связывающий хлорофилл a/b (chlorophyll a/b binding protein), и каталазу, связывающую салицилат (SABC). Активную транскрипцию в растущем листе генов, кодирующих белки, связывающие хлорофилл a/b, можно объяснить образованием тилакоидных мембран хлоропластов (Green et al., 1991). Индукция этих же генов в ответ на метанол, может быть причиной повышения биомассы растений, показанное при опрыскивании растений 10-50% водными растворами метанола (Nonomura and Benson, 1992). Ген SABC, вовлеченный в пути

рецепции салициловой кислоты (Sanchez-Casas and Klessig, 1994), оказался в группе ГИМ, а также в группе генов, активированных в source ткани.

По результатам двух вычитающих гибридизаций как в множестве генов, активированных экзогенным метанолом, так и в множестве, ассоциированном с sink тканью, значительную часть составляют гены, кодирующие белки анаболизма. Несмотря на это, можно заключить, что данный эксперимент не выявил значительных общих черт для этих двух состояний растительной клетки. А именно, клетки с высоким уровнем метанола от собственной формирующейся клеточной стенки и клетки, принявшей метанол извне от поврежденных соседних клеток.

Стоит отметить, что чувствительность метода вычитающей гибридизации ниже, чем, например, сравнение транскриптомов с помощью микрочипов, т.к. выбор дифференциально-экспрессируемых последовательностей для секвенирования (EST) является случайным. Чем больше EST секвенировано, тем больше дифференциально транскрибируемых генов получит исследователь. Можно предположить, что экспрессия общего для двух исследуемых ситуаций гена-регулятора меняется не столь значительно, и в данном эксперименте нам его выявить не удалось.

По тому, сколькими EST представлен найденный ген, можно косвенно судить о степени изменения его экспрессии. В связи с этим для дальнейшей верификации из активных в source ткани генов были взяты наиболее представленные – это гены *транспортера сахара* (*sugar transporter, ST*), *белка ERP (elicitor responsible protein)*, *белка, подавляемого ауксином (auxin-repressed protein, ARP)*, а также *SABC*, так как для него показана реакция на метанол (таблица 2). Для первых двух генов показано участие в транспорте продуктов фотосинтеза (Chen et al., 2012; Chen et al., 1993), а про *ARP* известно, что он задействован в механизме рецепции ауксина (Li et al., 2005). Из активно транскрибируемых в sink зоне генов для проверки был взят ген *sieve element occlusion protein (SEOP)*, так как остальные хорошо представленные EST связаны с генами формирования хлоропластов и гистонами, регуляция которых априори не может определяться лишь метанолом. Ген *SEOP* кодирует белок, контролирующий флоэмный ток в ситовидных элементах (Ernst et al., 2012).

qRT-PCR анализ содержания мРНК отобранных для верификации генов в листьях разных ярусов подтвердил изменение уровня их транскрипции в разы в sink и source зонах (рисунок 17).

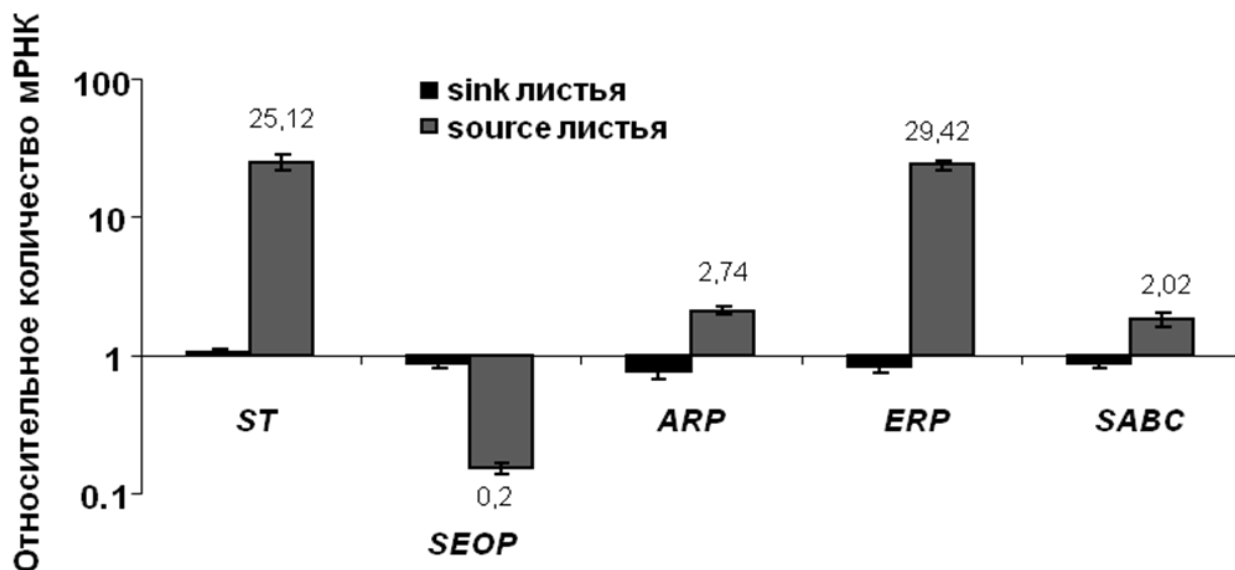


Рисунок 17. Верификация генов, отобранных по результатам вычитающей подавляющей гибридизации для дальнейшего изучения методом qRT-PCR. Оценка уровня накопления мРНК *ST*, *SEOP*, *ARP*, *ERP* и *SABC* в листьях разных ярусов, по оси ординат логарифмическая шкала, за единицу принято содержание мРНК в sink листьях. Указаны средние значения и стандартные ошибки. Для каждого из указанных генов разница в уровне накопления мРНК в sink и source листьях статистически значима ($p < 0,01$).

Далее для этих же генов была проведена проверка чувствительности к газообразному метанолу из среды (рисунок 18). Показано, что в ответ на метанол статистически значимые изменения наблюдаются только для генов *SEOP*, *ARP* и *SABC*. Учитывая, что уровень накопления мРНК *ARP* увеличен в source участках листа, для которых показано низкое содержание метанола, здесь, как и в случае с ГИМ, идентифицированными в первой главе, можно предположить наличие других способов регуляции данного гена, помимо метанола. Уровень накопления мРНК *SEOP*, как в случае с эндогенным метанолом в sink ткани, так и в случае с метанолом извне, возрастает. Таким образом, *SEOP* является примером гена, который отвечает на повышение концентрации метанола, независимо от источника этого метанола (соседний травмированный лист или собственная клеточная стенка). Это, в свою очередь, позволяет предполагать, что существуют механизмы общие для состояния роста и состояния ответа на метанольный сигнал от поврежденного растения, которые основаны на рецепции уровня метанола генами, подобными *SEOP*.

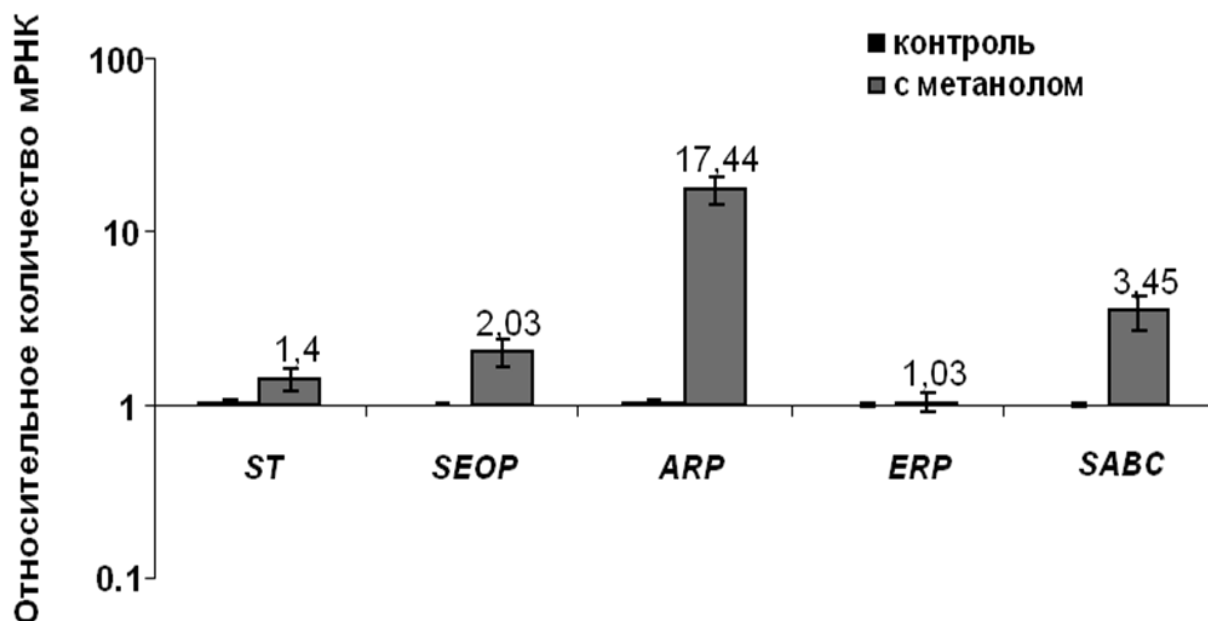


Рисунок 18. qRT-PCR анализ накопления мРНК генов, отобранных по результатам вычитающей подавляющей гибридизации для дальнейшего изучения. Относительное количество мРНК *ST*, *SEOP*, *ARP*, *ERP* и *SABC* в листьях *N. tabacum* после воздействия газообразного метанола, по оси ординат логарифмическая шкала, за единицу принято содержание мРНК в контрольных листьях. Указаны средние значения и стандартные ошибки. Расчет двухвыборочного *t*-критерия Стьюдента показывает, что разница значений уровня мРНК между контрольными и обработанными метанолом растениями статистически значима для генов *SEOP*, *ARP* и *SABC*.

Итак, в дополнение к списку генов, индуцируемых метанолом, таких как *NCAPP*, β -1,3-глюканаза, *MIG-21*, ингибитор протеиназ II можно добавить *SEOP*, *ARP* и *SABC*. Особенно стоит отметить ген *SEOP*, так как он активировался сразу в двух моделях метанольного сигнала, описанных в данном исследовании. Как было показано, один из эффектов действия метанола из среды основан на активизации межклеточного транспорта, в частности, из-за повышения накопления мРНК *NCAPP*, β -1,3-глюканазы и *MIG-21*. В то же время для sink и source зон растения также показан разный уровень активности симпластного транспорта. Более того, эта активность коррелирует с содержанием метанола в соке – в зонах с повышенными концентрациями метанола транспорт более активен. Как стало понятно из результатов сравнения транскриптомов в sink и source листьях, сложно говорить об определяющей роли метанола в этом процессе – накопление мРНК найденных прежде генов-регуляторов ПД транспорта в sink участках подавлена, как в случае с β -1,3-глюканазой и *MIG-21*, или не изменяется, как в случае с *NCAPP* (таблица 4). Однако для гена *SEOP* этого несоответствия не существует, что позволяет выдвинуть гипотезу о том, что *SEOP* активирует межклеточный транспорт.

Методы исследования межклеточного транспорта на сегодняшний день довольно разнообразны, но все они основаны на принципе наблюдения за распространением маркерных агентов – флуоресцентных белков или красителей – из одной клетки в соседние. В нашей лаборатории для исследования плазмодесмального транспорта был выбран метод транзientной агробактериальной трансформации одиночных растительных клеток бинарным вектором, содержащим двукратный GFP (2xGFP, green fluorescent protein) под контролем CaMV 35S-промотора (промотор вируса мозаики цветной капусты (cauliflower mosaic virus), широко применяемый в биотехнологии, далее обозначается 35S). Двукратный GFP имеет молекулярную массу 54 кДа, и, как было показано в литературе, это превышает пропускную способность ПД в клетках большинства тканей растения, так как, в основном, проходить через ПД могут молекулы с молекулярной массой менее 47 кДа (Zambryski and Crawford, 2000).

Для начала, на нашей экспериментальной системе была подтверждена разница в активности межклеточного транспорта в sink и source зонах, описанная в литературе. Итак, в единично трансформированной клетке был синтезирован репортерный белок, содержащий две слитых между собой копии белка GFP. Генетическая конструкция, содержащая ген *2xGFP* под контролем 35S промотора доставлялась в sink и source листья *N. tabacum* с помощью инъекции разбавленной суспензии соответствующей агробактерии (Crawford and Zambryski, 2000). Через 24 ч проводили подсчет флуоресцирующих клеток эпидермиса, дающий количественную оценку распространения 2xGFP из клетки в клетку. В случае пониженной пропускной способности ПД, характерной для зрелых source листьев, 2xGFP обнаруживался в основном в одиночных клетках. При «открытых» ПД флуоресцентный сигнал был распределен в кластерах, состоящих из 2–4 клеток (рисунок 19). Из гистограммы видно, что в source листьях около 15% кластеров представляют собой группы клеток, тогда как в sink листьях доля многоклеточных кластеров поднимается до 25%, что свидетельствует о повышенной пропускной способности плазмодесм.

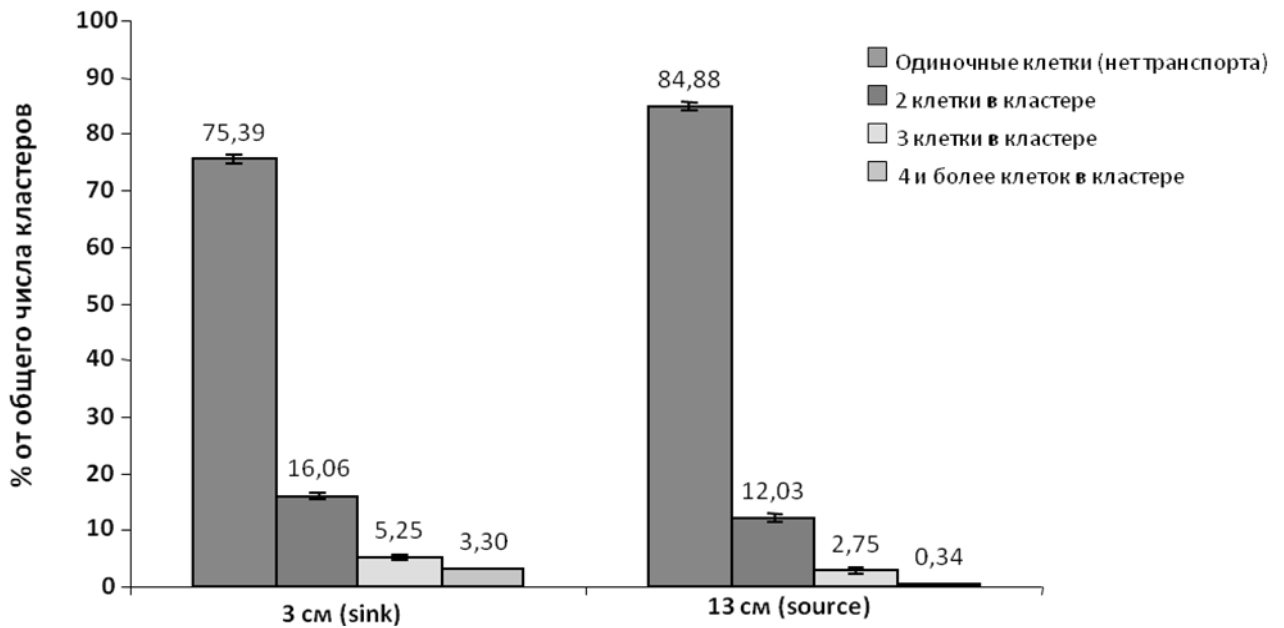


Рисунок 19. Сравнение активности межклеточного транспорта в sink и source листьях табака с помощью 2xGFP. Не менее 1000 кластеров было подсчитано для каждого эксперимента. Указаны средние значения и стандартные ошибки. Расчет двухвыборочного *t*-критерия Стьюдента показывает, что различие статистически значимо.

