

УДК 577.21

ФИТОПАТОГЕН *PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM* ИСПОЛЬЗУЕТ АППАРАТ СЕКРЕЦИИ III ТИПА ДЛЯ БЛОКИРОВАНИЯ СИСТЕМНОГО ЗАЩИТНОГО ОТВЕТА РАСТЕНИЯ-ХОЗЯИНА**Е.А. Николайчик, Л.Л. Хомская, Е.И. Игнатенко***Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь*

Бактерии *Pectobacterium carotovorum* (*Pca*; синоним – *Erwinia carotovora*) являются некротрофным патогеном картофеля *Solanum tuberosum*, вызывающим мягкую гниль его клубней – заболевание, способное нанести значительный урон урожаю при его хранении. Кроме того, бактерии многих штаммов *Pca* способны также вызывать другое заболевание – "черную ножку" – и у вегетирующих растений картофеля.

Традиционно развитие мягких гнилей связывают с продукцией и секрецией фитопатогеном набора экзоферментов, деполимеризующих клеточную стенку растения, в первую очередь различных пектиназ и целлюлаз. Бактерии *Pca* штамма 3-2, являющиеся объектом настоящего исследования, также секретируют как минимум 5 пектаттиаз [1], пектинметилэстеразу, полигалактуроазу и целлюлазу, которые необходимы для мацерации тканей растения, что приводит к развитию симптомов мягкой гнили. Продукция экзоферментов клетками *Pca* четко зависит от плотности популяции патогена и, как правило, находится на низком базальном уровне при количестве клеток патогена менее 10^8 в одном см^3 , что связано с транскрипционным контролем через регуляторы *ExpRI* [2,3]. Тем не менее, деполимеразы клеточных стенок растений при всей их важности не являются факторами вирулентности данного патогена, определяющими начальные стадии заражения растения-хозяина. Считается, что бактерии *Pca* не способны инфицировать здоровые клубни картофеля, а естественным путем проникновения этого патогена в клубень являются механические повреждения его поверхности (вредителями, при уборке, транспортировке и т.д.) [4]. В любом случае через раневое повреждение в клубень попадает, как правило, относительно небольшое число клеток, и на начальной стадии инфекции их концентрация является явно недостаточной для индукции деполимераз. С другой стороны, растение реагирует и на раневое повреждение, и на внедрение патогена активацией определенных защитных механизмов, призванных ограничить распространение потенциально присутствующих в раневой зоне патогенов [4]. Соответственно, успешный патоген должен иметь механизмы противодействия защитной реакции растения. Одним из вариантов такого противодействия могло бы быть блокирование сигнальных каскадов растения, приводящих к индукции защитного ответа.

Ранее нами было показано, что бактерии *Pca* используют аппарат системы секреции III типа (ССТТ) для доставки одного из своих факторов вирулентности, белка *DspE*, непосредственно в клетки растений [5]. Транспорт этого белка в клетки устойчивых растений приводит к индукции реакции гиперчувствительности (РГ), ограничивающей дальнейшее распространение патогена, что позволяет отнести *DspE* к классу *Avr*-белков. Несмотря на то, что функция белка *DspE* бактерий *Pca* при их взаимодействии с растением-хозяином четко не продемонстрирована, можно предполагать по аналогии с другими изученными *Avr*-белками [6], что при совместимом взаимодействии с чувствительным растением *DspE* каким-то образом меняет метаболизм клетки растения в пользу патогена, скорее всего нарушая работу сигнальных цепей, запускающих защитные реакции. Инактивация гена *dspE* у родственных бактерий *Erwinia amylovora* и *Pectobacterium atrosepticum* действительно приводит к снижению их вирулентности [7,8], что подтверждает необходимость этого белка для успешной инфекции растения патогеном.

Интересно, что инактивация всей ССТТ оказывает практически тот же эффект на исход взаимодействия бактерий *Pca* с устойчивыми растениями (отсутствие индукции

РГ), что и инактивация только гена *dspE*. С другой стороны, эффект от инактивации всей ССТТ на взаимодействие с вегетирующими растениями картофеля был значительно менее выраженным и существенно зависел от использованного сорта [9]. Таким образом, вопрос о конкретной роли белка DspE, равно как и всей ССТТ, во взаимодействии с растением-хозяином остается до настоящего времени открытым.

