

**СИСТЕМНАЯ ИНДУКЦИЯ PR-ГЕНОВ РАСТЕНИЙ *SOLANUM LYCOPERSICUM* ПРИ КОНТАКТЕ С БАКТЕРИЯМИ *PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM*: РОЛЬ ГЕНА *dspE*****Е.А. Николайчик***Белорусский государственный университет, г. Минск, Беларусь***Введение**

*Pectobacterium carotovorum* (*Pca*) – фитопатогенные бактерии, вызывающие заболевания многих растений, в том числе важнейших сельскохозяйственных культур. Штамм *Pca* 3-2 был выделен из пораженных стеблей картофеля *Solanum tuberosum* [1]. При искусственном заражении бактерии этого штамма способны вызывать у *S. tuberosum* мягкую гниль клубней и “черную ножку” стеблей [2]. Растения томата *Solanum lycopersicum* не являются естественным хозяином для бактерий *Pca* 3-2, и обычным результатом их искусственного заражения этими бактериями является развитие реакции гиперчувствительности (РГ) – быстрой гибели клеток растения в месте контакта с патогеном.

Система секреции III типа (ССТТ) используется многими патогенами для доставки белков-эффекторов в клетки эукариот [3]. Считается, что эффекторы в клетках чувствительных растений так или иначе препятствуют активации иммунитета растения и таким образом способствуют его колонизации патогеном [4]. Однако устойчивые растения зачастую имеют механизмы детекции эффекторов патогенных организмов [5]. В таком случае появление эффектора внутри клетки (или же его контакт с поверхностным рецептором) устойчивого растения приводит к индукции РГ и, как правило, к развитию через некоторое время системной приобретенной резистентности (СПР), что делает растение более устойчивым к последующим контактам с тем же или другими патогенами, во многом благодаря активации транскрипции большого набора *PR*-генов [6].

Ранее нами было продемонстрировано, что бактерии *Pca* 3-2 обладают функциональной ССТТ и используют ее для доставки как минимум одного эффекторного белка, DspE, в клетки растений [7]. При инфицировании бактериями *Pca* 3-2 клубней картофеля белок DspE необходим для развития заболевания [8], а в растениях табака (*Nicotiana tabacum*), устойчивых к этому патогену, белок DspE необходим для индукции РГ [7].

Измерение уровней экспрессии ряда *PR*-генов в клетках клубней картофеля, пораженных бактериями *Pca* 3-2, позволило предположить вероятную роль ССТТ и эффекторных белков, доставляемых с ее помощью в клетки растений, в ходе взаимодействия этого патогена с растением-хозяином [8]. Экспрессия двух *PR*-генов, *PR-3* и *PR-5*, была сильно индуцирована в клетках клубня, непосредственно контактирующих с патогеном, но индуцирована значительно слабее в клетках, удаленных от места поражения мягкой гнилью. Синтез DspE и его доставка в клетки растений оказалась необходимой для блокирования экспрессии *PR*-генов в удаленных от места поражения клетках [8]. Таким образом, можно заключить, что доставка в клетки растений эффекторного белка DspE необходима для блокирования системного защитного ответа в организме растения-хозяина, что скорее всего необходимо для распространения бактерий *Pca* за пределы очага первичного поражения.

Растения томата являются устойчивыми к бактериям *Pca* 3-2, и одной из возможных причин такой устойчивости могут быть отличия в развитии защитных реакций, активируемых растением в ответ на контакт с патогеном. В этой связи целью настоящей работы было исследование индукции системного защитного ответа растений томата, сопровождающего развитие РГ при контакте с бактериями *Pca* дикого типа и мутантных по гену *dspE*, кодирующему основной эффекторный белок ССТТ этих бактерий.