Далее мы аналогичным образом оценили влияние экспрессии гена *SEOP* на межклеточный транспорт. Для этого последовательность *SEOP* под контролем 35S промотора была перенесена в бинарный вектор. Затем проводилась совместная агротрансформация растений этим вектором, дающим сверхэкспрессию *SEOP*, с репортерной конструкцией, несущей 2xGFP под контролем 35S промотора. Вероятность того, что одиночные трансформированные 2xGFP клетки будут трансформированы еще и плазмидой, кодирующей *SEOP* под контролем 35S промотора, очень высока, так как суспензия агробактерии, несущей плазмиду с *SEOP*, была гораздо более концентрированная, что соответствовало $OD_{600} = 0,1$. При такой плотности суспензии, по нашим наблюдениям, можно говорить о трансформации практически всех клеток эпидермиса листа. Через сутки производился подсчет кластеров с 2xGFP. По результатам такого анализа *SEOP* (рисунок 20), как и некоторые другие ГИМ, способен повышать пропускную способность плазмодесм.

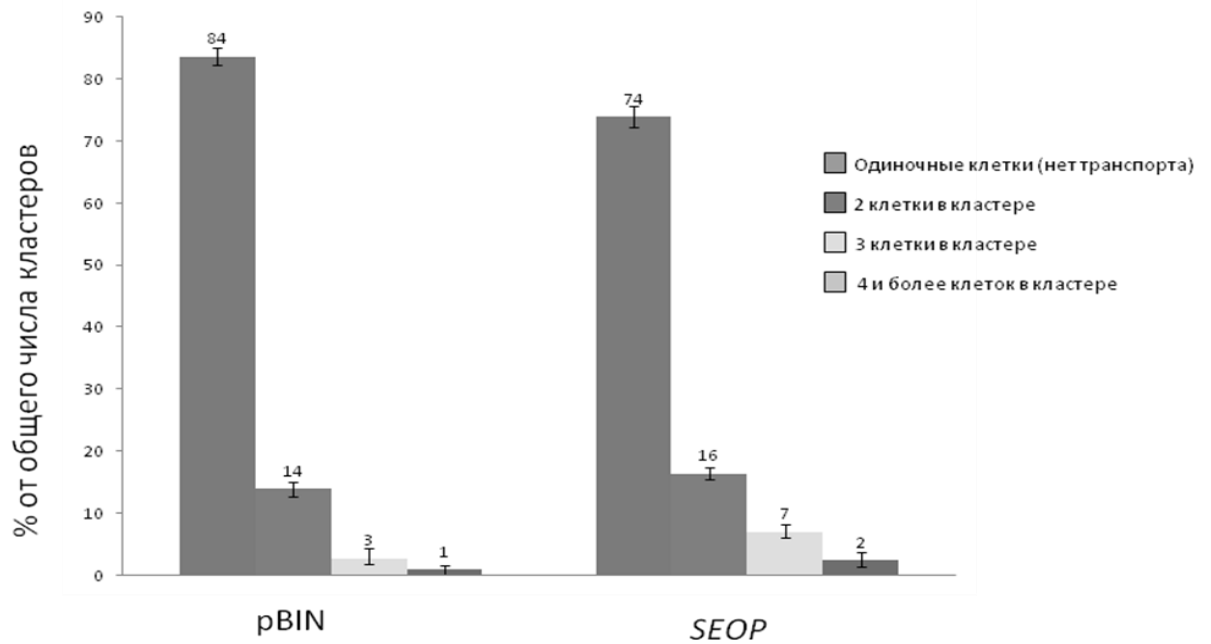


Рисунок 20. Оценка активности межклеточного транспорта с помощью 2xGFP в растениях со сверхэкспрессией *SEOP* в сравнении с контрольным растением, трансформированным «пустым» вектором pBIN. Указаны средние значения и стандартные ошибки. Расчет *t*-критерия Стьюдента для несвязанных выборок показывает, что изменение статистически значимо.

Подводя итог, можно сказать, что концентрация метанола в соке не является определяющей для активации накопления мРНК большинства ГИМ, как показывает sink-source модель. Однако, оценка физико-химических процессов внутри листа, а также феномен закрытия устьиц, указывают на то, что сигнал передается именно через увеличение метанола в соке. Sink-source модель позволила найти новые гены, индуцируемые метанолом, среди которых – ген *SEOP*, который чувствителен к метанолу, независимо от его источника. Более того, повышение экспрессии этого гена приводит к активации межклеточного транспорта, что также является одним из эффектов действия метанола на интактный лист в модели с механическим повреждением.

Наличие такого гена как *SEOP* говорит о том, что клетка принципиально способна реагировать на изменения концентрации метанола в соке. Учитывая, что в процессе роста и суточных циклов содержание метанола в клетке меняется, можно допустить, что существуют клеточные механизмы, основанные на изменении уровня метанола в цитоплазме.

qRT-PCR анализ мРНК β -1,3-глюканазы, *MIG-21*, ингибитора протеиназ II и *NCAPP* в sink и source тканях показал, что при повышенной концентрации эндогенного метанола накопление мРНК этих генов подавлена или не меняется, как в случае с *NCAPP* (таблица 4). В главе I было показано, что экзогенный метанол активирует те же гены (таблица 3). Это означает, что существует дополнительный фактор, который позволяет клетке отличить эти два

источника метанола. Стоит отметить, что среди всех идентифицированных ГИМ *NCAPP* является единственным, мРНК которого накапливается, только когда лист получает метанол из среды. Этот факт привел нас к необходимости дальнейшего изучения данного гена.

ГЛАВА III. Механизм обратной связи в системе «метанол-NCAPP-ПМЭ-метанол»

III.1. Промотор гена NCAPP чувствителен к метанолу

Как было показано в первой главе экспериментальной части диссертации повышенные концентрации метанола в среде, вызванные травмой соседнего растения, активируют в неповрежденном растении накопление мРНК ряда генов, значительная часть которых связана с иммунным ответом. Стоит отметить, что любое механическое воздействие связано с эмиссией метанола растением, но при этом не каждое из таких воздействий станет началом активной атаки фитопатогена. В качестве примеров можно назвать перераспределение весовой нагрузки в результате роста, воздействие ветра или не связанную с травмой активность насекомых на растении. Таким образом, повышение иммунного статуса интактных тканей растения в результате принятия метанольного сигнала извне является, в некотором роде, «страховкой» от атаки, то есть трата ресурса на синтез стрессовых белков может оказаться избыточной. В связи с этим, можно предположить, что экспрессия ГИМ должна быть строго регулируемой. И, естественно, метанол должен выступать одним из участников такой регуляции.

Повышение накопления мРНК ГИМ, в частности NCAPP, в ответ на метанол уже было продемонстрировано (таблица 3). Для дальнейшего изучения этой системы в нашей лаборатории был изолирован транскрипционный промотор гена NCAPP длиной 1500 пар нуклеотидов (последовательность в GenBank: HG937605.1). Этот ген был выбран как единственный из найденных ГИМ, чувствительный к экзогенному метанолу и нечувствительный к изменениям концентрации эндогенного метанола, связанного с ростом растения. Указанная особенность делает ген NCAPP особенно интересным, так как это может означать, что он участвует в механизме, позволяющем отличать изменение концентрации метанола в стрессовых и нормальных условиях. С помощью метода «прогулка по хромосоме» была получена последовательность, находящаяся перед кодирующей частью гена NCAPP в растении *N. benthamiana*. На основе этой последовательности были созданы три бинарных вектора с вариациями по длине промотора (500, 1000 и 1500 пар нуклеотидов) и репортерным геном GUS, кодирующим фермент β-глюкуронидазу. Агротрансформация растений полученными векторами с последующим измерением активности фермента GUS, показала, что чем длиннее участок промотора, тем сильнее сигнал. Однако для участков промотора длиной 1000 и 1500 пар нуклеотидов сигнал статистически неразличим. При этом длины последовательности в 1000 пар нуклеотидов (далее будет обозначаться как prNCAPP) достаточно для того, чтобы стабильно детектировать сигнал, поэтому данная конструкция была отобрана для дальнейших исследований (рисунок 21). В качестве положительного контроля

был взят вектор, кодирующий фермент GUS под контролем 35S промотора, для которого уже показана эффективная транскрипция в двудольных растениях (Odell et al., 1988).

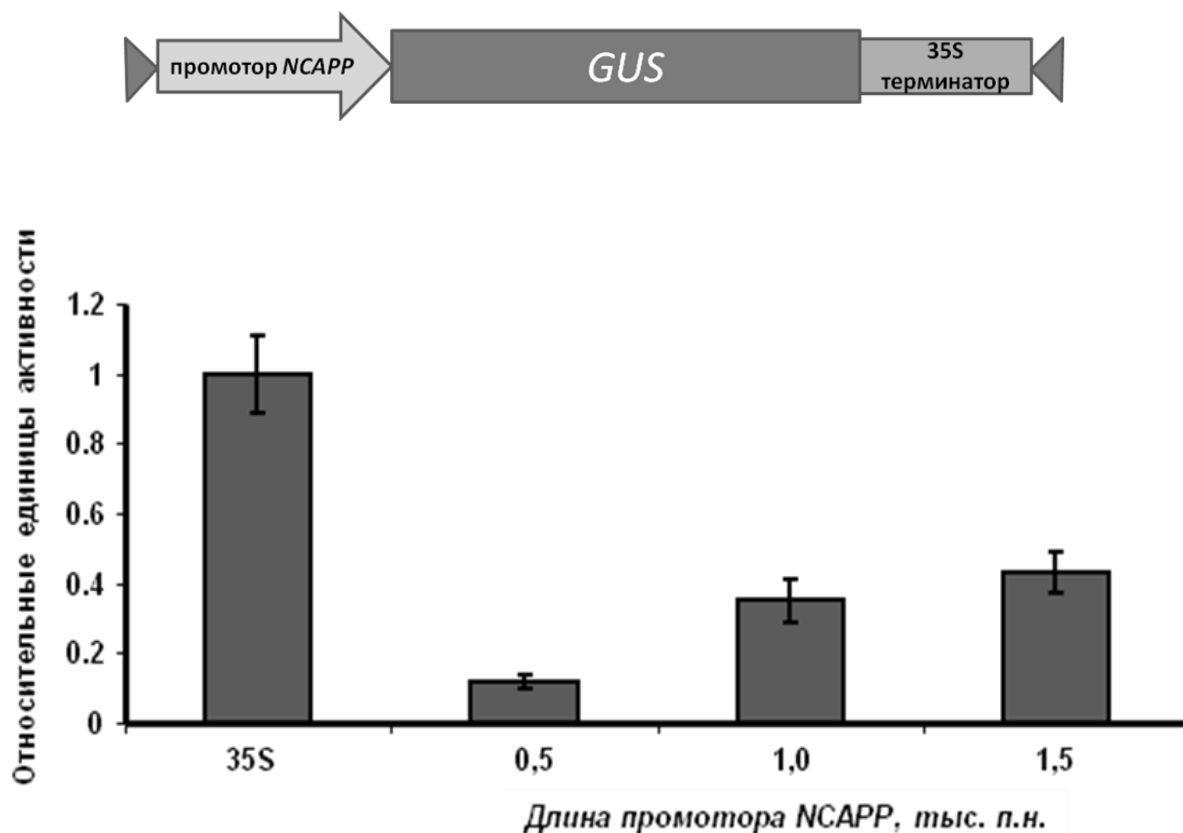


Рисунок 21. Схема конструкции для изучения транскрипционной активности участков промотора гена *NCAPP* разной длины (сверху), а также результаты измерения активности GUS после агротрансформации растений *N. benthamiana* контрольной конструкцией 35S-GUS, эффективность которой принята за 1, и конструкциями под контролем фрагмента промотора *NCAPP* разной длины. Приведены средние значения и стандартная ошибка. Расчет *t*-критерия Стьюдента для несвязанных выборок показывает, что разница статистически значима между любыми двумя конструкциями, кроме как между пр*NCAPP*-GUS длиной 1000 и 1500 пар нуклеотидов.

Стоит отметить, что агробактериальную транзиентную систему экспрессии нельзя использовать в экспериментах по проверке чувствительности к метанолу, так как процедура инокуляции является значительным механическим стрессом для растительной ткани сама по себе. Более того, в литературе описано значительное увеличение экспрессии ПМЭ при взаимодействии растительной клетки с агробактерией (Senechal et al., 2014). Поэтому для дальнейшей работы были получены растения *N. benthamiana*, стабильно экспрессирующие ген *GUS* под контролем промотора *NCAPP* длиной 1000 пар нуклеотидов (линии трансгенных растений 2A, 2F, 4, 10, 11, последовательность введенного трансгена в GenBank: HG974538.1).

Инкубация трансгенных растений линии 2F в среде с повышенным содержанием метанола и последующий qRT-PCR анализ накопления мРНК гена *GUS*, показывают, что промотор гена *NCAPP* чувствителен к метанолу (рисунок 22).

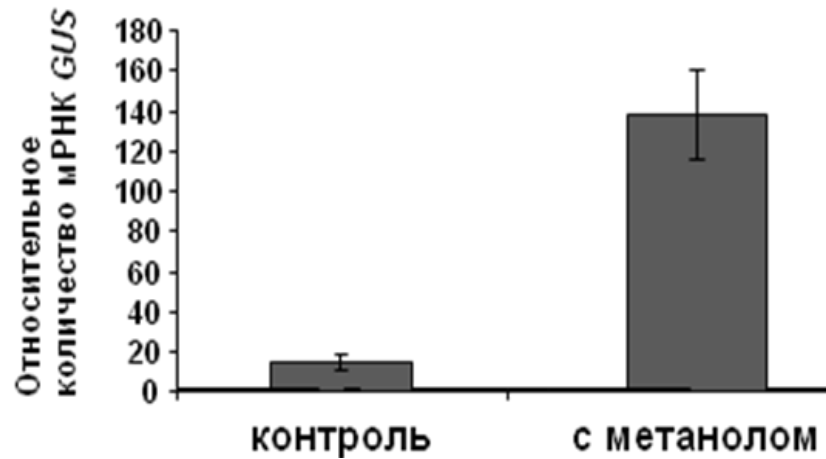


Рисунок 22. Уровень накопления мРНК *GUS* в трансгенных растениях *N.benthamiana* линии 2F (пр*NCAPP-GUS*) через 24 часа после 6-ти часовой инкубации в среде с повышенной концентрацией метанола. Уровень мРНК до инкубации принят за единицу, в качестве контроля – инкубация растений той же линии при инкубации без добавления метанола. Приведены средние значения и стандартная ошибка. Изменение накопления мРНК трансгена в ответ на метанол статистически значимо.

