

## Фитоцистатин от пшеница повишава устойчивостта към *Fusarium oxysporum* при моделното растение *Arabidopsis thaliana*

Петя К. Христова<sup>1\*</sup>, Николай К. Христов<sup>1</sup>, Ръзо Имаи<sup>2</sup>,  
Росица Б. Бъчварова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Агробиоинститут, София, България

<sup>2</sup>Институт по агробиологични науки (NIAS), Цукуба, Япония

\*E-mail: [petyachristova@abi.bg](mailto:petyachristova@abi.bg)

### Резюме

Антигъбните свойства на пшеничния цистатин *TaMDC1* са изследвани чрез хетероложно експресиране на гена в моделното растение *Arabidopsis thaliana* с помощта на биотехнологични подходи. Цветни пъпки от *Arabidopsis*, екотип Колумбия, са трансформирани *in vivo* с помощта на *Agrobacterium tumefaciens* чрез използване на т. н. “Floral dip” метод. Семената, получени от трансформираният цветни пъпки, са селектирани чрез засяване на агарова MS среда, съдържаща канамицин. Интеграцията на ген *TaMDC1* в устойчивите на антибиотика растения от поколение T<sub>1</sub> е доказана чрез PCR анализ. Проследено е унаследяването на селективния маркерен ген за устойчивост към канамицин в T<sub>2</sub> и T<sub>3</sub> поколение и са отбрани хомозиготни линии *Arabidopsis*, носещи единично копие на гена *TaMDC1*. Антигъбните свойства на пшеничния цистатин *TaMDC1* са изследвани чрез инокулиране на растения от селектирани линии *Arabidopsis* с фитопатогенната гъба *Fusarium oxysporum*. Всички анализирани линии демонстрират висока степен на устойчивост към заразяване с патогена в сравнение с изходната линия. Най-устойчиви на инокулиране с *F. oxysporum* са линиите Cys 9-3-4, Cys 14-2-5 и Cys 18-6-3.

**Ключови думи:** цистатин; *TaMDC1*; антигъбни свойства; фитопатогенни гъби; *Arabidopsis*

## A wheat phytocystatin increase resistance to *Fusarium oxysporum* of a model plant *Arabidopsis thaliana*

Petya K. Christova<sup>1\*</sup>, Nikolai K. Christov<sup>1</sup>, Ryozo Imai<sup>2</sup>, Rossitza B. Batchvarova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>AgroBioInstitute, Sofia, Bulgaria

<sup>2</sup>Institute of Agrobiological Sciences (NIAS), Tsukuba, Japan

\*E-mail: [petyachristova@abi.bg](mailto:petyachristova@abi.bg)

### Abstract

Christova, P. K., Christov, N. K., Imai, R. & Batchvarova, R. (2018). A wheat phytocystatin increase resistance to *Fusarium oxysporum* of a model plant *Arabidopsis thaliana*. *Rastenievadni nauki*, 55(3), 37-46 (Bg).

Antifungal activities of the wheat cystatin *TaMDC1* were analyzed by a heterologous expression of the protein in a model plant *Arabidopsis thaliana*. The floral buds of *Arabidopsis*, ecotype Columbia, were transformed *in vivo* by *Agrobacterium tumefaciens* using a “Floral dip” method. The putative transformed seeds were selected on MS media supplemented with kanamycin. The integration of the *TaMDC1* gene was proved in T<sub>1</sub> plants by PCR analyses. Segregation of the gene in T<sub>2</sub> and T<sub>3</sub> generations was analyzed and homozygous *Arabidopsis* lines with a single copy of the *TaMDC1* gene were selected. Antifungal activities of the *TaMDC1* were evaluated by inoculation of plants from selected *Arabidopsis* lines with phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. All

tested lines were more resistant to the pathogen compared to the wild type *A. thaliana*. The highest resistance to inoculation with *F. oxysporum* was shown by the lines Cys 9-3-4, Cys 14-2-5 and Cys 18-6-3.

**Keywords:** cystatin; TaMDC1; antifungal activity; phytopathogenic fungus; *Arabidopsis*

Растителните цистатини (фитоцистатини) са протеиназни инхибитори, идентифицирани в голям брой едноседелни и двуседелни растителни видове. Те се експресират не само в специфични тъкани и фази от развитието на растенията, но и като отговор при въздействието на различни абиотични и биотични стресови фактори (Pernas et al., 2000; Gaddour et al., 2001; Diop et al., 2004.). Една от основните им функции е регулиране метболизма на протеините при зреене и покълване на семената (Salmia, 1980). Установена е ролята на фитоцистатините в защитните механизми на растенията спрямо патогени и насекоми (Hines et al., 1991; Cipriani et al., 2000; Martinez et al., 2003). Има данни, доказващи натрупването на цистатини в резултат на засушаване и нискотемпературен стрес (Pernas et al., 2000; Diop et al., 2004, Simova-Stoilova et al., 2010).