### Материалы и методы

Растения *Solanum lycopersicum* сорта Доходный выращивали в условиях 16-часового светового дня при 23 °С без пересадки до фазы формирования 3 настоящих листьев. В работе были использованы два описанных ранее [7] штамма бактерий *Pca*: JN42 и VKE (*dspE*-мутант JN42); оба штамма являются производными природного изолята 3-2. Бактерии выращивали на плотной агаризованной питательной среде LB при 28 °С в течение 16-18 ч., после чего их смывали 0.85%-ным раствором NaCl. Количество клеток в полученных суспензиях выравнивали по их оптической плотности. Семядольные листья растений томата были инфильтрованы (при помощи одноразового шприца без иголки) полученными суспензиями клеток штаммов JN42 или VKE, а также не содержащим клеток 0.85%-ным раствором NaCl в качестве контроля. Образцы тканей растений массой примерно 100-150 мг для выделения РНК из неинфильтрованного (второго настоящего) листа для оценки развития защитных реакций отбирали через 24 часа после инфильтрации, тогда же оценивали интенсивность развития симптомов РГ. Для каждого варианта опыта отбиралось по три образца (с разных растений). РНК из отобранных образцов листьев томата выделяли горячим фенолом как описано в [9]. кДНК готовили с помощью обратной транскриптазы М-MLV (Promega) по протоколу изготовителя фермента.

Индукцию системного ответа растений детектировали методом количественной ПЦР (кПЦР) по уровню экспрессии известных *PR*-генов *S. lycopersicum*. Количество полученной кДНК определяли методом кПЦР с интеркалирующим красителем SYBR Green или в дуплексных реакциях с гидролизными пробами. В качестве референсного гена использовали *EF-1α*. Использованные олигонуклеотидные праймеры и гидролизные пробы представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Олигонуклеотиды для кПЦР генов томата

Ген (код доступа)	Нуклеотидная последовательность (5'→3')*
<i>EF-1α</i> (BT013246)	TTGAGGCTCTTGACCAGATTAATG
	GTTTCAACACGACCGACAGG
	[Cy5]CCCAAGAGGCCCTCAGACAAGCCC[BHQ2]
<i>PR-1b</i> (M69248)	CGAGAGGCCAAGCTATAACTACG
	GCAAGAAATGAACCACCATCCG
	[6JOE]TGCAACGTGCCCGACCACAACCT[BHQ1]
<i>PR-2</i> (M80608)	ACCTAATGTAGTGGTACAAGATGG
	TGACACAACCTATTCCTACAGATCC
	[6JOE]CCTCCTGTTTCGATCCATCGCAGCAT[BHQ1]
<i>PR-3</i> (Z15139)	GGTGATGATACTGCGCGTAAG
	TTTGATTGCCTTCCCTAACAAAAC
	[6FAM]CCTCCGGCAAATGGACCATCAGCA[BHQ1]
<i>PR-4</i> (U89764)	GAGTAAGTATGGCTGGACTGC
	AGCTCCTGTACGTGTATTTGTC
<i>PR-5</i> (X66416)	ACAACCTGTCCATACACCGTCTG
	CACCATCAAAGTTGCAATTCGTAC
	[5ROX]ACGTGCCATCTTAGTGCCCCTCGG[BHQ2]
<i>PR-6</i> (SGN-U313509**)	GGGAAAGAATATGCTCAAGTTATC
	AATTCTCCATCATCTTCCACTG
<i>PR-8</i> (SGN-U315895**)	TCTCAGGATTTAGCCAACAAAG
	CTACCAGCAGAGTATTGACATG
<i>PR-11</i> (SGN-U322252**)	CGTTCGCAAACCTTAACTCTC
	GCCATGATTCCATAAGCTGTTC
<i>HSR203J</i> (AB022689)	GTAATGATAGTTCGGTTGATAAGC
	AGAGGTAGGAAGACGGAAAC

\* - в квадратных скобках указаны флуорофоры и гасители флуоресценции гидролизных зондов.

\*\* - в связи с отсутствием на момент дизайна праймеров последовательности *PR-6*, *PR-8* и *PR-11* в базе данных GeneBank использованы последовательности унигенов (мРНК) геномного проекта томата ([www.sgn.cornell.edu](http://www.sgn.cornell.edu)).

Реакции происходили при концентрации дезоксинуклеотидтрифосфатов 0,1 или 0,2 мМ и ионов магния 1,5 или 5 мМ при детекции продуктов соответственно с интеркалирующим красителем или с гидролизными пробами. *Taq*-полимераза использована в количестве 1 ед. на 40 мкл реакционной смеси.