В этой связи целью настоящей работы являлось выяснение возможности участия ССТТ бактерий *Pca* и известных белков, транспортирующихся через этот секреторный аппарат, на начальных этапах заражения клубней картофеля через раневое повреждение.

Методы исследования

В работе использовали клубни картофеля сорта "Журавинка", а также штамм *Pectobacterium carotovorum* JN42 (производный от выделенного в Беларуси штамма *Pca* 3-2) с интактной ССТТ и четыре его мутантных производных (таблица 1).

Бактерии выращивали в бульоне LB при температуре 28 °С. Для заражения клубней картофеля использовали бактериальные культуры в логарифмической фазе роста, выращенные в условиях интенсивной аэрации. Количество клеток в культурах контролировали по их оптической плотности, а также путем высева разведений культур на питательный агар. Поверхностно стерилизованные клубни картофеля сорта "Журавинка" заражали путем введения при помощи автоматической пипетки 20 мкл суспензий в питательном бульоне определенного количества клеток *Pca*. Зараженные клубни помещали в полиэтиленовые пакеты и выдерживали при 28 °С. Через 48 часов для каждого клубня определяли массу пораженной мягкой гнилью ткани, а также отбирали два образца для выделения РНК: один на границе с пораженным участком, второй – из непораженной части клубня, максимально удаленной от места инокуляции.

Таблица 1 – Штаммы *Pectobacterium carotovorum*

Штамм	Генотип	Источник/ссылка
JN42	3-2 Rif ^r , Cm ^r , Tn9	Коллекция кафедры микробиологии БГУ
JN502	JN42 <i>hrpN</i> ::pJP5603	[10]
HW1	JN42 <i>hrpW</i> :: $\square^{Sp/Sm}$	[11]
VKE	JN42 <i>dspE</i> ::pJP5603	[5]
TA5	JN42 <i>hrpL</i> :: $\square^{Sp/Sm}$	[12]

Тотальную РНК из клеток клубня картофеля выделяли по описанной ранее методике [13], обрабатывали ДНКазой I (Fermentas), и использовали для синтеза кДНК с использованием обратной транскриптазы М-MLV (Promega) согласно рекомендациям производителей. После термической инактивации обратной транскриптазы препарат кДНК разводили в три раза буфером ТЕ. В качестве матрицы для количественной ПЦР (кПЦР) использовали 1 мкл разведенного препарата кДНК.

кПЦР проводили на амплификаторе РТС200 с модулем детекции продуктов в режиме реального времени Chromo4 (Bio-Rad). Для определения уровней экспрессии генов растений использовали следующие праймеры (5'→3'): GGGAGAAGCCAAACTACAACSTATG и TTGCATGAAATGAACCACCATCC (ген *PR-1*), AATAAGCCATCATGCCACAACG и GCAGTATTCGGACCCATCCC (ген *PR-3*), ATTTGAGGTCCATAACAACGTGCC и GCAATTAGTACGACCCCAAATAC (ген *PR-5*), GCAACTGCATTTTCCAAATCATC и CACGTAGAAATTGACSTTGTAGG (ген *HIN1*), TTGATGCTCTTGACCAGATTAACG и ACGGGCACAGTTCCAATACC (*EF-1 α*). Реакции осуществляли в стандартном буфере (Sigma #P-2192) с 2.5 ед. Taq-полимеразы на 100 мкл реакционной смеси, содержащей каждый праймер в концентрации 0.2 мкМ, дНТФ – по 0.1 мМ, а также интеркалирующий краситель SYBR Green I (Sigma) и референсный краситель ROX (ПраймТех) в рекомендованных производителями концентрациях. Продукты реакции детектировались в ходе 45 циклов чередующихся температур 94 °С (10 сек) и