Растителните цистатини са потенциален източник на устойчивост към болести и неприятели. С помощта на биотехнологични подходи са създадени форми растения, които имат повишена експресия на екзогенни фитоцистатини и проявяват устойчивост спрямо насекоми и нематоди (Urwin et al., 1997). Доказана е способността на цистатин от ориз да инхибира развитието на потивирус SPFMV (Cipriani et al., 2000).

Взаимодействието между фитоцистатини, изолирани от различни растителни видове, и някои гъбни патогени е проучено в условия *in vitro*. Доказана е способността на цистатин от ечемик (Hv-CPI) да потиска развитието на *Colletotrichum graminicola*, *Plectosphaerella cucumerina*, *Botrytis cinerea* и *Trichoderma viridae* (Martinez et al., 2003). Проучване на цистатините от ечемик (Hv-CPI 1-13) доказва, че 12 от тях имат потискащ ефект спрямо фитопатогенните гъби *Magnaporthe grisea*, *Plectosphaerella cucumerina* и *Fusarium oxysporum* (Carrillo et al., 2011). Установено е, че цистатин от кестен инхибира развитието на *B. cinerea*, *C. graminicola* и *Septoria nodorum* (Pernas et al., 1999), а цистатин от ягода проявява антигъбна активност спрямо *F. oxysporum* и *B. cinerea* (Martinez et al., 2005). В *in vitro* условия

са доказани също антигъбните свойства на цистатини от просо, захарна тръстика, карамфил, пшеница, сусам и други (Joshi et al., 1998; Soares-Costa et al., 2002; Sugawara et al., 2002; Christova et al., 2006; Pirovani et al., 2010; Valdes-Rodriguez et al., 2010; Cheng et al., 2014).

През последните години изследванията са насочени към проучване на антигъбните свойства на фитоцистатините в условия *in vivo*, но механизмите на устойчивост все още не са достатъчно добре проучени (Purwar et al., 2010; Senthilkumar et al., 2010; Valdes-Rodriguez et al., 2010; Carrillo et al., 2011; Munger et al., 2012; Popovic et al., 2012; Christova et al., 2018).

Фитопатогенните гъби от род *Fusarium* засягат широк спектър от растения гостоприемници и ежегодно нанасят сериозни щети върху селскостопанската продукция на зеленчукови, зърнено-житни и технически култури (Наков и др., 1999; Станчева, 2000, 2002а, 2002б; Dean et al., 2012). Разпространението на фузариозите се ограничава трудно и много често има летален ефект върху нападнатите растения (Navas-Cortes et al., 2000; Nganje et al., 2002). Борбата с фузариозите се води посредством сеитбообращение, обеззаразяване на семената, предпазване от разпространение на заразени растителни остатъци и използване на устойчиви сортове културни растения.

Целта на настоящото изследване е проучване на антигъбното действие на фитоцистатините в условия *in vivo*, чрез използването на моделни обекти. Резултатите от него могат да допринесат за разясняване механизма на устойчивост и търсене на надежден подход за селекция на сортове с повишена експресия на ендогенни цистатини.

## МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

### Материали

За провеждане на експерименталната работа е избрано моделното растение *Arabidopsis thaliana*, екотип Колумбия. Използваният за за-

разяване *F. oxysporum* е от колекцията на групата по биотичен стрес на Агробиоинститут, София.

### Конструиране на плазмиден вектор

Кодиращата последователност на *TaMDC1* е амплифицирана чрез PCR реакция с праймери F: 5' - GCGCGGATCCAAAGGACTCCTCCGGCAG - 3' и R: 5' - GCGCCTGTGAGCTCAACAAGTCAG - 3', добавящи последователности разпознавани от рестрикционните ензими *Bam*HI и *Sac*I. След сръзване със съответните ензими PCR фрагментът е лигиран на мястото на GUS гена в плазмид pBI121 (Clontech). В така конструирания плазмид, наречен pBI Cys, пшеничният цистатин е поставен под контрола на конститутивния CaMV 35S промотор, което позволява неговото експресиране в растения. Нуклеотидната последователност на лигирания кДНК фрагмент е потвърдена чрез секвениране. Полученият рекомбинантен плазмид е включен в *A. tumefaciens* щам pGV3101 pMP90.

### Генетична трансформация на *A. thaliana*

Семенното потомство на растения *Arabidopsis*, екотип Колумбия, е трансформирано *in vivo* с помощта на *A. tumefaciens*, носещ рекомбинантния плазмид с пшеничен цистатин *TaMDC1* и маркерен ген за устойчивост на канамицин (NPT II). Използван е т.нар. "Floral dip" метод (Clough and Bent, 1998), при който цветовете и цветните пъпки на *A. thaliana* се потапят в суспензия от *A. tumefaciens*, носещ рекомбинантния плазмид с ген *TaMDC1*. Зрелите семена от третиранията растения са събирани и засявани на агарова MS среда, съдържаща антибиотика канамицин.

