

4. Лупашку З.А. Микрофлора ризосферы смешанных бобово-злаковых посевов и ее роль в питании растений. // Автореф.дисс.канд.с.-х. наук. Л., 1974, 15 с.
5. Хомяков Д.М. Агробиологические условия и эффективность удобрений. – М.: Изд-во МГУ, 1990.- 83 с.
6. Тютюников А.Н., Кремина А.И. Использование воды растениями в смешанных посевах. // Вестник с.-х. науки, 1965. №1, С.74-78
7. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта / Изд. 2-е, перераб. и доп./.-М.: Изд. “Колос”, 1968. -335с.

УДК 575.13:577.21

КОНСТРУИРОВАНИЕ ПЛАЗМИД ДЛЯ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЭКСПРЕССИИ ХАРПИНОВ ИЗ *ERWINIA CAROTOVORA SUBSP. ATROSEPTICA*

Лагоненко А. Л., Николайчик Е. А., Евтушенков А. Н.

Белгосуниверситет, биологический факультет, кафедра молекулярной биологии
г. Минск, Республика Беларусь

Фитопатогенные бактерии *Erwinia carotovora subsp. atroseptica* являются возбудителями заболевания «черная ножка» у многих сортов картофеля, что приводит к потерям до 30% урожая. На данный момент в Беларуси нет достаточно эффективного препарата для защиты растений картофеля от фитопатогенных микроорганизмов.

Через системы секреции первого, второго и третьего типов из клеток *Erwinia carotovora subsp. atroseptica* транспортируется множество белков различной природы. Часть из них, пекаттазиазы, целлюлазы, протеазы, являются гидролитическими ферментами и нужны для разрушения компонентов растительных тканей [1]. Харпины – особый класс белков, являющихся субстратом системы секреции третьего типа многих фитопатогенных бактерий. Это богатые глицином, термостабильные белки, участвующие в процессе распознавания растением соответствующего патогенного микроорганизма [2,3].

Недавно корпорацией EDEN Bioscience (США) разработан препарат на основе харпина HrpN из *Erwinia amylovora* (Harp-N-Тек, Messengere™). Обработка вегетирующих растений этим продуктом приводила к значительному увеличению устойчивости к различным патогенам, а также к стимулированию роста, поглощения питательных веществ и фотосинтеза. Подобный эффект препарата объясняется индукцией защитных механизмов растения без контакта с фитопатогеном. В результате растение приобретает системную устойчивость и уменьшается вероятность инфекции [4].

Анализ генома *Erwinia carotovora subsp. atroseptica* позволил выявить два гена, имеющих высокую степень сходства с генами, кодирующими харпины HrpN и HrpW *Erwinia amylovora* и *Pseudomonas*

syringae. Целью данной работы было конструирование плазмид, позволяющих экспрессировать харпины HrpN и HrpW из *Erwinia carotovora subsp. atroseptica* в клетках *E. coli*, что в перспективе позволит очистить эти белки в достаточном для исследования защитных свойств количестве.

Для решения поставленной задачи на основе последовательности генома *Erwinia carotovora subsp. atroseptica* SCRI1043 (код доступа AF135397) были сконструированы праймеры к генам *hrpW* и *hrpN* (*hrpW*1 5' GGAGATAAGCTTGCTGATATGACNATHAC 3', *hrpW*2 5' GTATTTGGCGTCGACRTTCACYTGARRTT 3', *hrpN*1 5' CACCATATGCTTAATTCTCTTGGTGGCGG 3', *hrpN*2 5' CACGGATCCTAGCTCGCGAGCTTTTGCAGCCCCAT 3'). Методом ПЦР были амплифицированы фрагменты хромосомной ДНК *Eca* 3-2 размером 1,5 и 1,1 т.п.н. соответственно, клонированы по введенным в последовательности праймеров сайтам рестрикции HindIII, SalI (для *hrpW*) и NdeI, BamHI (для *hrpN*) в векторе pUC18. Определение нуклеотидной последовательности клонированных фрагментов подтвердило их соответствие искомым генам.