Для реакций с SYBR Green контроль специфичности амплификации осуществляли по кривым плавления, а для реакций с гидролизными пробами – агарозным гелем электрофорезом. При использовании гидролизных зондов каждая реакция содержала праймеры для амплификации как исследуемого, так и референсного генов (в концентрациях 0.1 мкМ), а также гидролизные зонды для обоих генов. Концентрацию гидролизных зондов оптимизировали в пределах 0.05-0,4 мкМ для каждой пары генов с целью получения одинакового уровня сигнала. Все реагенты для кПЦР, использованные в работе (гидролизные зонды, праймеры, дезоксинуклеотиды, *Taq*-полимераза и буферы), произведены компанией "Праймтех". Все реакции происходили в течение 45 циклов из двух стадий каждый (10 с при 94 °С и 1 мин при 60 °С).

Реакции осуществляли в амплификаторе РТС200, флуоресценция продуктов регистрировалась детектором Chromo4. Расчеты уровня экспрессии генов томата проводили по формулам

$$\Delta Ct = Ct(EF1\alpha) - Ct(\text{иссл. ген})$$

$$N = 2^{(\Delta Ct - \Delta Ct_{\min})}, \text{ где}$$

$\Delta Ct$  – разница порогового цикла амплификации гена *EF1 $\alpha$*  и исследуемого гена,

$\Delta Ct_{\min}$  – минимальное значение  $\Delta Ct$  в эксперименте,

N- число копий мРНК исследуемого гена.

### Результаты и обсуждение

Бактерии *Pca* в условиях наших экспериментов были неспособны вызывать заболевания у растений двух видов (*Nicotiana tabacum* и *S. lycopersicum*) того же семейства (*Solanaceae*), к которому принадлежит и картофель (*Solanum tuberosum*) – естественное растение-хозяин для бактерий *Pca*. Растения *N. tabacum* и *S. lycopersicum* успешно детектировали присутствие патогена, и в течение 10-18 часов после заражения в зоне инфильтрации развивались видимые симптомы реакции гиперчувствительности (РГ). По сравнению с растениями *N. tabacum*, использованными при первичной характеристике гена *dspE* бактерий *Pca* 3-2 [7], растения *S. lycopersicum* оказались более чувствительными к инокуляции суспензиями *Pca*. РГ у растений *S. lycopersicum* стабильно развивалась при использовании суспензий штамма *Pca* дикого типа плотностью  $10^7$  кл мл<sup>-1</sup>, тогда как суспензии этих клеток с концентрацией не ниже  $10^8$  кл мл<sup>-1</sup> были необходимы для индукции симптомов РГ у растений *N. tabacum*. Инактивация гена *dspE* полностью лишала бактерии *Pca* способности индуцировать РГ у растений томата при использовании суспензий плотностью  $5 \cdot 10^7$  кл мл<sup>-1</sup> и ниже. РГ по прежнему развивалась при использовании суспензий мутантного штамма с плотностью  $10^9$  кл мл<sup>-1</sup> и выше, что свидетельствует в пользу того, что DspE является наиболее сильным, но не единственным, индуктором РГ растений томата, продуцируемым бактериями *Pca*.

Развитие системного защитного ответа *S. lycopersicum* оценивалось по уровню экспрессии набора *PR*-генов в не контактировавших с патогеном настоящих листьях растений через 24 ч. после инфильтрации их семядолей бактериями *Pca*. При использовании суспензий бактерий дикого типа удалось зафиксировать изменение уровня экспрессии для шести *PR*-генов (рисунок). Экспрессия не менялась (или менялась менее чем в 2 раза) для генов *PR-1a*, *PR-8* и *PR-11* (данные не приведены), тогда как для других генов инфильтрация бактерий *Pca* дикого типа приводила к существенному (вплоть до 50-кратного) усилению экспрессии (рисунок 1). Наиболее сильной оказалась индукция генов

*PR-2*, *PR-4*, *PR-5* и *PR-6*. Экспрессия маркера гиперчувствительности *HSR203J* [10] в системных (не контактировавших непосредственно с патогеном) листьях существенно не изменялась.