### PCR анализ за интегрирането на *TaMDC1* в генома на *Arabidopsis*

Устойчивите на канамицин растения от поколение T<sub>1</sub> са засаджани в почва и са анализирани за интегриране на ген *TaMDC1* чрез PCR. За амплификация е използвана праймерна двойка F: 5' - GCGCGGATCCAAAGGACTCCTCCGGCAG - 3' and R: 5' - GCGCCTGTGAGCTCAACAAGTCAG - 3' и следната PCR програма: 95°C – 3 мин.; 95°C – 1 мин., 60°C – 1 мин., 72°C – 1 мин. (35 цикъла); 72°C – 10 мин. PCR продуктите са визуализирани на 1% агарозен гел.

### Отбор на хомозиготни растения

#### *Arabidopsis*, носещи единично копие на *TaMDC1*

Семената от доказаните чрез PCR трансформанти се засявани на агарова MS основна среда, съдържаща антибиотика канамицин. Разпадането по признака устойчивост на канамицин в поколение T<sub>2</sub> е отчетено и са отбрани линии с единично копие на *TaMDC1*. Семената от отбраните линии отново са селектирани на среда съдържаща канамицин и са отбрани неразпадащи хомозиготни линии (T<sub>3</sub> поколение). За оценка на съответствието между експериментално установените съотношения на разпадане по признака устойчивост на канамицин и теоретично очакваните по законите на Мендел е използван критерия хи квадрат ( $\chi^2$ ).

### Заразяване на *A. thaliana* с *F. oxysporum*

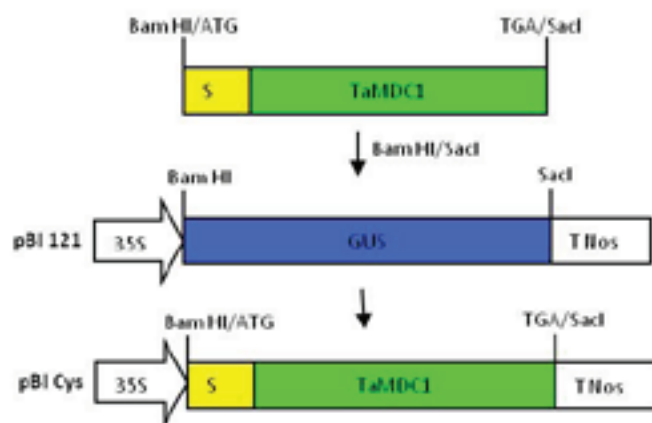
Заразяването с *F. oxysporum* е извършвано на растения от отбраните хомозиготни линии *Arabidopsis* от поколение T<sub>3</sub>. Растенията са отглеждани *in vitro* на агарова MS среда в продължение на 2 седмици и са инокулирани със 7-дневна мицелно-спорова култура от фитопатогенната гъба *F. oxysporum* (10<sup>3</sup>-10<sup>4</sup> cfu/ml). Инокулираните с гъбата растения са инкубирани при температура 24°C и фотопериод 16 часа ден / 8 часа нощ. За контрола е използвана изходната линия *A. thaliana*, екотип Колумбия. Анализирани са по 16 растения от 7 хомозиготни линии *Arabidopsis*. Резултатите са отчитани 10 дни след инокулиране с патогена. Устойчивостта е определяна по симптомите на заболяване, дължина на корена и общ хабитус на растенията.

## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

### Конструиране на плазмиден вектор и генетична трансформация на *A. thaliana*

Заекспресиране на пшеничния цистатин *TaMDC1* в растения е конструиран плазмиден вектор на базата на вектор pBI121. Полученият рекомбинантен плазмид е включен в *Agrobacterium tumefaciens* щам pGV3101 pMP90 (Фиг. 1).

С пшеничния цистатин *TaMDC1* са трансформирани 16 растения *Arabidopsis*, като е



**Фигура 1.** Конструирание на рекомбинантен плазмид за експресия на *TaMDC1* в растения; S-сигнален пептид за локализация на протеина в ендоплазматичния ретикулум  
**Figure 1.** Construction of recombinant plasmid for expression of *TaMDC1* in plants

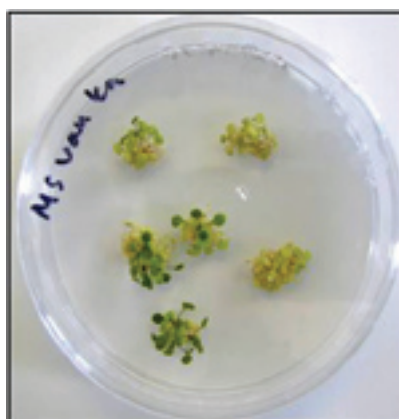
приложен метода “Floral dip”. Това е бърз, евтин и леснодостъпен начин за генетична трансформация на растения. Той е особено ефективен при *Arabidopsis*, тъй като позволява получаване и отбор на голям брой трансформирани семена за кратък период от време. От всяко трансформирано растение са събрани над 1000 семена. Нашите резултати показват, че за 4 месеца се осъществява отбор на растенията, носещи ген *TaMDC1* от поколение  $T_1$ , което е невъзможно при работа с друг растителен обект.