Интересно, что в трансгенных растениях уровень транскрипции самого гена *NCAPP* падает в десятки раз по сравнению с *N. benthamiana* дикого типа. Нокдаун этого ГИМ наблюдается во всех полученных линиях, то есть, вероятно, речь идет о сайленсинге *NCAPP*, а не о случайном попадании трансгена в область, ответственную за его транскрипцию. Особенно значительно уровень накопления мРНК *NCAPP* понижен в растениях линии 2F, и не меняется в последующих двух поколениях этой линии. Проведенный в нашей лаборатории 5' RACE анализ транскрипта гена *NCAPP* в растениях *N. benthamiana* дикого типа, а также транскрипта гена *GUS* в трансгенах 2F, показал, что данные мРНК имеют гомологичный участок длиной 24 нуклеотида. Наличие такого гомологичного участка позволяет предполагать, что в данной ситуации речь идет о ко-супрессии *NCAPP* из-за внесенного фрагмента этого гена. Этот вопрос требует дальнейшего изучения, но, так или иначе, в полученных трансгенных растениях уровень накопления мРНК *NCAPP* значительно снижен (рисунок 23).

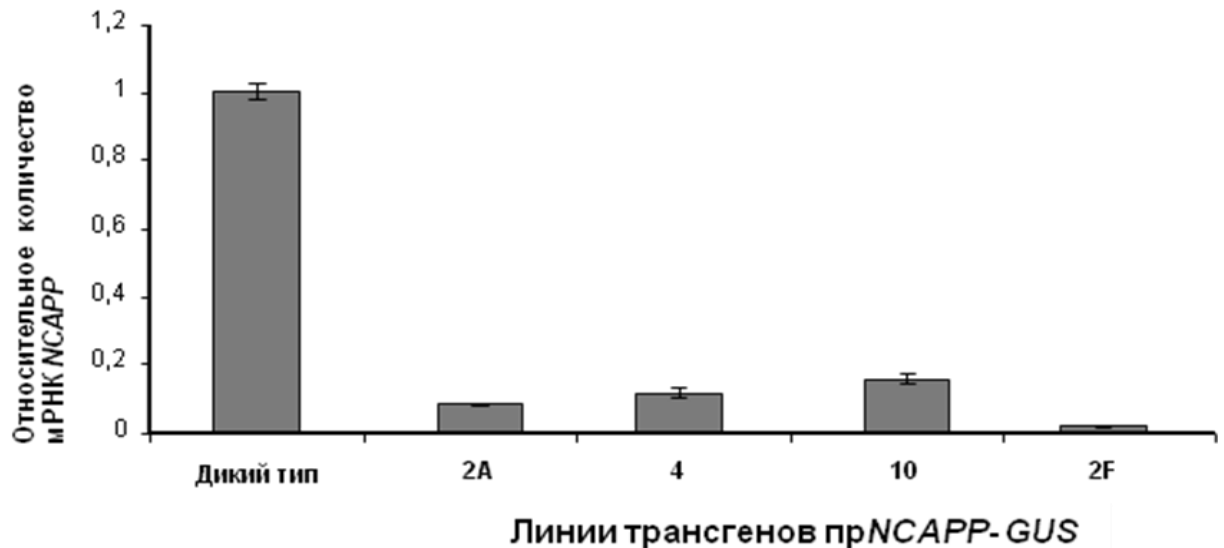


Рисунок 23. Накопление мРНК *NCAPP* в растениях разных линий, несущих трансген *GUS* под контролем пр*NCAPP*. Приведены средние значения и стандартная ошибка. Уровень мРНК в растении дикого типа был принят за единицу, изменение для всех линий трансгенов статистически значимо по сравнению с диким типом.

Другая интересная характеристика линии 2F – это повышенный уровень накопления мРНК гена *ПМЭ* в сравнении с растениями дикого типа. Как показывает qRT-PCR анализ, для этих растений уровень мРНК *ПМЭ* выше, чем в растениях дикого типа, в 2-6 раз в зависимости от поколения линии 2F (рисунок 24).

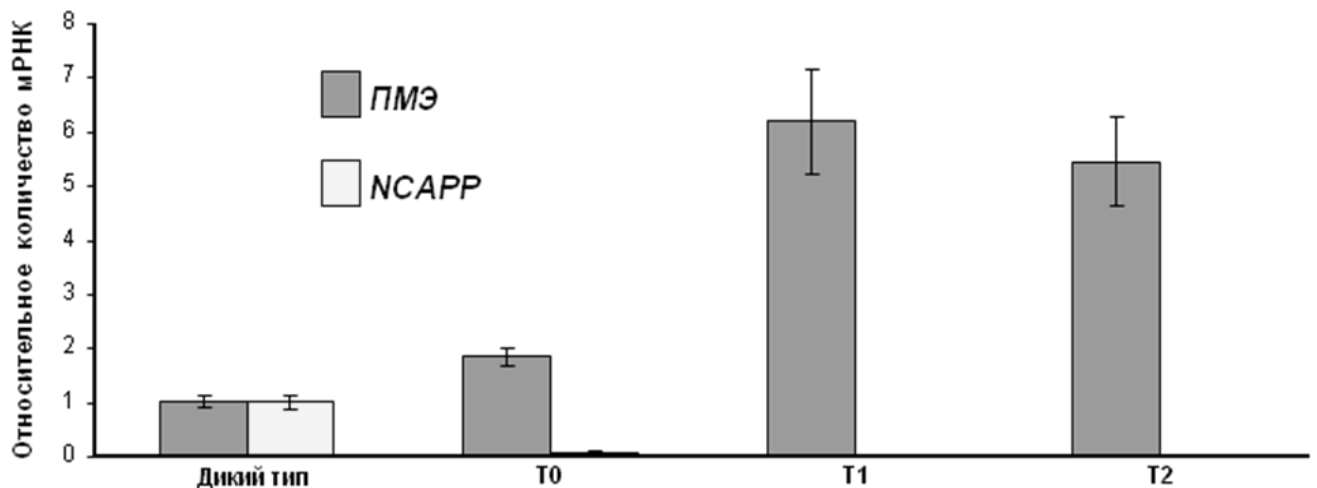


Рисунок 24. Накопление мРНК *ПМЭ* и *NCAPP* линии трансгенных растений 2F разных поколений по результатам qRT-PCR анализа. Приведены средние значения и стандартная ошибка. Уровень транскрипции соответствующих генов в растениях дикого типа был принят за единицу. Изменение содержания мРНК указанных генов во всех поколениях трансгенов статистически значимо по сравнению с диким типом.

Итак, было показано, что транскрипционный промотор гена *NCAPP* чувствителен к уровню метанола в среде. При этом вместе с низким уровнем мРНК *NCAPP* в трансгенных растениях наблюдается высокий уровень накопления мРНК *ПМЭ*. Если допустить, что существует связь между генами *ПМЭ* и *NCAPP*, а также учесть показанную ранее зависимость между уровнем транскрипции *ПМЭ* и уровнем эмиссии метанола, то можно предложить следующий механизм регуляции гена *NCAPP*. Метанол, выделяемый соседней травмированной тканью, вызывает активацию гена *NCAPP*, равно как и других ГИМ. Это приводит к определенным изменениям в растительной клетке, в частности, к увеличению пропускной способности ПД и накоплению защитных белков. Одновременно с этим понижается экспрессия гена *ПМЭ*, что влечет за собой снижение синтеза метанола клеточной стенкой. Если сигнал более не актуален, то есть, если воздействие на соседнюю ткань прекращено, то с понижением поступления метанола извне, уровень метанола в клетке падает вместе с экспрессией гена *NCAPP* (рисунок 25). В пользу этой гипотезы говорит наличие в списке ГИМ гена, кодирующего ингибитор ПМЭ, то есть активность указанного фермента клеточной стенки может подавляться и на биохимическом уровне. В предложенной схеме, одним из ключевых этапов является возможность влияния *NCAPP* на *ПМЭ*.



Рисунок 25. Гипотетический механизм регуляции экспрессии *NCAPP*. Чувствительный к метанолу *NCAPP* может регулировать собственную транскрипцию через подавление транскрипции гена *ПМЭ*, который определяет уровень синтеза метанола.

III.2. Экспрессия гена *ПМЭ* зависит от экспрессии гена *NCAPP*. Возможные функции гена *NCAPP*.

Согласно выдвинутой гипотезе (рисунок 25), повышение уровня мРНК *NCAPP* должно приводить к подавлению синтеза мРНК *ПМЭ*. Для проверки этого утверждения растения *N. benthamiana* были агротрансформированы бинарным вектором, кодирующим белок *NCAPP* под контролем высокоэффективного 35S промотора. Содержание мРНК эндогенной *ПМЭ*, а также мРНК привнесенного гена *NCAPP*, было измерено с помощью метода qRT-PCR. Такой анализ показал, что увеличение накопления мРНК *NCAPP* действительно приводит к снижению уровня накопления мРНК *ПМЭ* (рисунок 26).

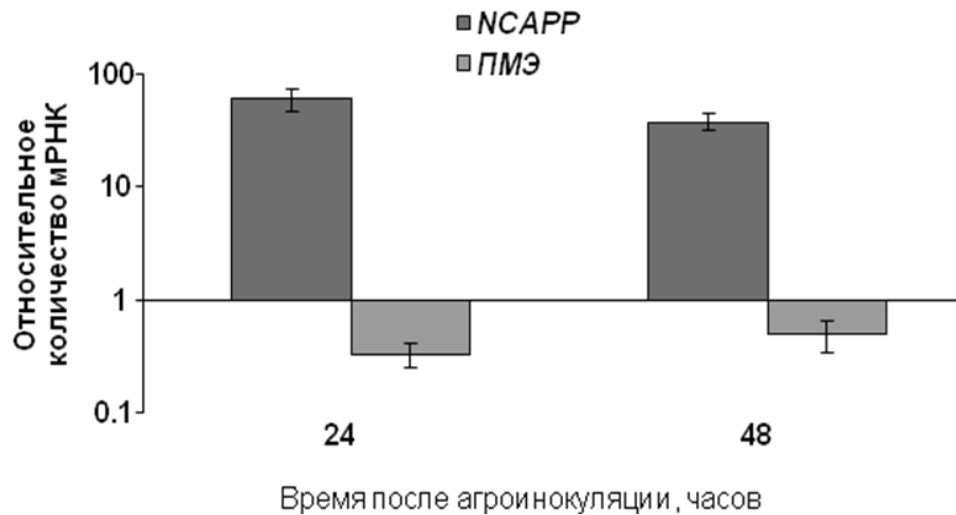


Рисунок 26. qRT-PCR анализ накопления мРНК *ПМЭ* и *NCAPP* в листьях *N. benthamiana*, агротрансформированных вектором, несущим *NCAPP* под контролем 35S промотора. Транзиентная трансформация повышает содержание транскрипта *NCAPP* в десятки раз уже через сутки, одновременно наблюдается подавление накопления эндогенной мРНК *ПМЭ*. Уровни мРНК генов до трансформации приняты за единицу. Приведены средние значения и стандартная ошибка. Все изменения статистически значимы. По оси ординат – логарифмическая шкала.

Полученные данные заставляют задуматься о возможном механизме подобной регуляции. Стоит напомнить, что ген *NCAPP* из растений *N. benthamiana* был идентифицирован в нашей лаборатории после того, как его фрагменты оказались среди секвенированных участков генов, индуцируемых метанолом (таблица 4).

Был осуществлен поиск гомологов нуклеотидной последовательности *NCAPP* (GenBank: FN432043.1) в геноме *N. benthamiana* с помощью сервера Sol Genomics Network

(<https://solgenomics.net>). Этот сервер использует алгоритм BLAST для поиска гомологов в геномных базах растений семейства пасленовых. В базе предсказанных кДНК, которая была получена автоматически путем обработки геномных данных *N.benthamiana* программой поиска потенциальных рамок считывания и экзонов, было найдено 11 гомологов, которые располагаются на фрагментах генома Scf06172, Scf01326 и Scf03488. Из данных предсказанных гомологов один - это определенно последовательность NCAPP, найденная нами в результате подавляющей вычитающей гибридизации (запись Niben101Scf06172g02015.1). Глобальные выравнивания данных одиннадцати находок позволяют предполагать, что геном *N.benthamiana* кодирует целое семейство генов NCAPP. Можно утверждать, что ген NCAPP обладает достаточно четкой доменной организацией, особенно стоит отметить высокую копийность консервативного участка 224-340.

Анализ белковой последовательности с помощью сервера Pfam 29.0 (<http://pfam.xfam.org/>) выявил принадлежность белка NCAPP к семейству альдоза-эпимераз. Данный сервер позволяет найти функциональные домены белка по характерным для белков одного семейства паттернам консервативных позиций, которые составляются на основании множественных выравниваний всех известных белков этих семейств (консенсусные последовательности). Функциональный домен альдоза-эпимеразы, который находится в позициях 30-352, является единственным найденным доменом в исследуемой белке и обладает большим числом совпадений.

Альдоза-эпимеразы (ЕС 5.1.3.3, другое название - мутаротазы) катализируют превращение α -D-глюкозы в β -D-глюкозу. Биологическая роль данного фермента для высших растений неизвестна, однако, учитывая показанное ранее участие гена NCAPP в регуляции межклеточного транспорта, логично предположить участие этого гена в регуляции транспорта фотоассимилятов. В пользу этой версии говорит возможное взаимодействие белка NCAPP с транспортным белком ВТМ (рисунок 11). Транспорт вируса и фотоассимилятов тесно связаны, поскольку через повышение пропускной способности плазмодесм происходит увеличение оттока сахаров из source в sink зоны растения.

Чтобы оценить влияние NCAPP на метаболизм сахаров, был проведен анализ процентного содержания глюкозы в тканях листьев верхнего яруса для растений *N.benthamiana* дикого типа и трансгенных растений второго поколения линии 2F методом высокоэффективной ионообменной хроматографии. Оказалось, что для трансгенных растений с пониженным содержанием мРНК NCAPP содержание глюкозы значительно ниже (рисунок 27), что говорит в пользу участия гена NCAPP в регуляции метаболизма углеводов.

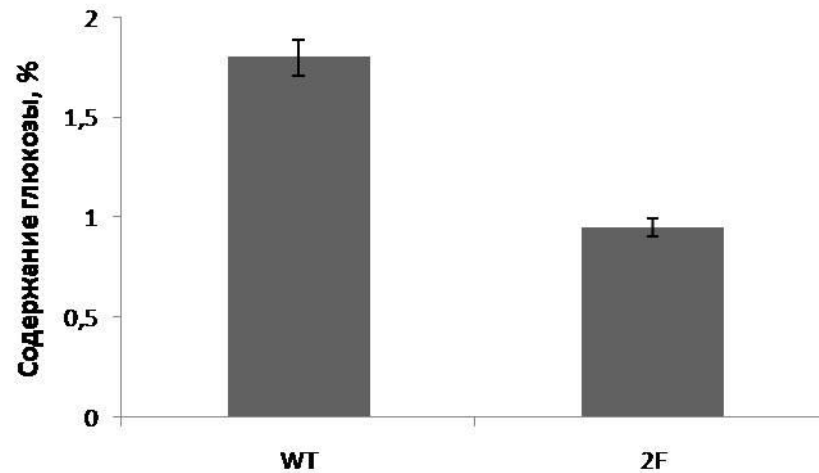


Рисунок 27. Снижение содержания мРНК *NCAPP* в трансгенных растениях пр*NCAPP-GUS* (линия 2F) приводит к снижению содержания глюкозы в листьях. По результатам трех независимых экспериментов, приведены средние значения и стандартная ошибка. Все изменения статистически значимы.

Ген *NCAPP* имеет гомологию с генами из *N. tabacum* (рисунок 28), для которых в литературе описаны следующие свойства.