На следующем этапе гены *hrpN* и *hrpW* были переклонированы по тем же сайтам рестрикции в вектор pFLAG-СТС за *tac*-промотором и рибосомсвязывающим сайтом. В одной рамке считывания с изучаемыми генами оказывалась небольшая последовательность FLAG, кодирующая октапептид, легко детектируемый анти-FLAG M2 антителами (Sigma). Полученные конструкции вводились в клетки *E. coli* XL-I Blue. Сравнение профилей клеточных белков *E. coli* с плазмидами экспрессии и без, полученных в результате электрофореза в системе Леммли показало, что белки HrpN и HrpW эффективно экспрессируются. Их содержание по отношению к общему количеству клеточного белка составляет не менее 50%. Кроме того, харпины HrpW и HrpN удалось обнаружить в клетках *E. coli* методом Вестерн-блоттинга, что говорит о доступности антигенной детерминанты FLAG для соответствующих антител и делает возможной очистку химерных белков путем аффинной хроматографии.

Таким образом сконструированы плазмиды, позволяющие экспрессировать харпины *Erwinia carotovora subsp. atroseptica* в клетках *E. coli*. Наличие октапептида FLAG в пределах карбоксиконцевых доменов HrpN и HrpW даст возможность очистить эти белки с помощью аффинной хроматографии. Очищенные харпины будут исследованы на способность повышать резистентность растений картофеля к заболеваниям бактериальной и грибной природы. При подтверждении данных зарубежных авторов откроется перспектива к созданию отечественного аналога препарата Harp-N-Tek, MessengereTM.

Литература

1. Binet R., Letoffe S., Ghigo J. M., Delepelaire P., Wandersman C. Protein secretion by gram-negative bacterial ABC exporters—a review // *Gene*. 1997. 192 (1). P. 7-11.
2. Kim F. J., Beer S. V. HrpW of *Erwinia amylovora*, a new harpin that contains a domain homologous to pectate lyases of a distinct class // *J. Bacteriol.* 1998. vol. 180. № 19. P. 5203 – 5210.
3. Kariola T., Palomaki T. A., Brader G., Palva E. T. *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and *Erwinia*-derived elicitors HrpN and PehA trigger distinct but interacting defense responses and cell death in *Arabidopsis* // *MPMI*. 2003. Vol. 16; No. 3, P. 179-187.
4. www.edenbioscience.com

Summary

We have cloned and overexpressed the genes of HrpN and HrpW harpins from *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in *E. coli* cells.

Резюме

Работа посвящена клонированию и сверхэкспрессии генов, кодирующих харпины HrpN и HrpW из *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* в клетках *E. coli*.

УДК 633.14"324":632.421.9:632.934

ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТЬ ХИМИЧЕСКОЙ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ СЕМЕЙСТВА МЯТЛИКОВЫХ – *POACEAE* ОТ СПОРЫНИИ

Немкович А.И.

УО «Барановичский государственный университет»
г. Барановичи, Республика Беларусь

Спорынья злаковых культур как болезнь известна давно, однако, работ посвященных химической защите от этой болезни ограниченное количество [1,2,3,4].

В последние годы в условиях Беларуси происходит массовое распространение и развитие спорынии, как в посевах злаковых кормовых культур, так и посевах зерновых колосовых.

Маршрутные обследования посевов озимой ржи и тритикале, проведенные нами в 1996-1999гг., а также данные пунктов сигнализации и прогнозов за 1996-2004 гг., позволили получить точное представление о распространенности болезни на территории республики, составляющей от 30 до 100%.

Такой уровень распространенности спорынии в посевах озимых колосовых культур обусловлен, прежде всего, нарушениями агротехники культур и не использование зачастую переходящих семенных фондов, а известно, что склероции патогена теряют способность к инфицированию лишь через 7-8 месяцев [2].

Семена после подработки на зерноочистительных машинах, не отделяющие склероции, часто не протравливаются. Увеличение засорен-