Основните предимства, които обуславят използването на моделното растение *Arabidopsis* в научно-експерименталната работа, са: развитие, размножаване и отговор на различни стрес-

сове и болести, сходни с тези на културните растения; малък геном, който е напълно секвениран; генетични и физични карти на всички хромозоми; голям набор от мутантни линии; кратък жизнен цикъл и образуване на много семена и лесно култивиране (Smyth, 1990; Meinke et al., 1998).

#### Отбор на растения *Arabidopsis* носещи ген *TaMDC1*

Отборът на селективна MS среда в  $T_1$  поколение показва развитие на растения *Arabidopsis* с нормален хабитус, както и на хлоротични растения със забавен растеж, видимо потиснати от наличието на канамицин (Фиг. 2). Резултатът



**Фигура 2.** Селекция на растенията от поколение  $T_1$  на агарова MS среда, съдържаща канамицин  
**Figure 2.** Selection of  $T_1$  plants on solid MS media supplemented with kanamycin

предполага интегриране на ген *TaMDC1* в геном на част от растенията *Arabidopsis*.

Интегрирането на ген *TaMDC1* в генома на растенията от  $T_1$  поколение е доказано чрез присъствието на фрагмент с големина 1 kb при проведения PCR анализ (Фиг. 3). Изследвани са общо 122 растения, селектирани на среда с канамицин, от 16 различни линии. Положителен резултат за наличие на ген *TaMDC1*, кодиращ пшеничен цистатин е доказан за 65 от тях. PCR продукт с очаквания размер липсва при отрицателната нетрансформирана контрола *Arabidopsis*. Използването на PCR анализ позволява бързо и ефективно потвърждаване интегрирането на *TaMDC1* в генома на *A. thaliana*.

#### Селекция на хомозиготни линии *Arabidopsis*, носещи единично копие на ген *TaMDC1*

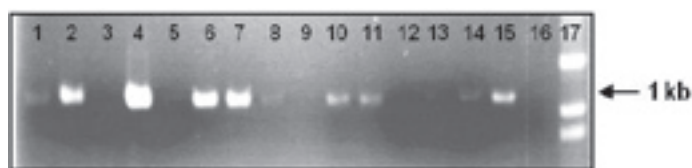
Селекцията на хомозиготни линии е направена чрез генетичен анализ на разпадането по признака устойчивост на канамицин на растенията от поколение  $T_2$  и отбор на линии с единично копие на *TaMDC1*. От общо 27 анализирани  $T_2$  линии, при 15 е установено разпадане по признака устойчивост към канамицин в съотношение 3:1 (Таблица 1), което предполага интеграция на ген *TaMDC1* в единичен локус в генома на съответната линия. При останалите линии *Arabidopsis*, за които е отчетено различно съотношение, се предполага, че притежават 2 и повече копия на трансгена. Чрез метод хи квадрат ( $\chi^2$ ), при 8 от анализираните линии е доказано разпадане 15:1, предполагащо интеграция на *TaMDC1* в 2 локуса, а при останалите 4 линии съотношението е 64:1, съответващо на интеграция в 3 различни локуса.

Отборът на неразпадащи по признака устойчивост към канамицин хомозиготни линии *Arabidopsis* и проверка за разпадане в съотношение 3:1 в хетерозиготното потомство на избраните  $T_2$  линии с интегриран *TaMDC1* в един локус е повторен в  $T_3$  поколение. От анализираните 25 потомства на 7-те селектирани  $T_2$  линии, 7 са хомозиготни и показват 100% устойчивост на среда с канамицин, а останалите 18 показват разпадане по признака в съотношение 3:1, потвърждаващо интеграцията на гена в единичен локус (Таблица 2). За период от 12-14 месеца са получени хомозиготни линии *Arabidopsis* в поколение  $T_3$ .

#### Устойчивостта на линии *Arabidopsis* с интегриран *TaMDC1* ген, към фитопатогенната гъба *F. oxysporum*

Антигъбната активност на пшеничен цистатин *TaMDC1* е изследвана в поколение  $T_3$  на отбрани линии *Arabidopsis* чрез заразяване с фитопатогенната гъба *F. oxysporum* (Фиг. 4). При инокулираните с патогена растения от хомозиготните линии *Arabidopsis*, носещи пшеничен цистатин *TaMDC1*, е отчетен нормален хабитус и темп на развитие, образуване на цветове, формиране на шушулки и семена. За разлика от тях, при заразените с *F. oxysporum* растения от контролната линия *Arabidopsis* е наблюдавано забавено развитие, пожълтяване на листата и неспособност за образуване на цветоносно стъбло. Получените резултати показват, че анализираните трансгенни линии проявяват по-висока степен на устойчивост към заразяване с патогена в сравнение с изходната линия.