60 °С – 60 сек. Расчеты уровня экспрессии генов проводили следующим образом. Определяли разницу значений (ΔC_t) пороговых циклов (C_t) для исследуемого гена (одного из *PR*-генов) и конститутивно экспрессирующегося гена *EF1a*. Из полученных значений ΔC_t выбирали минимальное $\min(\Delta C_t)$ и вычитали его величину из всех остальных. Относительное число копий мРНК $N(\text{мРНК})$ определяли по формуле $N(\text{мРНК})=2^{(\Delta C_t - \min(\Delta C_t))}$

Результаты и обсуждение

Основными факторами, благоприятствующими инфекции клубней картофеля бактериями *Pca*, являются раневое повреждение клубня, анаэробноз и доступность несвязанной воды [4]. При соблюдении этих условий мягкая гниль может быть индуцирована относительно небольшим количеством клеток *Pca*. В условиях наших экспериментов стабильное развитие мягкой гнили на вторые сутки после заражения клубней наблюдалось при введении более 10^4 клеток в одной инъекции. Сравнение эффективности заражения клубней бактериями *Pca* дикого типа и мутантами с инактивированной ССТТ показало, что при большом количестве (более 10^5 клеток) активная ССТТ не требуется для успешного развития заболевания. Тем не менее, при минимальном количестве клеток патогена, достаточном для успешного заражения, наблюдается четкая разница в развитии мягкой гнили – инактивация ССТТ снижает мацерационную активность патогена в 2.5 раза (табл.2).

Таблица 2 – Масса пораженных мягкой гнилью тканей клубней картофеля, инокулированных суспензиями клеток *Pca*

Клеток на инъекцию	JN42	TA5
$6 \cdot 10^6$	1,97±0,07	1,94±0,07
$6 \cdot 10^5$	1,03±0,16	1,02±0,13
$6 \cdot 10^4$	0,50±0,22	0,19±0,04
$6 \cdot 10^3$	0,03±0,00	0,03±0,01

Приведены средние значения трех измерений с 95%-ным доверительным интервалом.

ССТТ используется бактериальными патогенами эукариот для доставки белковых факторов вирулентности из клетки бактерии в клетку хозяина (или в межклеточное пространство), что модифицирует протекание процессов взаимодействия двух организмов в пользу патогена. Сниженная вирулентность *hrpL*-мутанта (штамм TA5) с инактивированной ССТТ может быть связана с его неспособностью транспортировать один или несколько субстратов ССТТ к месту их действия в организме растения. В наших предшествующих работах по исследованию факторов вирулентности штамма 3-2 бактерий *Pca* было выявлено три белка, транспортируемых через ССТТ. К их числу принадлежат харпин HrpW, эффективно секретируемый в межклеточное пространство [14], эффекторный белок DspE, доставляемый в клетки растений [5], а также HrpJ – потенциальный хелперный компонент ССТТ, локализованный на внешней поверхности бактериальной клетки [15]. Секрецию еще одного потенциального субстрата ССТТ из класса харпинов, белка HrpN, нам детектировать не удалось, но эффективная секреция клетками *Pca* гетерологичного харпина HrpN_{Еа} [10] и данные литературы по секреции харпинов другими бактериями не позволяют исключить HrpN_{Рса} из числа потенциальных субстратов ССТТ.

Для проверки участия различных субстратов ССТТ на ранних стадиях взаимодействия с растениями-хозяевами клубни картофеля были инфицированы малым количеством ($6 \cdot 10^4$) клеток *Pca* дикого типа и мутантных по генам соответствующих эффекторных белков (табл. 3).

В этом эксперименте также наблюдалась четкая разница в степени развития заболевания при использовании различных штаммов *Pca*. Инактивация всей ССТТ у

мутанта по гену транскрипционного активатора *hrpL* привела к двухкратному (по сравнению со штаммом дикого типа) снижению массы пораженной ткани. Инактивация генов, кодирующих отдельные субстраты ССТТ, также снизила вирулентность мутантных штаммов, но в разной степени: мутант по гену эффектора (*dspE*) был близок к регуляторному мутанту, инактивация же генов харпинов (*hrpN* и *hrpW*) имела значительно меньший эффект. Таким образом, из белковых субстратов, транспортируемых через эту секреторную систему, наиболее важным для патогена оказался DspE, а инактивация генов харпинов имела минимальный эффект на вирулентность. Следует отметить, что скорость роста в питательном бульоне и пектолитическая активность при культивировании *in vitro* бактерий всех использованных в работе штаммов *Pca* существенно не отличались, что позволяет связывать наблюдаемое снижение мацерировочной активности с инактивацией ССТТ или с отсутствием отдельных субстратов этой секреторной системы.