Во-первых, для гена-гомолога *NtNCAPP1* показано участие в регуляции межклеточного транспорта через ПД (Lee, 2003), что также подтверждается для исследуемого нами гена *NCAPP*. Во-вторых, для всех гомологов показано наличие посттрансляционных модификаций, таких как N-ацетил-О-глюкозаминирование (Heese-Peck and Raikhel, 1998), гликозилирование и фосфорилирование (Таока et al., 2007). В-третьих, для гомолога *NtNCAPP1* была показана «заякоренность» на эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР) с помощью N-концевого трансмембранного домена и локализация либо в районе ПД, либо в ядре в случае, если этого домена нет (Lee, 2003). Для гомолога *GP40* из *N. tabacum* также показана локализация в ядре (Heese-Peck and Raikhel, 1998).

NtNCAPP2	MSSKISLLLLICLFILHLCAAASVRGRKIGIYEIKKGDFSVKITNYGATIISVLLPDKHGK	60
NCAPP	MSSKIGLLLLICLFILHLCAVSSVRGRKIGICEIKKGDFSVKITNYGATIISVFLPDKHGK	60
NtNCAPP1	MSSKIN-LLICLFILHLCAAASVRGRKIGIYEIKKGDFSVKITNYGASIIISVFLPDKHGK	59
NtGP40	MSLKIN-LLVCLFIFHLLVAASVRGHKIGIYEIKKGDFSVKITNYGTSIIISVLLPDKHGK	59
	** *. *. **;****;*. ..;****;**** *****;****;*****	
NtNCAPP2	IGDVVLGYDTIKEYKNDTSYFGAALGRVANRIGGAQFTLNGTHYKLVANEGVNMLHGGLK	120
NCAPP	IGDVVLGYDTIKEYKNDTSYFGAALGRVANRIGGAQFTLNGTLFVLVANEGVNMLHGGLK	120
NtNCAPP1	IGDVVLGYDTIKEYKNDTSYFGAALGRVANRIGGAQFTLNGTHYKLVANEGVNMLHGGLK	119
NtGP40	IGDVVLGYDTIKEYKNDTSYFGATLGRVANRIGGAQFTLNGIHYKLVNPNEGKNMLHGGLK	119
	*****;*****;***** *****;***.*** ***** *	
NtNCAPP2	GFSKVVMKYSKYVRHGPSFYITLTYYSADGEEGFPDVLVSVTYALKDPYKLSVVFKA	180
NCAPP	GFSKVVMKYSKYVRHGPSFYITLTYYNADGEEGFPDVLASVTYALKDPYKLSVVFKA	180
NtNCAPP1	GFSKVVMKYSKYVRHGPSFYITLTYYSADGEEGFPDVLVSVTYALKDPYKLSVVFKA	179
NtGP40	GFSKVVMKYSKYVKGPCFYITLTYYSADGEEGFPDVLASVTYTLKDSYKLSVVFKA	179
	*****;*. *. *****;***** **;****;***.*****;*.:	
NtNCAPP2	LNKATPINALSHHPYWNIGGHNSGDVLSQVLQIYASHITPLDKQHIPTGEISPVKNTPYDF	240
NCAPP	LNKATPINALSHHPYWNIGGHNSGDVLSQVLQIYASHITPLDKQHIPTGEISPVKNTPYDF	240
NtNCAPP1	LNKATPINALSHHPYWNIGGHNTGDVLSQVLQIYASHITPLDNQHIPTGEISPVKNTPYDF	239
NtGP40	LNKATPINALSHHPYWNIGGHNSGDVLSQVLQIFGSHITLVDKQLIPTGEIAPIKNTPYDF	239
	*****;*****;***** *****;*. *. *****;*.*****;*.*****	
NtNCAPP2	LKPRKVGSRIDKIQNGYDINYALDSSRKMKPVAIVFDKKSGRVMDIKATAPGVQFYTANF	300
NCAPP	LKPHKVGSRIDKIQNGYDINYALDSSKKMKPVAIVYDKKSGRVMNIQATAPGVQFYTANF	300
NtNCAPP1	LKPHKVGSRINKIQNGYDINYALDSSKKMKPVAIVYDKKSGRVMDIKATAPGVQFYTANF	299
NtGP40	LKPRKVGSRINKLKNGYDINYVLDSTKMKPVGIVYDKKSGRVMDVQASSPGVQFYTANF	299
	;**;*. *. *****;***;*. *****;*.*****;*.*****;*.*****	
NtNCAPP2	VINTKGKGGYVYQPHSALCLETQGFDAVNHPNFPSTIVIPGKTYLHSVLYTFSIKK-	357
NCAPP	VINTKGKGGYVYQPHSALCLETQGFDAVNHPNFPSTIVTPGKTYLHSVLYTFSIKK-	357
NtNCAPP1	VINTKGKGGYVYQPHSALCLETQGFDAVNHPNFPSTIVTPGKTNVHSVLYTFSIKKY	357
NtGP40	VNNTKGKGGYVYQPHSALSLETLVFPDAVNHPNFPSTIVNPGKYVHSVLYTFSIKK-	356
	* *****;*****;*** ***** ***** **;. *****	

Рисунок 28. Множественное выравнивание всех описанных в литературе белков, гомологичных NCAPP. Все белки обладают высокой степенью идентичности (83-96%, при парном выравнивании). Идентификаторы в базе данных GeneBank: NCAPP – CBA10127, GP40 – AAB94619, NtNCAPP1 – AAL09397 и NtNCAPP2 – AAL09397.

Противоречивые литературные данные о локализации гомологов NCAPP в клетках листьев табака привели нас к идее определить локализацию белка NCAPP в *N. benthamiana*. Для решения данной задачи в нашей лаборатории был создан бинарный вектор, кодирующий NCAPP с «пришитым» на С-конце пептидом 3xFLAG. Эта метка широко применяется в молекулярной биологии растений (Ueda et al., 2011). Листовой материал растений *N. benthamiana*, агротрансформированных этим вектором, был разделен на четыре фракции. Вестерн-блот анализ с помощью антител на пептид FLAG показал, что меченый NCAPP находится главным образом во фракции белков клеточной стенки (рисунок 29), что подтверждает его функциональную гомологию с NtNCAPP1.

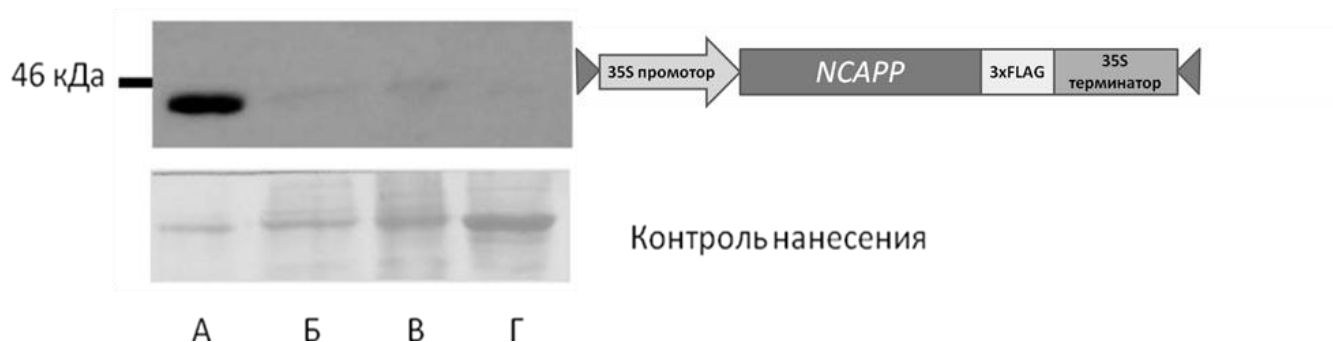


Рисунок 29. Вестерн-блот анализ белка из листьев растений, синтезирующих NCAPP с меткой 3xFLAG на С-конце. После агротрансформации растений конструкцией 35S-NCAPP-3xFLAG (схема в правой части рисунка), листовой материал был разделен на четыре фракции: А) фракция белков клеточной стенки, включающая в себя и белки аппарата плазмодесмы; Б) фракция «легких» мембран, содержащая в основном белки ЭПР и хлоропластов; В) фракция «тяжелых» мембран, содержащая в основном ядерные белки; и Г) цитоплазматическая фракция. Эти фракции были проанализированы методом вестерн-блота с антителами против FLAG.

Слабый сигнал в дорожке, содержащей фракцию «тяжелых» мембран, т.е. в основном ядерные белки, для NCAPP (рисунок 29, дорожка В), а также способность его гомологов из *N. tabacum* локализоваться в ядре позволила нам высказать предположение, что NCAPP способен влиять на экспрессию гена *ПМЭ* по принципу транскрипционного фактора негативной регуляции. Для проверки последней гипотезы из геномной ДНК растения *N. benthamiana* была изолирована последовательность длиной 1750 пар нуклеотидов, располагающаяся перед стартовым кодоном *ПМЭ* (последовательность в GenBank: HG937606.1). С помощью 5' RACE анализа мы также определили сайты начала транскрипции, используя праймеры на 5' область этой последовательности. Их оказалось два, что, вероятно, связано с многочисленностью семейства генов *ПМЭ* в табаках. Обнаруженные сайты начала транскрипции исследуемого нами гена *ПМЭ* находятся в позиции -70 и -140 относительно стартового кодона трансляции.

Для подтверждения того, что выделенная последовательность действительно обладает активностью транскрипционного промотора, был создан бинарный вектор, содержащий репортерный ген *GUS* под контролем этой последовательности (пр*ПМЭ*). Агротрансформация листьев *N. benthamiana* этой конструкцией показала, что пр*ПМЭ* направляет экспрессию гена *GUS*, обеспечивая детектируемый сигнал. В качестве положительного контроля выступала конструкция, кодирующая *GUS* под контролем 35S промотора - сигнал от этого вектора был примерно в пять раз выше (рисунок 30). Так или иначе, можно заключить, что

последовательность длиной 1750 пар нуклеотидов, расположенная перед кодирующей областью *ПМЭ*, содержит транскрипционный промотор данного гена.

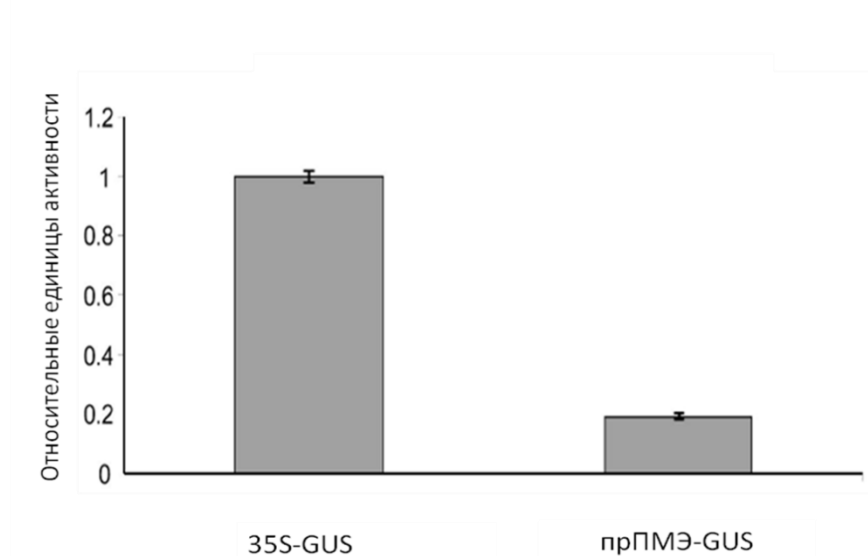


Рисунок 30. Результаты ферментативного теста на активность GUS в листьях после агротрансформации растений *N. benthamiana* контрольной конструкцией 35S-GUS и конструкцией прПМЭ-GUS. Результат измерений активности GUS для 35S-GUS принят за единицу. Приведены средние значения и стандартная ошибка. Изменения статистически значимы (p -значение $< 0,01$).

Далее, для проверки гипотезы о том, что *NCAPP* является фактором негативной регуляции, влияющим непосредственно на транскрипционную активность промотора *ПМЭ*, мы оценивали эффективность работы прПМЭ по количеству GUS в условиях сверхэкспрессии *NCAPP*. Результаты совместной агроинфильтрации вектора прПМЭ-GUS вместе с 35S-*NCAPP* указывают на то, что повышенный уровень экспрессии *NCAPP* подавляет синтез GUS и на уровне транскрипции, и на уровне накопления белка, что выражается в понижении активности фермента GUS (рисунок 31). В качестве контроля на систему агроинфильтрации вектор 35S-*NCAPP* был заменен на «пустой» вектор pBIN.

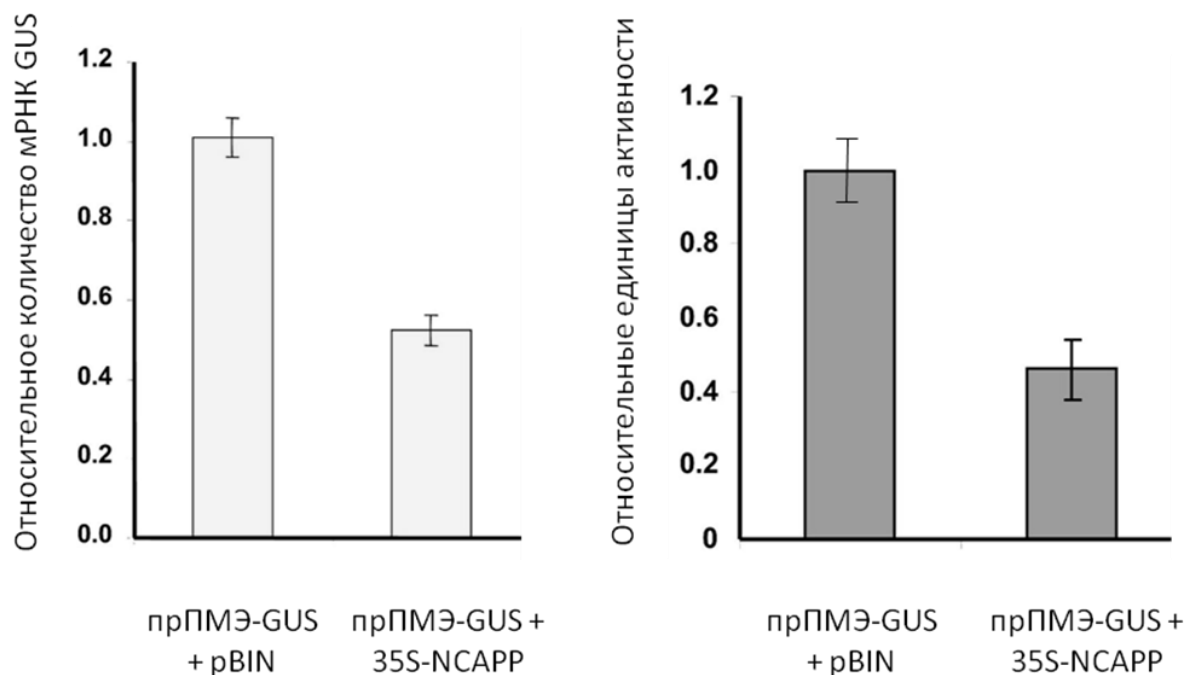


Рисунок 31. qRT-PCR анализ содержания мРНК *GUS* (слева), а также ферментативный тест на активность *GUS* (справа), для листьев, агроинфицированных конструкцией *prPMЭ-GUS* в сочетании либо с *35S-NCAPP*, либо с «пустым» вектором *pBIN*. За единицу принято количество мРНК *GUS* или активность в листе, трансформированном *prPMЭ-GUS* совместно с *pBIN*. Приведены средние значения и стандартная ошибка. Изменения статистически значимы (p -значение $< 0,01$).