Определянето на устойчивостта на линиите *Arabidopsis* към *F. oxysporum* чрез измерва-



**Фигура 3.** PCR анализ доказващ интегрирането на *TaMDC1* в генома на растения от поколение  $T_1$ , 1-15 – анализирани растения от поколение  $T_1$ ; 16 – изходна линия *Arabidopsis*; 17 - ДНК маркер

**Figure 3.** PCR amplification of the *TaMDC1* gene in  $T_1$  plants  
1-15 –  $T_1$  plants; 16 – wild type *Arabidopsis*; 17 – DNA ladder

**Таблица 1.** Генетичен анализ на разпадането по признака устойчивост към канамицин в T<sub>2</sub> поколение на линии *Arabidopsis* трансформирани с ген *TaMDC1*

**Table 1.** Genetic analysis of segregation ratios for kanamycin resistance in T<sub>2</sub> generation of *Arabidopsis* lines transformed with *TaMDC1* gene

T <sub>1</sub> растение	Наблюдавано разпадане		Очаквано разпадане		Менделово съотношение			χ <sup>2</sup>	P
	KmR**	KmS***	KmR	KmS	KmR:KmS	брой копия			
cys1-5	21	1	20,6	1,4	15:1	две	0,11	0,741	
cys3-1*	47	12	44,3	14,8	3:1	едно	0,68	0,408	
cys3-2	42	7	36,8	12,3	3:1	едно	3,00	0,083	
cys4-2*	38	9	35,3	11,8	3:1	едно	0,86	0,354	
cys4-3	45	4	45,9	3,1	15:1	две	0,31	0,580	
cys6-1	38	1	36,6	2,4	15:1	две	0,90	0,342	
cys6-4	49	13	46,5	15,5	3:1	едно	0,54	0,463	
cys7-3	54	4	54,4	3,6	15:1	две	0,04	0,839	
cys7-4	50	1	50,2	0,8	64:1	три	0,06	0,806	
cys8-1	50	6	52,5	3,5	15:1	две	1,90	0,168	
cys8-4	36	1	34,7	2,3	15:1	две	0,79	0,373	
cys9-3*	54	15	51,8	17,3	3:1	едно	0,39	0,532	
cys10-1	42	1	42,3	0,7	64:1	три	0,18	0,675	
cys11-2	44	11	41,3	13,8	3:1	едно	0,73	0,392	
cys11-10	28	10	28,5	9,5	3:1	едно	0,04	0,851	
cys11-12	52	15	50,3	16,8	3:1	едно	0,24	0,621	
cys11-14	25	1	24,4	1,6	15:1	две	0,26	0,613	
cys12-1	51	1	51,2	0,8	64:1	три	0,05	0,822	
cys12-9	39	1	37,5	2,5	15:1	две	0,96	0,327	
cys13-1	30	7	27,8	9,3	3:1	едно	0,73	0,393	
cys14-2*	41	14	41,3	13,8	3:1	едно	0,01	0,938	
cys14-6	52	1	52,2	0,8	64:1	три	0,04	0,837	
cys16-3	32	10	31,5	10,5	3:1	едно	0,03	0,859	
cys18-4	38	5	32,3	10,8	3:1	едно	4,10	0,043	
cys18-6*	29	13	31,5	10,5	3:1	едно	0,79	0,373	
cys19-7	37	13	37,5	12,5	3:1	едно	0,03	0,870	
cys21-3*	36	15	38,3	12,8	3:1	едно	0,53	0,467	

\*Линия с интеграция на *TaMDC1* в единичен локус, селектирана за следващи изследвания

\*\*KmR - брой растения устойчиви на канамицин

\*\*\*KmS - брой растения чувствителни на канамицин

не дължината на корените на растенията позволява графично представяне на получените резултати (Фиг. 5). Този подход е избран, тъй като гъбата е почвен патоген, който навлиза в

растенията през кореновата система. При всички анализирани трансгенни линии *Arabidopsis* е отчетено по-бързо нарастване на корените в сравнение с тези на контролните растения, кое-

**Таблица 2.** Разпадане по признака устойчивост към канамицин в съотношение 3:1 в T<sub>3</sub> поколение на избраните T<sub>2</sub> линии *Arabidopsis* с интеграция на ген *TaMDC1* в единичен локус чрез метод хи квадрат ( $\chi^2$ )  
**Table 2.** Segregation ratio 3:1 of kanamycin resistance in T<sub>3</sub> generation of the selected T<sub>2</sub> *Arabidopsis* lines with single locus integration of the *TaMDC1* gene

T <sub>2</sub> растение	Наблюдавано разпадане		Очаквано разпадане		$\chi^2$	P
	KmR**	KmS***	KmR	KmS		
cys-3-1-1	58	17	56.3	18.8	0.218	0.641
cys-3-1-2	39	8	35.3	11.8	1.596	0.207
cys-3-1-3*	48	0	36.0	12.0	16.000	0.000
cys-3-1-4	43	14	42.8	14.3	0.006	0.939
cys-4-2-1*	55	0	41.3	13.8	18.333	0.000
cys-4-2-2	50	14	48.0	16.0	0.333	0.564
cys-4-2-3	49	15	48.0	16.0	0.083	0.773
cys-4-2-4	47	11	43.5	14.5	1.126	0.289
cys-6-4-1	77	32	81.8	27.3	1.104	0.293
cys-6-4-4*	54	0	40.5	13.5	18.000	0.000
cys-9-3-1	22	12	25.5	8.5	1.922	0.166
cys-9-3-2	58	20	58.5	19.5	0.017	0.896
cys-9-3-3	56	14	52.5	17.5	0.933	0.334
cys-9-3-4*	68	0	51.0	17.0	22.667	0.000
cys-14-2-5*	38	0	28.5	9.5	12.667	0.000
cys-14-2-6	41	21	46.5	15.5	2.602	0.107
cys-14-2-7	58	27	63.8	21.3	2.075	0.150
cys-14-2-8	61	19	60.0	20.0	0.067	0.796
cys-18-6-1	37	15	39.0	13.0	0.410	0.522
cys-18-6-2	33	16	36.8	12.3	1.531	0.216
cys-18-6-3*	58	0	43.5	14.5	19.333	0.000
cys-21-3-1*	70	0	52.5	17.5	23.333	0.000
cys-21-3-2	28	9	27.8	9.3	0.009	0.924
cys-21-3-3	46	21	50.3	16.8	1.438	0.230
cys-21-3-4	15	4	14.3	4.8	0.158	0.691