Таблица 3 – Степень поражения мягкой гнилью клубней картофеля, зараженных бактериями *P. carotovorum* дикого типа и мутантами по компонентам ССТТ

штамм (инактивированный ген)	масса пораженной ткани, г
<i>Pca</i> 3-2 (дикого типа)	0,81±0,06
TA5 (<i>hrpL</i>)	0,46±0,09
JN502 (<i>hrpN</i>)	0,76±0,19
HW-1 (<i>hrpW</i>)	0,68±0,14
VKE (<i>dspE</i>)	0,53±0,13

Одной из причин снижения мацерировочной активности мутантных штаммов *Pca* могло быть изменение реакции растения на контакт с мутантным патогеном. Оценка защитных реакций растения на инфекцию различными штаммами *Pca* была проведена путем измерения методом кПЦР уровней экспрессии *PR*-генов, индукция которых коррелирует с запуском различных сигнальных путей при контакте с патогеном. В этих экспериментах была выявлена сильная индукция двух *PR*-генов, *PR-3* и *PR-5*, тогда как индукции *PR-1* не наблюдалось, а индукция гена *HIN1* (маркера PG) была незначительной. В клубнях, зараженных бактериями *Pca* дикого типа, на границе с пораженной тканью наблюдалось десятикратное увеличение количества мРНК *PR-3*. Экспрессия *PR-5* в неинфицированных клубнях не детектировалась, а количество транскриптов этого гена в клубнях, инфицированных бактериями *Pca* дикого типа, более чем в пять раз превышало количество транскриптов *PR-3* (рисунок). При заражении клубней мутантными бактериями уровень экспрессии *PR*-генов оказался несколько более высоким, в особенности для *PR-3* (в 3-7 раз). Еще более существенной оказалась разница в экспрессии *PR-3* и *PR-5* в непораженной части клубней, инокулированных бактериями разных штаммов *Pca*: при заражении бактериями дикого типа уровень экспрессии *PR-5* был в 23 раза, а *PR-3* – в 173 раз ниже, чем в клетках, прилегающих к пораженной зоне клубня (рисунок). В то же время уровень экспрессии *PR*-генов в интактной части клубней, зараженных мутантными штаммами, был значительно выше. Так, мутация регуляторного гена *hrpL* (т.е. полная инактивация ССТТ) усиливала экспрессию *PR-3* и *PR-5* до того же уровня, что и в зоне непосредственного контакта с патогеном. Мутация гена *dspE*, кодирующего основной эффекторный белок бактерий *Pca*, имела идентичный *hrpL*-мутации эффект на экспрессию гена *PR-5* (т.е. поднимала ее до того же уровня, что и в клетках, контактирующих с патогеном). Экспрессия же гена *PR-3* в клетках клубней картофеля, удаленных от зоны поражения *dspE*-мутантом, была в 30 раз выше, чем при использовании штамма дикого типа, но все равно в 12 раз ниже, чем в зоне контакта с патогеном. Инактивация гена *hrpN* имела значительно меньший эффект: экспрессия генов *PR-5* и *PR-3* усиливалась примерно в 3 раза, т.е. в обоих случаях оставалась значительно более низкой, чем в сайте инфекции.

Контакт растений с патогеном может индуцировать целый ряд защитных реакций, как локальных в клетках, непосредственно контактирующих с патогеном, так и системных

в клетках растения, удаленных от очага инфекции. Индукция системных защитных реакций зависит от синтеза в контактирующих с патогеном клетках низкомолекулярных медиаторов и их распространения по растению. К числу таких медиаторов системного ответа относятся этилен, жасмоновая кислота и салициловая кислота. Конечные изменения метаболизма клеток растения в ходе локального и системного ответа существенно различаются, однако индукция экспрессии *PR*-генов происходит в обоих случаях.