Для конструкции, кодирующей последовательность другого репортерного белка – GFP – под контролем *prPMЭ* был подтвержден результат подавления транскрипции данного промотора в условиях повышенной экспрессии *NCAPP*. Для этого была проведена совместная агротрансформация *35S-NCAPP* и *prPMЭ-GFP*. В данном случае для оценки экспрессии *GFP* на уровне белка был использован вестерн-блот анализ листового материала с антителами на GFP с последующей денситометрией полученных на пленке сигналов (рисунок 32). Таким образом, с помощью метода транзientной трансформации было показано, что *NCAPP* способен подавлять активность *prPMЭ* и, следовательно, экспрессию гена *PMЭ*. Причем механизм такого действия может осуществляться непосредственно через подавление транскрипционной активности промотора гена *PMЭ*, что было показано с помощью двух экспериментальных систем.

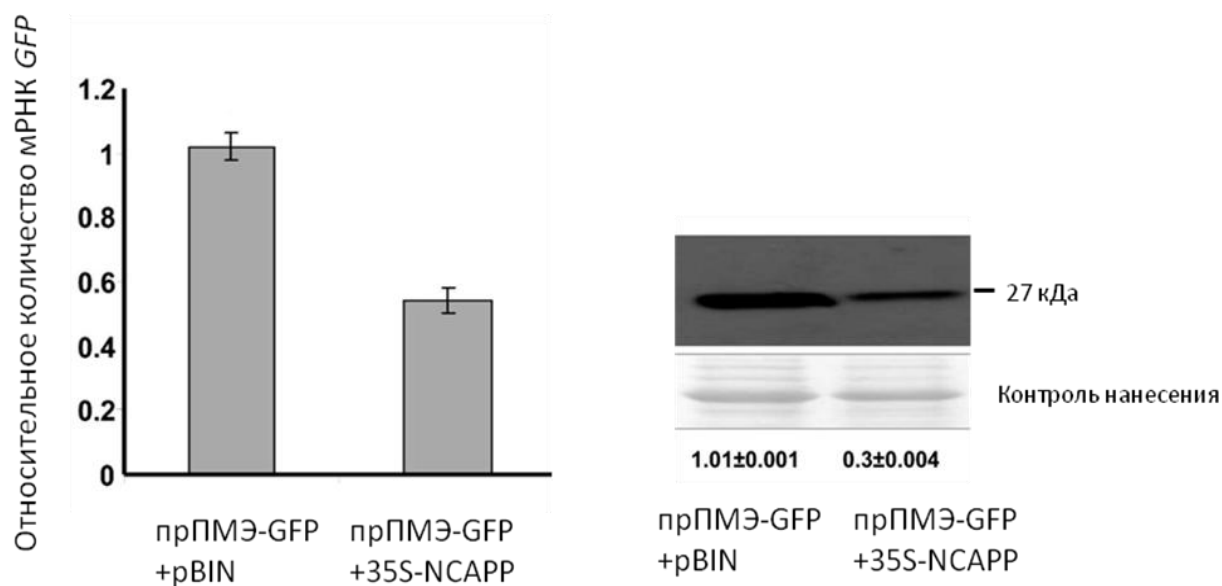


Рисунок 32. qRT-PCR анализ содержания мРНК *GFP*, а также результаты денситометрии сигналов вестерн-блота с антителами против *GFP* для растительных экстрактов листьев, агроинфильтрированных конструкцией прПМЭ-*GFP* в сочетании либо с 35S-*NCAPP*, либо с пустым вектором pBIN. За единицу принято количество мРНК *GFP* или сила сигнала в вестерн-блот анализе для листа, трансформированного с pBIN вектором. Приведены средние значения и стандартная ошибка. Изменения статистически значимы (p -значение < 0,01).

III.3. Уровень транскрипции гена *ПМЭ* влияет на уровень эмиссии метанола

Последний этап предложенного механизма регуляции *NCAPP* (рисунок 25) подразумевает, что пониженный уровень транскрипции *ПМЭ* вызывает снижение эмиссии метанола, что, в свою очередь, подавляет активность чувствительного к метанолу *прNCAPP*. Ранее уже были представлены факты, говорящие в пользу прямой корреляции между уровнем транскрипции *ПМЭ* и уровнем эмиссии метанола. Так, в травмированной ткани повышенная транскрипция *ПМЭ* связана с повышенной активностью данного фермента клеточной стенки и с более активным выбросом метанола в среду (глава I.1). Также нами показано, что в *sink* зонах листьев табака повышенный уровень мРНК *ПМЭ* вызывает рост концентрации метанола в соке (глава II.1). Стоит отметить, что в литературе также представлены данные, говорящие о прямой связи между *ПМЭ* и уровнем синтеза метанола. Так, например, показано, что процесс увядания листьев риса сопровождается накоплением мРНК *ПМЭ* и усилением ферментативной активности *ПМЭ*, а также пропорциональным увеличением концентрации метанола в соке (Kang et al., 2011).

Полученные в нашей лаборатории линии трансгенных растений 2F и 11 с нокдауном гена *NCAPP* и, вероятно, вызванной этим повышенной транскрипционной активностью гена *ПМЭ* позволяют еще раз проверить предлагаемую модель. Тест на ферментативную активность *ПМЭ* в таких растениях показал, что активность *ПМЭ* в них выше, чем в растениях *N. benthamiana* дикого типа, в 3-4 раза. При этом уровень эмиссии метанола в трансгенных растениях выше в 2-2,5 раза (рисунок 33).

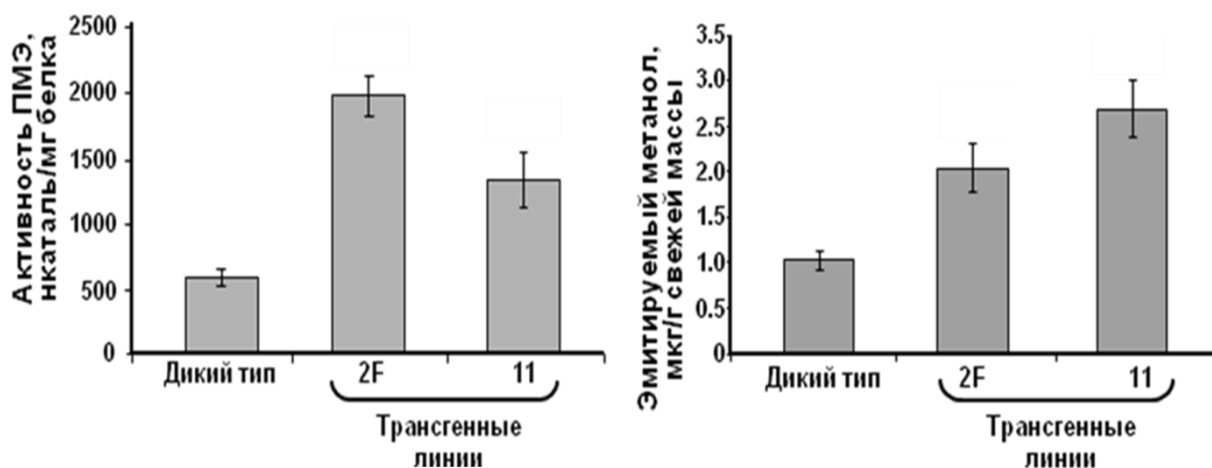
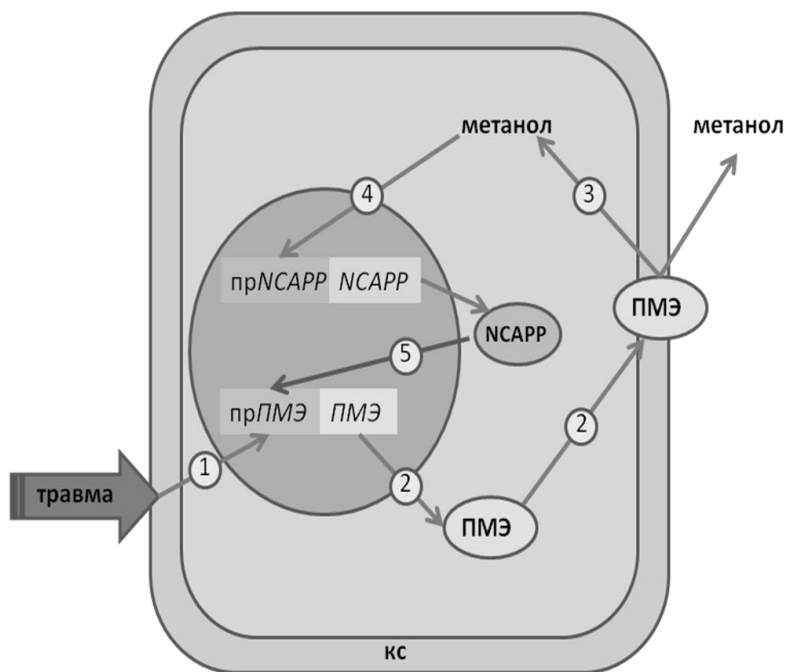


Рисунок 33. Активность ПМЭ (слева) и уровни эмитируемого метанола в двух линиях трансгенных растений с нокдауном *NCAPP* в сравнении с растениями дикого типа. Приведены средние значения и стандартная ошибка. Различия между растениями дикого типа и трансгенами статистически значимы (p -значение < 0,01).

Показанное в данной работе влияние повышенной транскрипции *ПМЭ* и связанного с этим увеличения активности фермента на рост эмиссии метанола, а также данные по регуляции *прNCAPP* и *прПМЭ*, позволяют предложить следующую модель регуляции экспрессии гена *NCAPP*.

Механическая травма листа растений рода *Nicotiana* вызывает активный выброс метанола в атмосферу. В соседних неповрежденных тканях повышенный уровень метанола вызывает ряд изменений на уровне ткани и клетки, в том числе повышение пропускной способности ПД или закрытие устьиц. Такие эффекты вызваны изменением профиля экспрессии генов, и одним из активированных ГИМ является *NCAPP*. Было показано, что промотор этого гена чувствителен к метанолу. *NCAPP* подавляет транскрипцию *ПМЭ*, что приводит к снижению ферментативной активности *ПМЭ* в клеточной стенке и подавлению синтеза эндогенного метанола. Таким образом, регуляция экспрессии ГИМ осуществляется на данном этапе, главным образом, поступающим от поврежденных тканей экзогенным метанолом. В случае прекращения поступления метанольного сигнала извне, пониженный синтез собственного метанола приводит к быстрому возвращению системы к обычному состоянию, впрочем, оставляя клетку с запасом защитных белков (рисунок 34).

Рисунок 34. Модель обратной регуляции экспрессии генов с участием *NCAPP*. Механическое повреждение клеточной стенки активирует *ПМЭ* (1). Синтез *ПМЭ* и её секреция в КС (2) приводят к активному синтезу метанола (3), приводящему, в частности, к увеличению его концентрации в цитоплазме и активации экспрессии гена *NCAPP* через его промотор, индуцируемый метанолом (4). *NCAPP* подавляет транскрипционную активность промотора *ПМЭ*, воздействуя также на его промотор (5). Подавление экспрессии *ПМЭ* снижает уровень эмиссии метанола, останавливая, в конечном счете, транскрипцию *NCAPP*.



В данной части работы были представлены доказательства трех утверждений. Во-первых, промотор гена *NCAPP* чувствителен к метанолу, во-вторых, повышенное содержание мРНК гена *NCAPP* ведет к снижению уровня накопления мРНК гена *ПМЭ*, вероятно через его

транскрипционный промотор, и, в-третьих, от уровня накопления мРНК *ПМЭ* зависит интенсивность эмиссии метанола. Технические сложности в определении динамики изменения концентраций метанола в цитоплазме и, особенно, в межклеточном пространстве, а также невозможность измерения экспрессионной активности в одной или небольшом количестве клеток, не позволяют получить данные о системе с обратной регуляцией «*ПМЭ*-метанол-*NCAPP-ПМЭ*» в контексте реальной природной ситуации. Однако факты в пользу существования такой системы, дают основания для построения новых гипотез. Например, подобный механизм может быть задействован в поврежденной ткани для возвращения уровня экспрессии *ПМЭ* к состоянию до травмы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экспрессия гена *ПМЭ* в растении повышается в ответ на любой стресс, сопряженный с механическим воздействием на клеточную стенку. В данной работе показано, что от уровня накопления мРНК *ПМЭ* в клетке зависит ферментативная активность ПМЭ, а также уровень метанола, синтезируемого растением. Особенно ярко данная зависимость проявляется в модельной ситуации с механической травмой листа абразивным материалом, когда эмиссия метанола возрастает в десятки раз в сравнении с неповрежденным листом. Так как механический стресс является неизбежным спутником практически любого стрессового воздействия на растения, была выдвинута гипотеза о сигнальной функции метанола в иммунном ответе растения. Для проверки этого предположения был проведен сравнительный анализ транскриптомов неповрежденного листа *N.benthamiana* и листа, инкубированного в среде с повышенным содержанием метанола в концентрациях, близких к физиологическим. Оказалось, что в клетках листа, обработанного метанолом, наиболее значимо меняется содержание мРНК генов, кодирующих стрессовые белки. Среди них β -1,3-глюканаза, ингибитор протеиназ II, пероксидаза и другие гены, ассоциированные с патогенезом. Также можно выделить гены, участвующие в метаболизме гормонов растений (этилена и салициловой кислоты). Все гены, уровень накопления мРНК которых увеличивается в ответ на метанол, были названы ГИМ – гены, индуцируемые метанолом. Повышенные концентрации метанола в соке также детектируются непосредственно в зоне травмы листа, поэтому полученный список ГИМ можно трактовать как ответ на травму, но без влияния других стрессовых сигналов (например, DAMP), ассоциированных с механическим повреждением. Также можно рассматривать полученный список ГИМ как реакцию клетки на сигнал от соседней травмированной зоны листа, подготавливающий клетку к атаке патогена и активирующий её метаболизм.

В диссертации определена реакция растения на клеточном уровне на повышенную концентрацию экзогенного метанола. Во-первых, было показано, что повышенные концентрации метанола в среде приводят к закрытию устьиц. Учитывая, что ранее была показана ключевая роль устьиц в регуляции эмиссии метанола в нормальных условиях, можно предположить, что закрытие устьиц приводит к накоплению метанола в неповрежденной ткани, получившей метанольный сигнал от соседней поврежденной зоны. Таким образом, интактный лист потенциально имеет возможность усиливать принимаемый сигнал.

Во-вторых, было показано, что воздействие газообразного метанола в концентрации, близкой к физиологической, приводит к повышенной репродукции ВТМ. Вероятнее всего, это связано с эффектом активации межклеточного транспорта. Повышению чувствительности к

BTM обработанных метанолом растений, вероятно, также способствует взаимодействию между ТБ BTM и белком NCAPP, показанное в данной работе.