\*Хомозиготна линия с интеграция на *TaMDC1* в единичен локус, селектирана за следващи изследвания

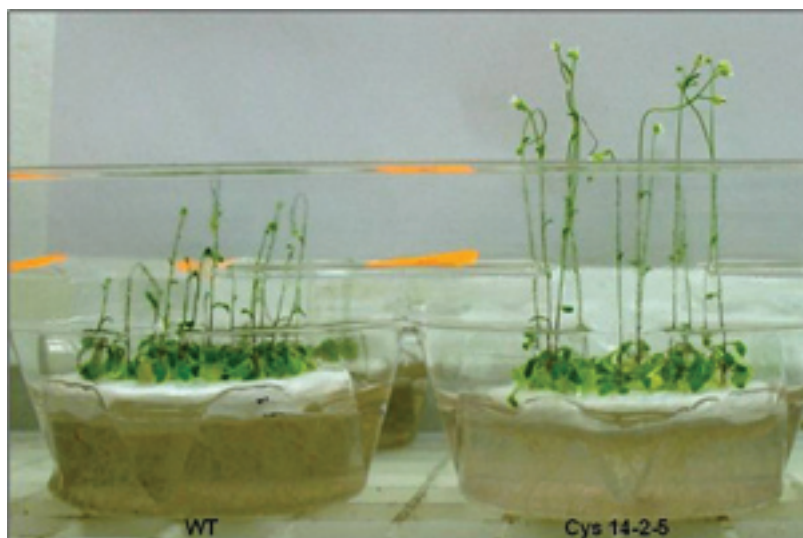
\*\*KmR - брой растения устойчиви на канамицин

\*\*\*KmS - брой растения чувствителни на канамицин

то показва по-висока степен на устойчивост към заразяване с *F. oxysporum* спрямо изходната линия. Най-устойчиви към патогена са растенията от линии Cys 9-3-4, Cys 14-2-5 и Cys 18-6-3. Те са отбрани за по-детайлни изследвания и проследяване унаследяването на устойчивостта в следващото поколение. Резултатите от проуч-

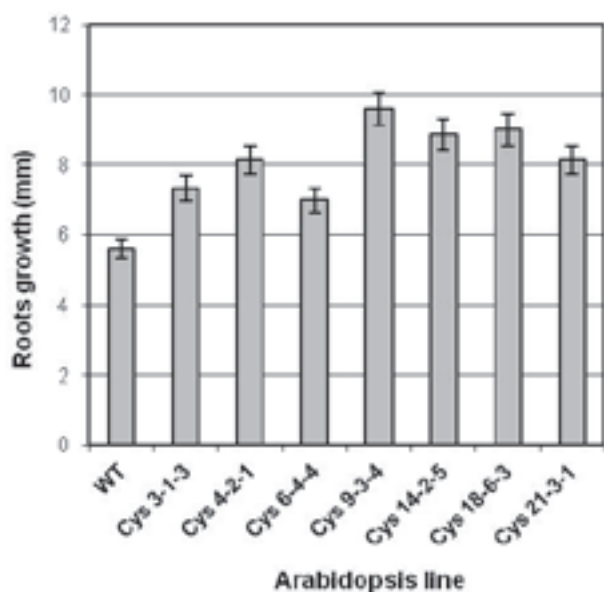
ването показват, че интегрирането на пшеничен цистатин *TaMDC1* в генома на *A. thaliana* повишава устойчивостта на получените линии към фитопатогенната гъба *F. oxysporum*.