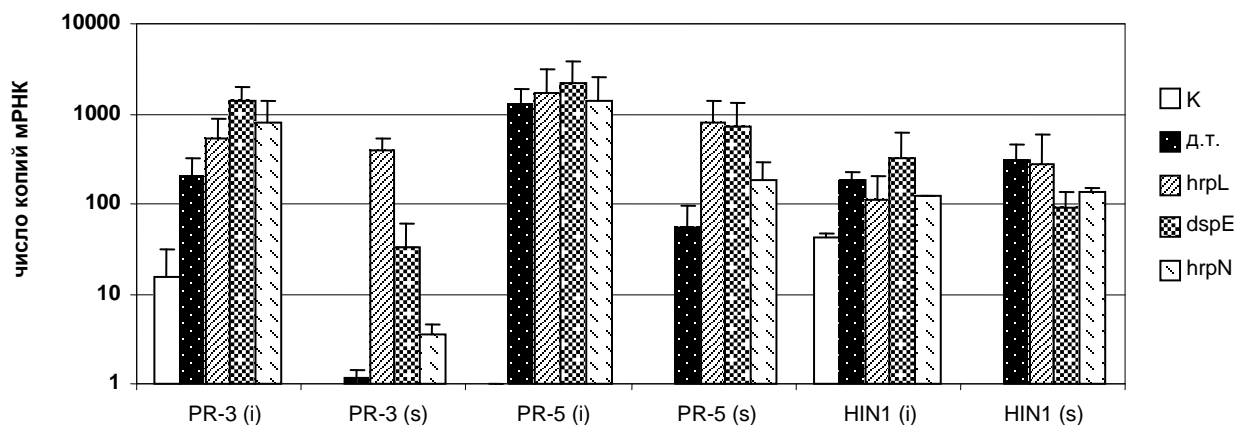


Рисунок – Индукция экспрессии *PR*-генов в клетках инфицированных бактериями *Pectobacterium carotovorum* клубней *Solanum tuberosum* на границе с очагом инфекции (i) и на максимальном удалении от него (s)

Представлены средние значения трех измерений относительного числа копий мРНК со стандартным отклонением. В клубни введен буферный раствор (K), бактерии *Pca* дикого типа (д.т.) или мутантные по генам ССТТ (*hrpL*, *dspE* и *hrpN*)

Полученные нами данные указывают на роль ССТТ бактерий *Pca* в супрессии системных защитных реакций растений картофеля и позволяют предположить следующую модель взаимодействия патогена с хозяином в ходе развития мягкой гнили картофеля. При проникновении бактерий *Pca* через поверхностные барьеры клубня (обычно через рану) в клетках растения, непосредственно контактирующих с патогеном, происходит индукция локального защитного ответа (о чем свидетельствует резкое повышение уровня экспрессии *PR*-генов). Инактивация ССТТ оказывает лишь незначительное влияние на развитие защитной реакции в клетках, непосредственно контактирующих с патогеном. Это свидетельствует в пользу того, что ССТТ и ее субстраты при инфекции растений-хозяев (в отличие от инфекции устойчивых растений) не играют существенной роли в индукции защитных реакций растения. По имеющимся в литературе данным такими индукторами могут быть, например, флагеллин [16] или олигогалактуронаты-промежуточные продукты деградации пектина клеточной стенки растения [17,18]. Последовательность событий, ведущих к индукции защитных реакций в клетке растения при детекции флагеллина хорошо изучена [19], и детекция многих других индукторов происходит по той же схеме. Непосредственное распознавание индуктора осуществляет мембранный рецептор, активирующий киназный каскад, что приводит к фосфорилированию и активации транскрипционных факторов, ответственных за изменение экспрессии генов, кодирующих ключевые белки защитного ответа растений [20]. К числу таких белков относятся *PR*-белки, регуляторы программируемой гибели клеток, ферменты, ответственные за генерацию активных форм кислорода, модификацию клеточной стенки, а также за синтез медиаторов системного защитного ответа. В частности, одной из мишеней для активируемых патогенами киназных каскадов является ключевой фермент биосинтеза этилена [21], а этилен является одним из индукторов системного защитного ответа, генерируемым при инфекции некротрофными патогенами.