Результаты экспериментов по исследованию чувствительности ГИМ к метанолу совпадают как в случае инкубации растения в атмосфере с метанолом, так и при выдерживании растения в общем пространстве с другими травмированными растениями, то есть когда метанол подается вместе с другими ЛОС. Для исследования вопроса о том, как влияют на экспрессию ГИМ изменения концентрации метанола в соке за счет модификации собственной клеточной стенки, был проведен сравнительный анализ транскриптомов листьев разных ярусов одного растения. Было показано, что содержание метанола в листьях верхнего яруса примерно в два раза больше, чем в нижнем. Оказалось, что множество генов, содержание мРНК которых увеличено в листьях с повышенным содержанием эндогенного метанола, и множество генов, активирующихся в ответ на экзогенный метанол, имеют лишь единичные случаи пересечения. Можно предположить, что в клетке есть механизмы, позволяющие не реагировать на изменения концентрации метанола, синтезированного в процессе активного роста собственной клеточной стенки, т.е. не воспринимать его как стрессовое воздействие. Возможно, ключевую роль в этом имеет скорость и степень изменения концентрации метанола. Анализ генов, полученных при сравнении транскриптомов листьев с разным уровнем эндогенного метанола, позволил обнаружить две особенности регуляции ГИМ. Первая особенность связана с геном *SEOP*. Уровень накопления его мРНК возрастает как в случае с эндогенным, так и в случае с экзогенным метанолом. Это означает, что *SEOP* функционально является рецептором метанола. Что доказывает существование генов, чувствительных к абсолютным значениям метанола в цитоплазме. Следовательно, потенциально, метанол может определять регуляцию генов в ходе развития листа (существует градиент концентрации метанола в растущей ткани листа) или в соответствии с суточными ритмами (показаны утренние скачки эмиссии метанола). Вторая особенность связана с геном *NCAPP*, уровень мРНК которого зависит от экзогенного метанола, и не зависит от эндогенного.

Для изучения регуляции *NCAPP* был изолирован промоторная последовательность данного гена. Используя трансгенные растения, мы показали чувствительность пр*NCAPP* к метанолу. Таким образом, экспрессия гена *NCAPP* регулируется на уровне транскрипции. Затем с помощью транзientной экспрессии, а также трансгенных растений, было показано, что от уровня накопления мРНК *NCAPP* в клетке зависит уровень мРНК *ПМЭ*, причем это обратная зависимость. Чтобы прояснить природу такой регуляции, был изолирован промотор гена *ПМЭ*, и было показано, что сверхэкспрессия гена *NCAPP* подавляет транскрипцию репортерного гена под контролем пр*ПМЭ*. Учитывая, что уровень синтезируемого метанола коррелирует с количеством мРНК *ПМЭ*, можно постулировать наличие в растительной клетке механизма

обратной связи «*NCAPP-ПМЭ-метанол-NCAPP*» в качестве системы регуляции *NCAPP*, а возможно и других ГИМ.

ВЫВОДЫ

1. Повышенный в результате механической травмы или созревания клеточной стенки уровень метанола в растительной клетке вызывает накопление мРНК генов, получивших название генов, индуцируемых метанолом (ГИМ).
2. Гены группы ГИМ влияют на активность межклеточного транспорта и устойчивость растения к вирусам.
3. Группу ГИМ можно разделить на три подгруппы, различающиеся между собой по реакции на метанол. Первая подгруппа включает β -1,3-глюканазу, *MIG-21*, *SABC* и ингибитор протеиназ II. Их мРНК накапливается при повышении концентрации экзогенного и снижении концентрации эндогенного метанола. Во вторую подгруппу входит ген *SEOP*, мРНК которого накапливается при ответе как на экзогенный, так и на эндогенный метанол. Третья подгруппа представлена геном *NCAPP*, уровень накопления мРНК которого не зависит от эндогенного метанола, а регулируется экзогенным.
4. Механизм регуляции ответа растения на стресс включает в себя обратную связь «метанол-*NCAPP*-*ПМЭ*-метанол», где *NCAPP*, индуцированный метанолом, подавляет транскрипцию *ПМЭ* и, следовательно, снижает уровень синтеза метанола растением.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АКК – 1-аминоциклопропанкарбоновая кислота
- АДГ – алкогольдегидрогеназа
- БСА – бычий сывороточный альбумин
- ВТМ – вирус табачной мозаики
- ГИМ – гены, индуцируемые метанолом
- ДСН – додецилсульфат натрия
- ДТТ – дитиотреитол
- кДНК – комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота
- крВТМ – тобамовирус крестоцветных
- КС – клеточная стенка
- ЛЗЛ – летучие компоненты зеленого листа
- ЛОС – летучие органические соединения
- МЖК – метилжасмоновая кислота
- мРНК – матричная (информационная) рибонуклеиновая кислота
- МСК – метилсалициловая кислота
- ОГК – олигогалактуроновые кислоты
- ПААГ – полиакриламидный гель
- ПД – плазмодесма
- ПМЭ – пектинметилэстераза
- пр*ПМЭ* – промоторный участок гена *ПМЭ* длиной 1750 пар нуклеотидов
- пр*NCAPP* – промоторный участок гена *NCAPP* длиной 1000 пар нуклеотидов
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- ТБ – транспортный белок
- ФДГ – формальдегиддегидрогеназа
- ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота
- ЭПР – эндоплазматический ретикулум
- АВС – ATP binding cassette – семейство белков-транспортёров, связывающих аденозинтрифосфат
- ARP – auxin-repressed protein – белок, подавляемый ауксином
- CaMV – cauliflower mosaic virus – вирус мозаики цветной капусты
- DAMP – damage associated molecular patterns – молекулы, ассоциированные с повреждением
- DCL1 – dicer like protein 1 – растительный гомолог белка Dicer
- ERP – elicitor responsible protein – белок, активирующийся элиситором и участвующий в иммунной реакции растений

EST – expressed sequence tags – короткий фрагмент последовательности кДНК

GFP – green fluorescent protein – зеленый флуоресцентный белок

GUS – β -глюкуронидаза

LB среда – lysogeny broth – литическая среда

MIG-21 – methanol inducible gene – ген, индуцируемый метанолом

MS среда – Murashige and Skoog – среда Мурасиге-Скуга

NCAP – non-cell-autonomous protein – автономный внеклеточный белок

NCAPP – non-cell-autonomous pathway protein – белок пути внеклеточной автономии

PBS – phosphate buffered saline – натрий-фосфатный буфер

PDLP – plasmodesmata located proteins – белки, локализованные на плазмодесме

PR proteins – pathogenesis related – белки, ассоциированные с патогенезом

PVX – X вирус картофеля

PVY – Y вирус картофеля

qRT-PCR – quantitative reverse transcription polymerase chain reaction – количественная полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

RACE – rapid amplification of cDNA ends – метод определения концов последовательности кДНК

RGP – reversibly glycosylated polypeptides – обратимо гликозилируемые полипептиды

SABC – salicylic acid binding catalase – каталаза, связывающая салициловую кислоту

SB – sample buffer – буфер для нанесения проб при белковом электрофорезе

SEL – size exclusion limit – размер наибольшей молекулы, способной проходить через плазмодесму

SEOP – sieve element occlusion protein – белок, регулирующий флоэмный ток по ситовидным элементам

SSC – saline-sodium citrate – натрий-цитратный буфер

ST – sugar transporter – белок-транспортер сахара

TBS – Tris-buffered saline – буфер, на основе Tris и NaCl

TuMV – turnip mosaic virus – вирус мозаики турнепса

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лукьянов С. А., Гурская Н. Г., Лукьянов К. А., Тарабыкин В. С., Свердлов Е.Д., 1994. Высокоэффективная вычитающая гибридизация кДНК. Биоорг. химия, 20 (6), 701-704
2. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж., 1984. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. Москва, «Мир», 479 с.
3. Сухачева Е.А., Тюлькина Л.Г., Каргер Е.М., Шевелева А.А., Стратонова Н.В., Дорохов Ю.Л., 2005. Картирование эпитопов рекомбинантного транспортного белка вируса табачной мозаики с помощью моноклональных антител. Биоорг. химия, 31(5), 474-482
4. Ханаан Д., 1988. Методы трансформации *E.coli* в «Клонирование ДНК» под ред. Гловера Д. Москва, «Мир», стр. 140-174
5. Abanda-Nkpwatt, D., Müsch, M., Tschiersch, J., Boettner, M., Schwab, W., 2006. Molecular interaction between *Methylobacterium extorquens* and seedlings: growth promotion, methanol consumption, and localization of the methanol emission site. J. Exp. Bot. 57, 4025–4032.
6. Achkor, H., Díaz, M., Fernández, M.R., Biosca, J.A., Parés, X., Martínez, M.C., 2003. Enhanced formaldehyde detoxification by overexpression of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase from *Arabidopsis*. Plant Physiol. 132, 2248–2255.
7. Akiyama, T., Jin, S., Yoshida, M., Hoshino, T., Opassiri, R., Ketudat Cairns, J.R., 2009. Expression of an endo-(1,3;1,4)-beta-glucanase in response to wounding, methyl jasmonate, abscisic acid and ethephon in rice seedlings. J. Plant Physiol. 166, 1814–1825.
8. Arimura, G., Ozawa, R., Shimoda, T., Nishioka, T., Boland, W., Takabayashi, J., 2000. Herbivory-induced volatiles elicit defence genes in lima bean leaves. Nature 406, 512–515.
9. Ascencio-Ibáñez, J.T., Sozzani, R., Lee, T.-J., Chu, T.-M., Wolfinger, R.D., Cella, R., Hanley-Bowdoin, L., 2008. Global analysis of *Arabidopsis* gene expression uncovers a complex array of changes impacting pathogen response and cell cycle during geminivirus infection. Plant Physiol. 148, 436–454.
10. Ayre, B.G., 2011. Membrane-transport systems for sucrose in relation to whole-plant carbon partitioning. Mol. Plant 4, 377–394.
11. Baebler, S., Krecic-Stres, H., Rotter, A., Kogovsek, P., Cankar, K., Kok, E.J., Gruden, K., Kovac, M., Zel, J., Pompe-Novak, M., Ravnikar, M., 2009. PVY(NTN) elicits a diverse gene expression response in different potato genotypes in the first 12 h after inoculation. Mol. Plant Pathol. 10, 263–275.
12. Balandin, T., van der Does, C., Albert, J.M., Bol, J.F., Linthorst, H.J., 1995. Structure and induction pattern of a novel proteinase inhibitor class II gene of tobacco. Plant Mol. Biol. 27, 1197–1204.

13. Balasubramanian, V., Vashisht, D., Cletus, J., Sakthivel, N., 2012. Plant β -1,3-glucanases: their biological functions and transgenic expression against phytopathogenic fungi. *Biotechnol. Lett.* 34, 1983–1990.
14. Baldwin, I.T., 2010. Plant volatiles. *Curr. Biol.* CB 20, R392–397. doi:10.1016/j.cub.2010.02.052
15. Baldwin, I.T., Halitschke, R., Paschold, A., von Dahl, C.C., Preston, C.A., 2006. Volatile signaling in plant-plant interactions: “talking trees” in the genomics era. *Science* 311, 812–815.
16. Balestrieri, C., Castaldo, D., Giovane, A., 1990. A glycoprotein inhibitor of pectin methylesterase in kiwi fruit (*Actinidia chinensis*). *Eur. J. Biochem.* 193, 183–187.
17. Barcala, M., García, A., Cabrera, J., Casson, S., Lindsey, K., Favery, B., García-Casado, G., Solano, R., Fenoll, C., Escobar, C., 2010. Early transcriptomic events in microdissected *Arabidopsis* nematode-induced giant cells. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 61, 698–712.
18. Bate, N.J., Rothstein, S.J., 1998. C6-volatiles derived from the lipoxygenase pathway induce a subset of defense-related genes. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 16, 561–569.
19. Beauchamp, J., Wisthaler, A., Hansel, A., Kleist, E., Miebach, M., Niinemets, Ü., Schurr, U., Wildt, J., 2005. Ozone induced emissions of biogenic VOC from tobacco: relationships between ozone uptake and emission of LOX products. *Plant Cell Environ.* 28, 1334–1343.
20. Bethke, G., Grundman, R.E., Sreekanta, S., Truman, W., Katagiri, F., Glazebrook, J., 2014. *Arabidopsis* PECTIN METHYLESTERASEs Contribute to Immunity against *Pseudomonas syringae*. *PLANT Physiol.* 164, 1093–1107.
21. Bihmidine, S., Hunter, C.T., Johns, C.E., Koch, K.E., Braun, D.M., 2013. Regulation of assimilate import into sink organs: update on molecular drivers of sink strength. *Front. Plant Sci.* 4.
22. Bleeker, A.B., Kende, H., 2000. ETHYLENE: A Gaseous Signal Molecule in Plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, 1–18.
23. Brilli, F., Ruuskanen, T.M., Schnitzhofer, R., Müller, M., Breitenlechner, M., Bittner, V., Wohlfahrt, G., Loreto, F., Hansel, A., 2011. Detection of Plant Volatiles after Leaf Wounding and Darkening by Proton Transfer Reaction “Time-of-Flight” Mass Spectrometry (PTR-TOF). *PLoS ONE* 6.
24. Bubici, G., Carluccio, A.V., Cillo, F., Stavolone, L., 2014. Virus-induced gene silencing of pectin methylesterase protects *Nicotiana benthamiana* from lethal symptoms caused by Tobacco mosaic virus. *Eur. J. Plant Pathol.* 141, 339–347.
25. Burch-Smith, T.M., Zambryski, P.C., 2012. Plasmodesmata paradigm shift: regulation from without versus within. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63, 239–260.
26. Carella, P., Wilson, D.C., Cameron, R.K., 2014. Some things get better with age: differences in salicylic acid accumulation and defense signaling in young and mature *Arabidopsis*. *Front. Plant Sci.* 5, 775.

27. Carr, J.P., Lewsey, M.G., Palukaitis, P., 2010. Signaling in induced resistance. *Adv. Virus Res.* 76, 57–121.
28. Chen, L.-Q., Qu, X.-Q., Hou, B.-H., Sosso, D., Osorio, S., Fernie, A.R., Frommer, W.B., 2012. Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport. *Science* 335, 207–211.
29. Chen, M.-H., Sheng, J., Hind, G., Handa, A.K., Citovsky, V., 2000. Interaction between the tobacco mosaic virus movement protein and host cell pectin methylesterases is required for viral cell-to-cell movement. *EMBO J.* 19, 913–920.
30. Chen, Z., Silva, H., Klessig, D.F., 1993. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science* 262, 1883–1886.
31. Ciccioli, P., Centritto, M., Loreto, F., 2014. Biogenic volatile organic compound emissions from vegetation fires. *Plant Cell Environ.* 37, 1810–1825.
32. Citovsky, V., Knorr, D., Schuster, G., Zambryski, P., 1990. The P30 movement protein of tobacco mosaic virus is a single-strand nucleic acid binding protein. *Cell* 60, 637–647.
33. Clejan, L.A., Cederbaum, A.I., 1993. Stimulation by paraquat of microsomal and cytochrome P-450-dependent oxidation of glycerol to formaldehyde. *Biochem. J.* 295 (Pt. 3), 781–786.
34. Consales, F., Schweizer, F., Erb, M., Gouhier-Darimont, C., Bodenhausen, N., Bruessow, F., Sobhy, I., Reymond, P., 2012. Insect oral secretions suppress wound-induced responses in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 63, 727–737.
35. Cosgrove, D.J., 2005. Growth of the plant cell wall. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 850–861.
36. Cosgrove, D.J., Jarvis, M.C., 2012. Comparative structure and biomechanics of plant primary and secondary cell walls. *Front. Plant Sci.* 3. doi:10.3389/fpls.2012.00204
37. Cossins, E.A., 1964. The Utilization of Carbon-14 Compounds by Plants: I. the Metabolism of Methanol-C14 and Its Role in Amino Acid Biosynthesis. *Can. J. Biochem.* 42, 1793–1802.
38. Crawford, K.M., Zambryski, P.C., 2000. Subcellular localization determines the availability of non-targeted proteins to plasmodesmatal transport. *Curr. Biol. CB* 10, 1032–1040.
39. De Moraes, C.M., Mescher, M.C., Tumlinson, J.H., 2001. Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel conspecific females. *Nature* 410, 577–580.
40. Denès, J.-M., Baron, A., Renard, C.M., Péan, C., Drilleau, J.-F., 2000. Different action patterns for apple pectin methylesterase at pH 7.0 and 4.5. *Carbohydr. Res.* 327, 385–393.
41. Deng, C., Zhang, X., Zhu, W., Qian, J., 2004. Gas chromatography-mass spectrometry with solid-phase microextraction method for determination of methyl salicylate and other volatile compounds in leaves of *Lycopersicon esculentum*. *Anal. Bioanal. Chem.* 378, 518–522.
42. Diatchenko, L., Lau, Y.F., Campbell, A.P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E.D., Siebert, P.D., 1996. Suppression subtractive

- hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 6025–6030.
43. Divol, F., Vilaine, F., Thibivilliers, S., Amselem, J., Palauqui, J.-C., Kusiak, C., Dinant, S., 2005. Systemic response to aphid infestation by *Myzus persicae* in the phloem of *Apium graveolens*. *Plant Mol. Biol.* 57, 517–540.
 44. Dolan, L., Linstead, P., Roberts, K., 1997. Developmental regulation of pectic polysaccharides in the root meristem of *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 48, 713–720.
 45. Dolferus, R., Jacobs, M., Peacock, W.J., Dennis, E.S., 1994. Differential interactions of promoter elements in stress responses of the *Arabidopsis* *Adh* gene. *Plant Physiol.* 105, 1075–1087.
 46. Dorokhov, Y.L., Alexandrova, N.M., Miroshnichenko, N.A., Atabekov, J.G., 1983. Isolation and analysis of virus-specific ribonucleoprotein of tobacco mosaic virus-infected tobacco. *Virology* 127, 237–252.
 47. Dorokhov, Y.L., Frolova, O.Y., Skurat, E.V., Ivanov, P.A., Gasanova, T.V., Sheveleva, A.A., Ravin, N.V., Mäkinen, K.M., Klimyuk, V.I., Skryabin, K.G., Gleba, Y.Y., Atabekov, J.G., 2006a. A novel function for a ubiquitous plant enzyme pectin methylesterase: the enhancer of RNA silencing. *FEBS Lett.* 580, 3872–3878.
 48. Dorokhov, Y.L., Komarova, T.V., Sheshukova, E.V., 2014. Chapter 13 - Volatile organic compounds and plant virus–host interaction, in: Sharma, R.K.G.H. (Ed.), *Plant Virus–Host Interaction*. Academic Press, Boston, pp. 241–262.
 49. Dorokhov Y.L., Makinen K.M., Frolova O.Y., Merits A., Kalkkinen N., Saarinen J., Atabekov J.G., Saarma M. 1999. A novel function for a ubiquitous plant enzyme pectin methylesterase: the host-cell receptor for the tobacco mosaic virus movement protein. *FEBS Lett.* 461, 223–8.
 50. Dorokhov, Y.L., Skurat, E.V., Frolova, O.Y., Gasanova, T.V., Ivanov, P.A., Ravin, N.V., Skryabin, K.G., Mäkinen, K.M., Klimyuk, V.I., Gleba, Y.Y., Atabekov, J.G., 2006. Role of the leader sequence in tobacco pectin methylesterase secretion. *FEBS Lett.* 580, 3329–3334.
 51. Downie, A., Miyazaki, S., Bohnert, H., John, P., Coleman, J., Parry, M., Haslam, R., 2004. Expression profiling of the response of *Arabidopsis thaliana* to methanol stimulation. *Phytochemistry* 65, 2305–2316.
 52. Downie, B., Dirk, L.M., Hadfield, K.A., Wilkins, T.A., Bennett, A.B., Bradford, K.J., 1998. A gel diffusion assay for quantification of pectin methylesterase activity. *Anal. Biochem.* 264, 149–157.
 53. Eigenbrode, S.D., Ding, H., Shiel, P., Berger, P.H., 2002. Volatiles from potato plants infected with potato leafroll virus attract and arrest the virus vector, *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). *Proc. Biol. Sci.* 269, 455–460.
 54. Ernst, A.M., Jekat, S.B., Zielonka, S., Muller, B., Neumann, U., Ruping, B., Twyman, R.M., Krzyzanek, V., Prufer, D., Noll, G.A., 2012. Sieve element occlusion (SEO) genes encode

- structural phloem proteins involved in wound sealing of the phloem. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, E1980–E1989.
55. Fall, R., Benson, A.A., 1996. Leaf methanol—the simplest natural product from plants. *Trends Plant Sci.* 1, 296–301.
 56. Farmer, E.E., 2001. Surface-to-air signals. *Nature* 411, 854–856.
 57. Farmer, E.E., Ryan, C.A., 1990. Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 7713–7716.
 58. Frenkel, C., Peters, J.S., Tieman, D.M., Tiznado, M.E., Handa, A.K., 1998. Pectin methylesterase regulates methanol and ethanol accumulation in ripening tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruit. *J. Biol. Chem.* 273, 4293–4295.
 59. Frost, C.J., Mescher, M.C., Dervinis, C., Davis, J.M., Carlson, J.E., De Moraes, C.M., 2008. Priming defense genes and metabolites in hybrid poplar by the green leaf volatile cis-3-hexenyl acetate. *New Phytol.* 180, 722–734.
 60. Fu, D., O'Neill, R. A., 1995. Monosaccharide composition analysis of oligosaccharides and glycoproteins by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.*, 227, 377–384
 61. Gaffe, J., Tieman, D.M., Handa, A.K., 1994. Pectin Methylesterase Isoforms in Tomato (*Lycopersicon esculentum*) Tissues (Effects of Expression of a Pectin Methylesterase Antisense Gene). *Plant Physiol.* 105, 199–203.
 62. Galbally, I.E., Kirstine, W., 2002. The production of methanol by flowering plants and the global cycle of methanol. *J. Atmospheric Chem.* 43, 195–229.
 63. Gout, E., Aubert, S., Bligny, R., Rébeillé, F., Nonomura, A.R., Benson, A.A., Douce, R., 2000. Metabolism of Methanol in Plant Cells. Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Studies. *Plant Physiol.* 123, 287–296.
 64. Green, B.R., Pichersky, E., Kloppstech, K., 1991. Chlorophyll a/b-binding proteins: an extended family. *Trends Biochem. Sci.* 16, 181–186.
 65. Gurskaya, N.G., Diatchenko, L., Chenchik, A., Siebert, P.D., Khaspekov, G.L., Lukyanov, K.A., Vagner, L.L., Ermolaeva, O.D., Lukyanov, S.A., Sverdlov, E.D., 1996. Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction: cloning of Jurkat cell transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate. *Anal. Biochem.* 240, 90–97.
 66. Han, X., Kumar, D., Chen, H., Wu, S., Kim, J.-Y., 2014. Transcription factor-mediated cell-to-cell signalling in plants. *J. Exp. Bot.* 65, 1737–1749.
 67. Harley P., 2007. Environmental controls over methanol emission from leaves. *Biogeosciences Discuss.* 4.

68. Harley, P., Eller, A., Guenther, A., Monson, R.K., 2014. Observations and models of emissions of volatile terpenoid compounds from needles of ponderosa pine trees growing in situ: control by light, temperature and stomatal conductance. *Oecologia* 176, 35–55.
69. Heese-Peck, A., Raikhel, N.V., 1998. A glycoprotein modified with terminal N-acetylglucosamine and localized at the nuclear rim shows sequence similarity to aldose-1-epimerases. *Plant Cell Online* 10, 599–612.
70. Hewezi, T., Howe, P., Maier, T.R., Hussey, R.S., Mitchum, M.G., Davis, E.L., Baum, T.J., 2008. Cellulose binding protein from the parasitic nematode *Heterodera schachtii* interacts with *Arabidopsis* pectin methylesterase: cooperative cell wall modification during parasitism. *Plant Cell* 20, 3080–3093.
71. Hohnjec, N., Vieweg, M.F., Pühler, A., Becker, A., Küster, H., 2005. Overlaps in the transcriptional profiles of *Medicago truncatula* roots inoculated with two different *Glomus* fungi provide insights into the genetic program activated during arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiol.* 137, 1283–1301.
72. Holland M. A., 2003. PPFMs and Other Covert Contaminants: Is There More to Plant Physiology Than Just Plant? 45, 197–209.
73. Holopainen, J.K., 2004. Multiple functions of inducible plant volatiles. *Trends Plant Sci.* 9, 529–533.
74. Holopainen, J.K., Blande, J.D., 2012. Molecular plant volatile communication. *Adv. Exp. Med. Biol.* 739, 17–31.
75. Holzinger, R., Sandoval-Soto, L., Rottenberger, S., Crutzen, P.J., Kesselmeier, J., 2000. Emissions of volatile organic compounds from *Quercus ilex* L. measured by Proton Transfer Reaction Mass Spectrometry under different environmental conditions. *J. Geophys. Res. Atmospheres* 105, 20573–20579.
76. Honda S, Akao E, Suzuki S, Okuda M, Kakehi K., 1989. High-performance liquid chromatography of reducing carbohydrates as strongly ultraviolet-absorbing and electrochemically sensitive 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives. *Analytical Biochemistry*. 180, 351-357
77. Horsch A. A simple and general method for transferring genes into plants, 1985. *Science* 227, 1229–1231.
78. Hörtnagl, L., Bamberger, I., Graus, M., Ruuskanen, T.M., Schnitzhofer, R., Müller, M., Hansel, A., Wohlfahrt, G., 2011. Biotic, abiotic and management controls on methanol exchange above a temperate mountain grassland. *J. Geophys. Res. Biogeosciences* 116.
79. Hourton-Cabassa, null, Ambard-Bretteville, null, Moreau, null, Davy de Virville J, null, Rémy, null, Francs-Small, null, 1998. Stress Induction of Mitochondrial Formate Dehydrogenase in Potato Leaves. *Plant Physiol.* 116, 627–635.

80. Huang, K., Mellor, K.E., Paul, S.N., Lawson, M.J., Mackey, A.J., Timko, M.P., 2012. Global changes in gene expression during compatible and incompatible interactions of cowpea (*Vigna unguiculata* L.) with the root parasitic angiosperm *Striga gesnerioides*. *BMC Genomics* 13, 402.
81. Hüve, K., Christ, M.M., Kleist, E., Uerlings, R., Niinemets, U., Walter, A., Wildt, J., 2007. Simultaneous growth and emission measurements demonstrate an interactive control of methanol release by leaf expansion and stomata. *J. Exp. Bot.* 58, 1783–1793.
82. Jardine, K., Wegener, F., Abrell, L., van Haren, J., Werner, C., 2014. Phytogetic biosynthesis and emission of methyl acetate. *Plant Cell Environ.* 37, 414–424.
83. Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., Bevan, M.W., 1987. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6, 3901–3907.
84. Jeong, M.L., Jiang, H., Chen, H.-S., Tsai, C.-J., Harding, S.A., 2004. Metabolic Profiling of the Sink-to-Source Transition in Developing Leaves of Quaking Aspen. *Plant Physiol.* 136, 3364–3375.
85. Jones, J.D.G., Dangl, J.L., 2006. The plant immune system. *Nature* 444, 323–329.
86. Kang, K., Park, S., Natsagdorj, U., Kim, Y.S., Back, K., 2011. Methanol is an endogenous elicitor molecule for the synthesis of tryptophan and tryptophan-derived secondary metabolites upon senescence of detached rice leaves: MeOH as an endogenous elicitor molecule. *Plant J.* 66, 247–257.
87. Karban, R., Maron, J., Felton, G.W., Ervin, G., Eichenseer, H., 2003. Herbivore damage to sagebrush induces resistance in wild tobacco: evidence for eavesdropping between plants. *Oikos* 100, 325–332.
88. Karl, T., Guenther, A., Spirig, C., Hansel, A., Fall, R., 2003. Seasonal variation of biogenic VOC emissions above a mixed hardwood forest in northern Michigan. *Geophys. Res. Lett.* 30, 2186.
89. Karl, T., Potosnak, M., Guenther, A., Clark, D., Walker, J., Herrick, J.D., Geron, C., 2004. Exchange processes of volatile organic compounds above a tropical rain forest: Implications for modeling tropospheric chemistry above dense vegetation. *J. Geophys. Res. Atmospheres* 109, D18306.
90. Kempema, L.A., Cui, X., Holzer, F.M., Walling, L.L., 2007. Arabidopsis transcriptome changes in response to phloem-feeding silverleaf whitefly nymphs. Similarities and distinctions in responses to aphids. *Plant Physiol.* 143, 849–865.
91. Kessler, A., Baldwin, I.T., 2002. Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 299–328.
92. Kissoudis, C., van de Wiel, C., Visser, R.G.F., van der Linden, G., 2014. Enhancing crop resilience to combined abiotic and biotic stress through the dissection of physiological and molecular crosstalk. *Front. Plant Sci.* 5, 207.

93. Knox, J.P., Linstead, P.J., King, J., Cooper, C., Roberts, K., 1990. Pectin esterification is spatially regulated both within cell walls and between developing tissues of root apices. *Planta* 181, 512–521.
94. Komarova, T.V., Sheshukova, E.V., Dorokhov, Y.L., 2014. Cell wall methanol as a signal in plant immunity. *Front. Plant Sci.* 5, 101.
95. Körner, E., von Dahl, C.C., Bonaventure, G., Baldwin, I.T., 2009. Pectin methylesterase NaPME1 contributes to the emission of methanol during insect herbivory and to the elicitation of defence responses in *Nicotiana attenuata*. *J. Exp. Bot.* 60, 2631–2640.
96. Kühn, C., Grof, C.P.L., 2010. Sucrose transporters of higher plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13, 288–298.
97. Kuśnierczyk, A., Winge, P., Jørstad, T.S., Troczyńska, J., Rossiter, J.T., Bones, A.M., 2008. Towards global understanding of plant defence against aphids--timing and dynamics of early *Arabidopsis* defence responses to cabbage aphid (*Brevicoryne brassicae*) attack. *Plant Cell Environ.* 31, 1097–1115.
98. Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
99. Lagrimini, L.M., Burkhart, W., Moyer, M., Rothstein, S., 1987. Molecular cloning of complementary DNA encoding the lignin-forming peroxidase from tobacco: Molecular analysis and tissue-specific expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 7542–7546.
100. Lastdrager, J., Hanson, J., Smeekens, S., 2014. Sugar signals and the control of plant growth and development. *J. Exp. Bot.* 65, 799–807.
101. Lee, J.-Y., 2003. Selective Trafficking of Non-Cell-Autonomous Proteins Mediated by NtNCAPP1. *Science* 299, 392–396.
102. Leisner, S.M., Turgeon, R., 1993. Movement of virus and photoassimilate in the phloem: a comparative analysis. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 15, 741–748.
103. Lievens, S., Goormachtig, S., Holsters, M., 2001. A critical evaluation of differential display as a tool to identify genes involved in legume nodulation: looking back and looking forward. *Nucleic Acids Res.* 29, 3459–3468.
104. Little, D., Gouhier-Darimont, C., Bruessow, F., Reymond, P., 2007. Oviposition by pierid butterflies triggers defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 143, 784–800.
105. Li, Y., Wu, M.Y., Song, H.H., Hu, X., Qiu, B.S., 2005. Identification of a tobacco protein interacting with tomato mosaic virus coat protein and facilitating long-distance movement of virus. *Arch. Virol.* 150, 1993–2008.