Настоящото изследване потвърждава способността на растителните цистатини да потискат развитието на *F. oxysporum*, което е установено в



**Фигура 4.** Инокулиране на растения *Arabidopsis* от контролната линия (WT) и трансгенна линия Cys 14-2-5 с *F. oxysporum*

**Figure 4.** Inoculation of *Arabidopsis* plants from wild type (WT) and transgenic line Cys 14-2-5 with *F. oxysporum*



**Фигура 5.** Графично представяне на устойчивостта на линии *Arabidopsis*, 10 дни след инокулиране с *F. oxysporum*

**Figure 5.** Resistance of *Arabidopsis* lines to *F. oxysporum* 10 days after inoculation

*in vitro* условия за цистатини от ягода (Martinez et al., 2005) и ечемик (Carrillo et al., 2011). Доказването на антигъбни свойства на ечемичните цистатини след интегрирането им в генома на

*Arabidopsis* обаче е неуспешно, въпреки проявените инхибиращи свойства на пречистените протеини в условия *in vitro* (Carrillo et al., 2011). За разлика от тях, способността на пшеничният цистатин *TaMDC1* да потиска развитието на гъбни патогени е доказана както *in vitro*, така и *in vivo*. *TaMDC1* успешно потиска в *in vitro* условия развитието на причинителя на снежната плесен по житни култури с причинител *Microdochium nivale* (Christova et al., 2006), а при интегриране в генома на домати са доказани антигъбните му свойства *in planta* спрямо *B. cinerea* и *A. alternata* (Christova et al., 2018). Проведеното изследване е част от по-задълбочено проучване механизмите на антигъбното действие на фитоцистатините *in vivo* чрез използването на различни системи растение-патоген.

## ИЗВОДИ

Разработената моделна система може да бъде използвана за проучване влиянието на растителните цистатини върху развитието и патогенитета и на други фитопатогенни гъби. Получените резултати ще допринесат за изясняване на един недостатъчно добре проучен проблем, засягащ ролята на цистатините в защитните реакции на



растенията срещу гъбни патогени. В практически аспект, предложеният подход може да намери приложение за контрол на гъбни болести при икономически важни култури, чрез селекция на сортове с повишена експресия на ендогенните им цистатини.

## ЛИТЕРАТУРА

- Наков, Б., Каров, С., Попов, А., Нешев, Г. (1999). Специална фитопатология. *PSSA*, София
- Станчева, Й. (2000). Атлас на болестите по земеделските култури. 1. Болести по зеленчуковите култури. *PENSOFT*, София-Москва
- Станчева, Й. (2002а). Атлас на болестите по земеделските култури. 3. Болести по полските култури. *PENSOFT*, София-Москва
- Станчева, Й. (2002б). Атлас на болестите по земеделските култури. 4. Болести по техническите култури. *PENSOFT*, София-Москва
- Carrillo, L., Herrero, I., Cambra, I., Sánchez-Monge, R., Diaz, I. & Martínez, M. (2011). Differential in vitro and in vivo effect of barley cysteine and serine protease inhibitors on phytopathogenic microorganisms. *Plant Physiol Biochem.* 49(10), 1191-1200
- Cheng, M.-L., Tzen, J.T.C., Shyu, D.J.H. & Chou, W.-M. (2014). Functional characterization of the N-terminal and C-terminal domains of a sesame group II phytocystatin. *Botanical Studies* 55(1), 18-28
- Christova, P.K., Christov, N.K. & Imai, R. (2006). A cold inducible multidomain cystatin from winter wheat inhibits growth of the snow mold fungus, *Microdochium nivale*. *Planta* 223, 1207-1218
- Christova, P.K., Christov, N.K. Mladenov P.V. & Imai, R. (2018). The wheat multidomain cystatin TaMDC1 displays antifungal, antibacterial, and insecticidal activities in planta. *Plant Cell Rep.* 37(6), 923-932
- Cipriani, G., Fuentes, S., Ballo, V., Salazar, L.F., Ghislain, M. & Zhang, D.P. (2000). Transgene expression of rice cysteine proteinase inhibitor for the development of resistance against sweet potato feathery mottle virus. Program Report 1999-2000, International potato center, Lima, Peru: 267-271
- Clough, S.J. & Bent, A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 16, 735-743
- Dean, R., J.A. Van Kan, Z.A. Pretorius, K.E. Hammond-Kosack, A. Di Pietro, P.D. Spanu, J.J. Rudd, M. Dickman, R. Kahmann, J. Ellis and G.D. Foster (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.*, 13(4): 414-30
- Diop, N.N., Kidric, M., Repellin, A., Gareil, M., d'Arcy-Lameta, A., Thi, A.T.P. & Zuily-Fodil, Y. (2004). A multicystatin is induced by drought-stress in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) leaves. *FEBS Lett* 577, 545-50
- Gaddour, K., Vicente-Carbajosa, J., Lara, P., Isabel-Lamonedá, I., Díaz, I., & Carbonero, P. (2001). A constitutive cystatin-encoding gene from barley (*Icy*) responds differentially to abiotic stimuli. *Plant molecular biology*, 45(5), 599-608.
- Hines, M. E., Osuala, C. I., & Nielsen, S. S. (1991). Isolation and partial characterization of a soybean cystatin cysteine proteinase inhibitor of coleopteran digestive proteolytic activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 39(8), 1515-1520.
- Joshi, B.N., Sainani, M.N., Bastawade, K.B., Gupta V.S. & Ranjekar, P.K. (1998). Cysteine protease inhibitor from pearl millet: a new class of antifungal protein. *Biochem Biophys Res Commun* 246, 382-387
- Martinez, M., Lopez-Solanilla, E., Rodriguez-Pelanzuela, P., Carbonero P. & Diaz, I. (2003). Inhibition of plant-pathogenic fungi by the barley cystatin Hv-CPI (gene *Icy*) is not associated with its cysteine-proteinase inhibitory properties. *Mol Plant Microbe Interact* 16, 876-83
- Martinez, M., Abraham, Z., Gambardella, M., Echaide, M., Carbonero P. & Diaz, I. (2005). The strawberry gene *Cyf1* encodes a phytocystatin with antifungal activity. *J Exp Bot* 56, 1821-1829
- Meinke, D.W., Cherry, J.M., Dean, C., Rounsley, S.D. & Koornneef, M. (1998). *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science* 282, 679-682
- Munger, A., Coenen, K., Cantin, L., Goulet, Ch., Vailancourt, L.-P., Goulet, M.-C., Tweddell, R., Sainsbury, F. & Michaud, D. (2012). Beneficial 'unintended effects' of a cereal cystatin in transgenic lines of potato, *Solanum tuberosum*. *BMC Plant Biology* 12, 198-209
- Navas-Cortes, J.A., Hau, B. & Jimenez-Diaz, R.M. (2000). Yield loss in chickpeas in relation to development of Fusarium wilt epidemics. *Phytopathology* 90, 1269-1278
- Nganje, W.E., Bangsund, D.A., Leistriz, F.L., Wilson, W.W. & Tiapo, N.M. (2002). Estimating the economic impact of a crop diseases: the case Fusarium head blight in U.S. wheat and barley. *National Fusarium head blight forum proceeding*, East Lansing: Michigan State University, 275-281
- Pernas, M., Lopez-Solanilla, E., Sanches-Monge, R., Salcedo, G. & Rodrigues-Palenzuela, P. (1999). Antifungal activity of a plant cystatin. *MPMI* 12, 624-627
- Pernas, M., Sanchez-Monge, R. & Salcedo, G. (2000). Biotic and abiotic stress can induce cystatin expression in chestnut. *FEBS Lett* 467, 206-10
- Pirovani, C.P., Santiago, A. da S., dos Santos, L.S., Micheli, F., Margis, R., Gesteira, A. da S., Alvim, F.C., Pereira, G.A.G. & Cascardo, J.C. de M. (2010). *Theobroma cacao* cystatins impair *Moniliophthora perniciosa* mycelial growth and are involved in postponing cell death symptoms. *Planta* 232(6), 1485-97