У растений картофеля бесклеточные препараты элиситоров, продуцируемых бактериями *Pca*, способны активировать этилен- и жасмонатзависимую системную индукцию *PR*-генов [22]. К настоящему времени у растений описано значительное количество компонентов таких сигнальных каскадов и очевидно, что сигнальные цепочки (или по крайней мере конечные киназы), ответственные за индукцию локального и системного защитного ответа могут различаться.

После запуска системных защитных реакций при попытке патогена распространиться за пределы очага первичной инфекции основным препятствием для него будут соседние клетки с укрепленными за счет отложения каллозы и лигнификации клеточными стенками, активно синтезирующие и секретирующие антибактериальные белки-продукты *PR*-генов. Приведенные в настоящей работе данные показывают, что бактерии дикого типа способны блокировать развитие системного защитного ответа, и это их свойство зависит от присутствия в их клетках функциональной ССТТ. Инактивация ССТТ снимает блок системного защитного ответа, что, естественно, ограничивает увеличение зоны поражения (и снижало массу мацерированной ткани в наших экспериментах). По нашим данным важную роль в супрессии системного защитного ответа растения-хозяина играют два белковых субстрата ССТТ: хелпер HrpN и особенно эффектор DspE. Эффекторный белок DspE, очевидно, является основным фактором, транспорт которого посредством ССТТ в клетки картофеля приводит к блокированию системного защитного ответа и успешному распространению патогена по растению. Хелперный белок HrpN участвует в транслокации DspE в клетки растений [11], поэтому вероятно, что наблюдаемое у *hrpN*-мутанта ослабление способности супрессировать системный защитный ответ растения связано со сниженной в несколько раз эффективностью доставки DspE клетками *hrpN*-мутанта к месту предполагаемого действия этого эффектора.

Многие эффекторный белки фитопатогенов способны взаимодействовать с компонентами сигнальных каскадов в клетках растений. Для белка DspE бактерий *Erwinia amylovora* показана способность связываться с несколькими мембранными рецепторными киназами в клетках яблони [23]. Можно предположить, что аналогичное взаимодействие в клетках картофеля способно нарушить сигнальный каскад, приводящий к синтезу медиаторов системного ответа, что будет способствовать успешной пролиферации патогена в организме растения.

Список литературы

1. Shevchik, V.E., Evtushenkov, A.N., Babitskaya, H.V. & Fomichev, Y.K. Production of pectolytic enzymes from *Erwinia* grown on different carbon sources. // World Journal of Microbiology & Biotechnology. - 1992. - V.8. - P.115-120.
2. Sjoblom, S., Brader, G., Koch, G. & Palva, E.T. Cooperation of two distinct ExpR regulators controls quorum sensing specificity and virulence in the plant pathogen *Erwinia carotovora*. // Mol Microbiol. - 2006. - V.60. - P.1474-1489.
3. Pirhonen, M., Flego, D., Heikinheimo, R. & Palva, E.T. A small diffusible signal molecule is responsible for the global control of virulence and exoenzyme production in the plant pathogen *Erwinia carotovora*. // EMBO J. - 1993. - V.12. - P.2467-2476.
4. Perombelon, M.C.M. Potato diseases caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis. // Plant Pathology. - 2002. - V.51. - P.1-12.
5. Николайчик, Е.А. *et al.* Транслокация белка DspE фитопатогенными бактериями *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* в клетки *Nicotiana tabacum* и его необходимость для индукции реакции гиперчувствительности. // Докл. НАН Беларуси. - 2005. - Т.49. - С.81-85.
6. Göhre, V. & Robatzek, S. Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. // Annu. Rev. Phytopathol. - 2008. - V.46. - P.189-215.