106. Loreto, F., Barta, C., Brilli, F., Nogues, I., 2006. On the induction of volatile organic compound emissions by plants as consequence of wounding or fluctuations of light and temperature. *Plant Cell Environ.* 29, 1820–1828.
107. MacDonald R., R.F., 1993. Detection of substantial emissions of methanol from plants to the atmosphere. *Atmospheric Environ. Part Gen. Top.* 1709–1713.
108. Mann, R.S., Ali, J.G., Hermann, S.L., Tiwari, S., Pelz-Stelinski, K.S., Alborn, H.T., Stelinski, L.L., 2012. Induced Release of a Plant-Defense Volatile “Deceptively” Attracts Insect Vectors to Plants Infected with a Bacterial Pathogen. *PLoS Pathog.* 8.
109. Marillonnet, S., Thoeringer, C., Kandzia, R., Klimyuk, V., Gleba, Y., 2005. Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nat. Biotechnol.* 23, 718–723.
110. Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K., He, S.Y., 2006. Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* 126, 969–980.
111. Meng, Q., Siebke, K., Lippert, P., Baur, B., Mukherjee, U., Weis, E., 2001. Sink–source transition in tobacco leaves visualized using chlorophyll fluorescence imaging. *New Phytol.* 151, 585–595.
112. Micheli, F., 2001. Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends Plant Sci.* 6, 414–419.
113. Mudgett, M.B., Clarke, S., 1994. Hormonal and environmental responsiveness of a developmentally regulated protein repair L-isoaspartyl methyltransferase in wheat. *J. Biol. Chem.* 269, 25605–25612.
114. Narusaka, Y., Narusaka, M., Seki, M., Ishida, J., Shinozaki, K., Nan, Y., Park, P., Shiraishi, T., Kobayashi, M., 2005. Cytological and molecular analyses of non-host resistance of *Arabidopsis thaliana* to *Alternaria alternata*. *Mol. Plant Pathol.* 6, 615–627.
115. Navakoudis, E., Ioannidis, N.E., Dörnemann, D., Kotzabasis, K., 2007. Changes in the LHCII-mediated energy utilization and dissipation adjust the methanol-induced biomass increase. *Biochim. Biophys. Acta* 1767, 948–955.
116. Nemecek-Marshall, M., MacDonald, R.C., Franzen, J.J., Wojciechowski, C.L., Fall, R., 1995. Methanol emission from leaves (enzymatic detection of gas-phase methanol and relation of methanol fluxes to stomatal conductance and leaf development). *Plant Physiol.* 108, 1359–1368.
117. Niinemets, Ü., 2003. Controls on the emission of plant volatiles through stomata: Differential sensitivity of emission rates to stomatal closure explained. *J. Geophys. Res.* 108.
118. Niinemets, Ü., Fares, S., Harley, P., Jardine, K.J., 2014. Bidirectional exchange of biogenic volatiles with vegetation: emission sources, reactions, breakdown and deposition. *Plant Cell Environ.* 37, 1790–1809.

119. Nonomura, A.M., Benson, A.A., 1992b. The path of carbon in photosynthesis: improved crop yields with methanol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 9794–9798.
120. Odell, J.T., Knowlton, S., Lin, W., Mauvais, C.J., 1988. Properties of an isolated transcription stimulating sequence derived from the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Plant Mol. Biol.* 10, 263–272.
121. Oikawa, P.Y., Lerda, M.T., 2013. Catabolism of volatile organic compounds influences plant survival. *Trends Plant Sci.* 18, 695–703.
122. Oparka, K.J., Roberts, A.G., Boevink, P., Santa Cruz, S., Roberts, I., Pradel, K.S., Imlau, A., Kotlizky, G., Sauer, N., Epel, B., 1999. Simple, but not branched, plasmodesmata allow the nonspecific trafficking of proteins in developing tobacco leaves. *Cell* 97, 743–754.
123. Park, S.-W., Kaimoyo, E., Kumar, D., Mosher, S., Klessig, D.F., 2007. Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science* 318, 113–116.
124. Peaucelle, A., Braybrook, S.A., Le Guillou, L., Bron, E., Kuhlemeier, C., Höfte, H., 2011. Pectin-induced changes in cell wall mechanics underlie organ initiation in *Arabidopsis*. *Curr. Biol. CB* 21, 1720–1726.
125. Peaucelle, A., Louvet, R., Johansen, J.N., Höfte, H., Laufs, P., Pelloux, J., Mouille, G., 2008. *Arabidopsis* phyllotaxis is controlled by the methyl-esterification status of cell-wall pectins. *Curr. Biol. CB* 18, 1943–1948.
126. Pelletier, S., Van Orden, J., Wolf, S., Vissenberg, K., Delacourt, J., Ndong, Y.A., Pelloux, J., Bischoff, V., Urbain, A., Mouille, G., Lemonnier, G., Renou, J.-P., Höfte, H., 2010. A role for pectin de-methylesterification in a developmentally regulated growth acceleration in dark-grown *Arabidopsis* hypocotyls. *New Phytol.* 188, 726–739.
127. Pelloux, J., Rustérucchi, C., Mellerowicz, E.J., 2007. New insights into pectin methylesterase structure and function. *Trends Plant Sci.* 12, 267–277.
128. Peñuelas, J., Filella, I., Stefanescu, C., Llusà, J., 2005. Caterpillars of *Euphydryas aurinia* (Lepidoptera: Nymphalidae) feeding on *Succisa pratensis* leaves induce large foliar emissions of methanol. *New Phytol.* 167, 851–857.
129. Pieterse, C.M.J., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., Van Wees, S.C.M., 2009. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat. Chem. Biol.* 5, 308–316.
130. Pilling, E., Höfte, H., 2003. Feedback from the wall. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 611–616.
131. Pollegioni, L., Tonin, F., Rosini, E., 2015. Lignin-degrading enzymes: a review. *FEBS J.*
132. Proseus, T.E., Boyer, J.S., 2012. Pectate chemistry links cell expansion to wall deposition in *Chara corallina*. *Plant Signal. Behav.* 7, 1490–1492.

133. Puthoff, D.P., Nettleton, D., Rodermel, S.R., Baum, T.J., 2003. Arabidopsis gene expression changes during cyst nematode parasitism revealed by statistical analyses of microarray expression profiles. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 33, 911–921.
134. Raiola, A., Camardella, L., Giovane, A., Mattei, B., De Lorenzo, G., Cervone, F., Bellincampi, D., 2004. Two Arabidopsis thaliana genes encode functional pectin methylesterase inhibitors. *FEBS Lett.* 557, 199–203.
135. Raiola, A., Lionetti, V., Elmaghraby, I., Immerzeel, P., Mellerowicz, E.J., Salvi, G., Cervone, F., Bellincampi, D., 2011. Pectin methylesterase is induced in Arabidopsis upon infection and is necessary for a successful colonization by necrotrophic pathogens. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 24, 432–440.
136. Rebrikov, D.V., Britanova, O.V., Gurskaya, N.G., Lukyanov, K.A., Tarabykin, V.S., Lukyanov, S.A., 2000. Mirror orientation selection (MOS): a method for eliminating false positive clones from libraries generated by suppression subtractive hybridization. *Nucleic Acids Res.* 28, E90.
137. Reymond, P., Weber, H., Damond, M., Farmer, E.E., 2000. Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in Arabidopsis. *Plant Cell Online* 12, 707–719.
138. Richard L., Qin L., Goldberg R. (1996) Clustered genes within the genome of Arabidopsis thaliana encoding pectin methylesterase-like enzymes *Gene* 170 207-211
139. Rojas, E.R., Hotton, S., Dumais, J., 2011. Chemically Mediated Mechanical Expansion of the Pollen Tube Cell Wall. *Biophys. J.* 101, 1844–1853.
140. Roitsch T. (1999) Source-sink regulation by sugar and stress *Current Opinion in Plant Biology*, 2:198-206
141. Rolland F., Baena-Gonzalez E., Sheen J. (2006) Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57:675–709
142. Sager, R., Lee, J.-Y., 2014. Plasmodesmata in integrated cell signalling: insights from development and environmental signals and stresses. *J. Exp. Bot.* 65, 6337–6358.
143. Sanchez-Casas, P., Klessig, D.F., 1994. A Salicylic Acid-Binding Activity and a Salicylic Acid-Inhibitable Catalase Activity Are Present in a Variety of Plant Species. *Plant Physiol.* 106, 1675–1679.
144. Senechal, F., Wattier, C., Rusterucci, C., Pelloux, J., 2014. Homogalacturonan-modifying enzymes: structure, expression, and roles in plants. *J. Exp. Bot.* 65, 5125–5160.
145. Shaw, J.G., 1999. Tobacco mosaic virus and the study of early events in virus infections. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 354, 603–611.
146. Shulaev V., 1997. Airborne signalling by methyl salicylate in plant pathogen resistance 385, 718–721.

147. Sonja Vorwerk, S.S., 2004. The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. *Trends Plant Sci.* 9, 203–209.
148. Stavrakou, T., Müller, J.-F., Peeters, J., Razavi, A., Clarisse, L., Clerbaux, C., Coheur, P.-F., Hurtmans, D., De Mazière, M., Vigouroux, C., Deutscher, N.M., Griffith, D.W.T., Jones, N., Paton-Walsh, C., 2012. Satellite evidence for a large source of formic acid from boreal and tropical forests. *Nat. Geosci.* 5, 26–30.
149. Stintzi, A., Heitz, T., Prasad, V., Wiedemann-Merdinoglu, S., Kauffmann, S., Geoffroy, P., Legrand, M., Fritig, B., 1993. Plant “pathogenesis-related” proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie* 75, 687–706.
150. Taoka, K. -i., Ham, B.-K., Xoconostle-Cazares, B., Rojas, M.R., Lucas, W.J., 2007. Reciprocal Phosphorylation and Glycosylation Recognition Motifs Control NCAPP1 Interaction with Pumpkin Phloem Proteins and Their Cell-to-Cell Movement. *PLANT CELL ONLINE* 19, 1866–1884.
151. Turlings, T.C., Tumlinson, J.H., Lewis, W.J., 1990. Exploitation of herbivore-induced plant odors by host-seeking parasitic wasps. *Science* 250, 1251–1253.
152. Ueda, M., Manabe, Y., Mukai, M., 2011. The high performance of 3XFLAG for target purification of a bioactive metabolite: A tag combined with a highly effective linker structure. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21, 1359–1362.
153. Uehara, T., Sugiyama, S., Masuta, C., 2007. Comparative serial analysis of gene expression of transcript profiles of tomato roots infected with cyst nematode. *Plant Mol. Biol.* 63, 185–194.
154. Ueki, S., Lacroix, B., Citovsky, V., 2011. Protein Membrane Overlay Assay: A Protocol to Test Interaction Between Soluble and Insoluble Proteins in vitro. *J. Vis. Exp.*
155. Van Lent, J., Storms, M., van der Meer, F., Wellink, J., Goldbach, R., 1991. Tubular structures involved in movement of cowpea mosaic virus are also formed in infected cowpea protoplasts. *J. Gen. Virol.* 72 (Pt 11), 2615–2623.
156. Vlot, A.C., Klessig, D.F., Park, S.-W., 2008. Systemic acquired resistance: the elusive signal(s). *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 436–442.
157. Von Dahl, C.C., Hävecker, M., Schlögl, R., Baldwin, I.T., 2006b. Caterpillar-elicited methanol emission: a new signal in plant-herbivore interactions? *Plant J.* 46, 948–960.
158. Vuorinen, A.L., Kelloniemi, J., Valkonen, J.P.T., 2011. Why do viruses need phloem for systemic invasion of plants? *Plant Sci. Int. J. Exp. Plant Biol.* 181, 355–363.
159. Wang, X., Sager, R., Cui, W., Zhang, C., Lu, H., Lee, J.-Y., 2013. Salicylic acid regulates Plasmodesmata closure during innate immune responses in Arabidopsis. *Plant Cell* 25, 2315–2329.

160. Warneke, C., Luxembourg, S.L., de Gouw, J.A., Rinne, H.J.I., Guenther, A.B., Fall, R., 2002. Disjunct eddy covariance measurements of oxygenated volatile organic compounds fluxes from an alfalfa field before and after cutting. *J. Geophys. Res. Atmospheres* 107, ACH 6–1.
161. Whitham, S.A., Quan, S., Chang, H.-S., Cooper, B., Estes, B., Zhu, T., Wang, X., Hou, Y.-M., 2003. Diverse RNA viruses elicit the expression of common sets of genes in susceptible *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 33, 271–283.
162. Wojtasik, W., Kulma, A., Kostyn, K., Szopa, J., 2011. The changes in pectin metabolism in flax infected with *Fusarium*. *Plant Physiol. Biochem. PPB Société Fr. Physiol. Végétale* 49, 862–872.
163. Wolf, S., Mravec, J., Greiner, S., Mouille, G., Höfte, H., 2012. Plant Cell Wall Homeostasis Is Mediated by Brassinosteroid Feedback Signaling. *Curr. Biol.* 22, 1732–1737.
164. Wydra, K., Beri, H., 2006. Structural changes of homogalacturonan, rhamnogalacturonan I and arabinogalactan protein in xylem cell walls of tomato genotypes in reaction to *Ralstonia solanacearum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 68, 41–50.
165. Yang, C., Guo, R., Jie, F., Nettleton, D., Peng, J., Carr, T., Yeakley, J.M., Fan, J.-B., Whitham, S.A., 2007. Spatial analysis of *Arabidopsis thaliana* gene expression in response to Turnip mosaic virus infection. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* 20, 358–370.
166. Yan, Z.-G., Wang, C.-Z., 2006. Wound-induced green leaf volatiles cause the release of acetylated derivatives and a terpenoid in maize. *Phytochemistry* 67, 34–42.
167. Yoshiko Fukui, P.V.D., 1998. Air-surface exchange of nonmethane organic compounds at a grassland site: Seasonal variations and stressed emissions. *J. Geophys. Res.* 1031, 13153–13168.
168. Yu, F., Utsumi, R., 2009. Diversity, regulation, and genetic manipulation of plant mono- and sesquiterpenoid biosynthesis. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 66, 3043–3052.
169. Zambryski, P., Crawford, K., 2000. Plasmodesmata: gatekeepers for cell-to-cell transport of developmental signals in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, 393–421.
170. Zavaliev, R., Ueki, S., Epel, B.L., Citovsky, V., 2011. Biology of callose (β -1,3-glucan) turnover at plasmodesmata. *Protoplasma* 248, 117–130.
171. Zhong, R., Ye, Z.-H., 2014. Secondary Cell Walls: Biosynthesis, Patterned Deposition and Transcriptional Regulation. *Plant Cell Physiol.* pcu140.
172. Zhu Y.Y., Machleder E.M., Chenchik A., Li R., Siebert P.D. (2001) Reverse transcriptase template switching, a SMART approach for full-length cDNA library construction. *Biotechniques* 30, 892-897.
173. Zubeda Chaudhry, T.Y., 1998. Stimulated ethylene production in tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. Ky 57) leaves infected systemically with cucumber mosaic virus yellow strain. *Plant Sci.* 131, 123–130.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю свою искреннюю благодарность моим научным руководителям Юрию Леонидовичу Дорохову и Татьяне Валерьевне Комаровой за помощь в постановке экспериментов и научные консультации при работе над диссертационным проектом, моим коллегам по лаборатории Фроловой О.Ю., Петруне И.В., Фроловой Н.Н., Шиндяпиной А.В. и Шешуковой Е.В., а также сотрудникам НИИ ФХБ имени Белозерского Шевалю Е.В. и Савченко И.М. за помощь в экспериментальной деятельности и дружескую атмосферу.