- Popovic, M.M., Balajic, A., Ristic, D., Krstic, B., Jankov, M.J. & Gavrovic-Jankulovic, M.** (2012). *In vitro* and *in vivo* antifungal properties of cysteine protease inhibitor from green kiwifruit. *J Sci Food Agric* 92, 3072-3078
- Purwar, S., Marla, S. S., Singh, U. S., & Kumar, A.** (2010). Basal expression studies of cystatins during specific growth stages of wheat spikes for defining their possible role in differential and stage dependent immunity against Karnal bunt (*Tilletia indica*). *Molecular biology reports*, 37(3), 1377-1389.
- Salmia, M. A.** (1980). Inhibitors of endogenous proteinases in Scots pine seeds: fractionation and activity changes during germination. *Physiologia Plantarum*, 48(2), 266-270.
- Senthilkumar, R., Cheng, C. P., & Yeh, K. W.** (2010). Genetically pyramiding protease-inhibitor genes for dual broad-spectrum resistance against insect and phytopathogens in transgenic tobacco. *Plant biotechnology journal*, 8(1), 65-75.
- Smyth, D.R.** (1990). *Arabidopsis thaliana*: a model plant for studying the molecular basis of morphogenesis. *Australian Journal of Plant Physiology* 17, 323-331
- Soares-Costa, A., Beltramini, L. M., Thiemann, O. H., & Henrique-Silva, F.** (2002). A sugarcane cystatin: recombinant expression, purification, and antifungal activity. *Biochemical and biophysical research communications*, 296(5), 1194-1199.
- Simova-Stoilova, L., Vaseva, I., Grigorova, B., Demirevska, K. & Feller, U.** (2010). Proteolytic activity and cysteine protease expression in wheat leaves under severe soil drought and recovery. *Plant Physiology and Biochemistry* 48, 200-206
- Sugawara, H., Yoshioka, T., Hashiba, T. & Satoh, S.** (2002). Antifungal activity of a recombinant carnation cystatin, rDC-CPI. *Plant Biotechnology* 19, 207-209
- Urwin, P.E., Lilley, C.J., McPherson, M.J. & Atkinson, H.J.** (1997). Resistance to both cyst and root-knot nematodes conferred by transgenic *Arabidopsis* expressing a modified plant cystatin. *Planta J* 12, 455-461.
- Valdes-Rodriguez, S., Cedro-Tanda, A., Aguilar-Hernandez, V., Cortes-Onofre, E., Blanco-Labra, A. & Guerrero-Rangel, A.** (2010). Recombinant amaranth cystatin (AhCPI) inhibits the growth of phytopathogenic fungi. *Plant Physiol. Biochem.* 48, 469-475.