7. Gaudriault, S., Malandrin, L., Paulin, J.P. & Barny, M.A. DspA, an essential pathogenicity factor of *Erwinia amylovora* showing homology with AvrE of *Pseudomonas syringae*, is secreted via the Hrp secretion pathway in a DspB-dependent way. // *Mol Microbiol.* - 1997. - V.26. - P.1057-1069.
8. Holeva, M.C. *et al.* Use of a pooled transposon mutation grid to demonstrate roles in disease development for *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* putative type III secreted effector (DspE/A) and helper (HrpN) proteins. // *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI.* - 2004. - V.17. - P.943-950.
9. Ageichik, A.V., Evtushenkov, A.N. & Nikolaichik, Y.A. The role of type III secretion system in *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* virulence. // *Plant Protection Science.* - 2002. - V.38. - P.553-558.
10. Николайчик, Е.А., Лагоненко, А.Л., Валентович, Л.Н., Присяженко, О.К. & Евтушенков, А.Н. Сравнительная характеристика харпинов HrpN *Erwinia carotovora* и *Erwinia amylovora*. // Докл. НАН Беларуси. - 2007. - Т.51. - С.82-86.
11. Николайчик, Е.А. *et al.* Анализ роли внеклеточных компонентов системы секреции III типа *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* в транслокации белковых факторов вирулентности бактерий в клетки растений. // Труды Белорусского государственного университета. Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. - 2007. - Вып. 2.- С.200-213.
12. Николайчик, Е.А. *et al.* Молекулярные механизмы взаимодействия фитопатогенных бактерий *Erwinia* с растениями. // Вестник БГУ. Сер.2. - 2006. - №.3 - С.60-64.
13. Присяженко, О.К., Николайчик, Е.А. & Евтушенков, А.Н. Экспрессия гена харпина *hrpN* *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* в растениях табака индуцирует гены устойчивости. // Докл. НАН Беларуси. - 2007. - Т.51, №5. - С. 85-89
14. Лагоненко, А.Л., Николайчик, Е.А. & Евтушенков, А.Н. Характеристика харпина HrpW бактерий *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. // Докл. НАН Беларуси. - 2006. - Т.50. - С.70-73.
15. Лагоненко, А.Л., Овчинникова, Т.В., Николайчик, Е.А. & Евтушенков, А.Н. Характеристика белка HrpJ, компонента системы секреции III типа бактерий *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. // Докл. НАН Беларуси. - 2004. - Т.48. - С.74-78.
16. Li, X. *et al.* Flagellin induces innate immunity in nonhost interactions that is suppressed by *Pseudomonas syringae* effectors. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2005. - V.102. - P.12990-12995.
17. Palva, T.K., Holmstrom, K.O., Heino, P. & Palva, E.T. Induction of plant defense response by exoenzymes of *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*. // *Mol Plant Microbe Interact.* - 1993. - V.6. - P.190-196.
18. Vidal, S., Eriksson, A.R.B., Montesano, M., Denecke, J. & Palva, E.T. Cell wall-degrading enzymes from *Erwinia carotovora* cooperate in the salicylic acid-independent induction of a plant defense response. // *Molecular Plant-Microbe Interactions.* - 1998. - V.11. - P.23-32.
19. Asai, T. *et al.* MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. // *Nature.* - 2002. - V.415. - P.977-983.
20. Pedley, K.F. & Martin, G.B. Role of mitogen-activated protein kinases in plant immunity. // *Current Opinion in Plant Biology.* - 2005. - V.8. - P.541-547.
21. Liu, Y. & Zhang, S. Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in *Arabidopsis*. // *Plant Cell.* - 2004. - V.16. - P.3386-3399.
22. Montesano, M., Brader, G., de Leon, I.P. & Palva, E.T. Multiple defence signals induced by *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* elicitors in potato. // *Mol. Plant Pathol.* - 2005. - V.6. - P.541-549.
23. Meng, X., Bonasera, J.M., Kim, J.F., Nissinen, R.M. & Beer, S.V. DspE of *Erwinia amylovora* interacts with receptor kinases of apple. // *Acta Hort.* - 2002. - V.590. - P.463-466.