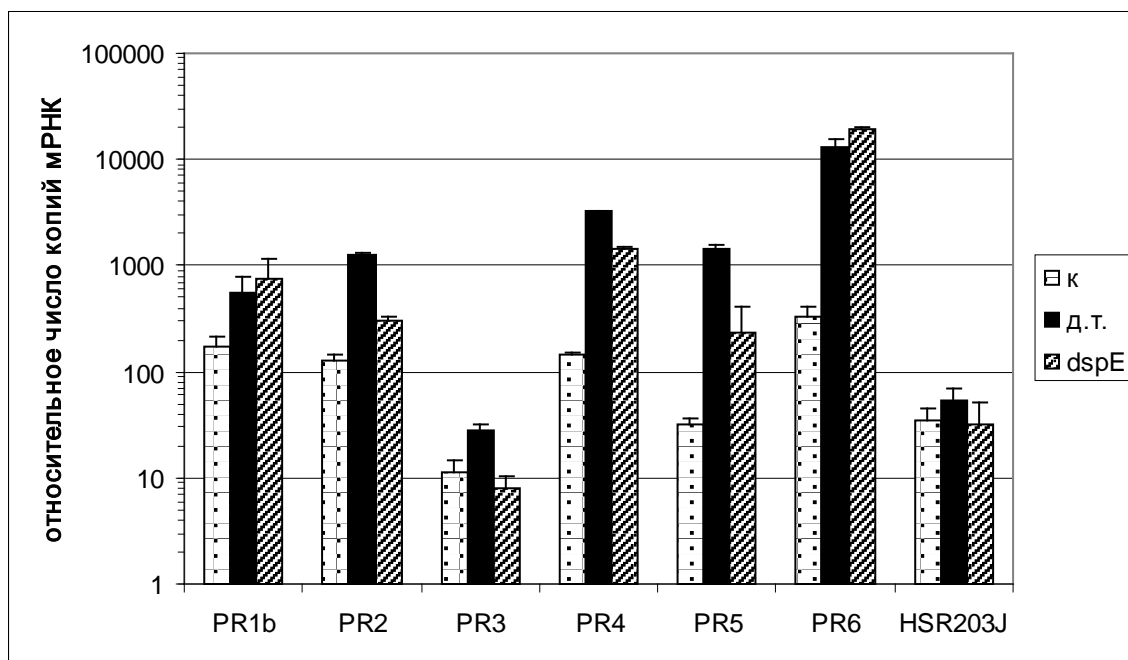


Рисунок 1 – Индукция экспрессии *PR*-генов *Solanum lycopersicum* при контакте с бактериями *Pectobacterium carotovorum*.

Представлены средние трех измерений со стандартной ошибкой. Семядольные листья томата были инфильтрованы 0,85%-ным раствором NaCl (к), суспензиями бактерий *Pca* дикого типа (д.т.) или мутантными по гену *dspE* (*dspE*).

Инактивация гена *dspE* у патогена существенно изменила характер экспрессии *PR*-генов, однако, в отличие от ситуации при заражении клубней картофеля [8], отсутствие у бактерий *Pca* основного эффектора DspE не привело к резкому усилению системной экспрессии *PR*-генов томата. Наоборот, при использовании для инокуляции растений клеток *dspE*-мутанта уровень экспрессии *PR-3* не изменялся, а степень индукции *PR-2*, *PR-4* и *PR-5* была значительно меньшей по сравнению с исходным штаммом, хотя и все равно более высокой, чем в контроле. Степень индукции генов *PR-1B* и *PR-6* была незначительно выше, чем при использовании клеток немутантного штамма. Таким образом, в клетках растений томата белок DspE неспособен выполнять функцию супрессора системного защитного ответа.

Суммируя приведенные выше, а также опубликованные в работе [8] данные, можно сделать следующее заключение. Контакт с клетками *Pca* как чувствительных растений картофеля, так и устойчивых растений томата приводит к индукции *PR*-генов растений, однако патоген за счет ССТТ способен в значительной мере подавлять развитие системного защитного ответа у чувствительных растений-хозяев. Как было установлено нами ранее [8], подавление системного ответа зависит от доставки бактериями *Pca* эффекторного белка DspE в клетки растений. Несмотря на то, что молекулярный механизм действия белка DspE в настоящий момент неизвестен, взаимосвязь между ССТТ-зависимым транспортом DspE в клетки картофеля, блокированием системных защитных реакций и развитием мягкой гнили клубней картофеля является очевидной. С другой стороны, доставка бактериями *Pca* белка DspE в клетки устойчивых растений томата приводит к сильной системной индукции *PR*-генов по всему растению, что скорее всего и ограничивает распространение патогена за пределы очага первичной инфекции. По аналогии с известными механизмами детекции эффекторных белков других патогенов

[5] можно предполагать, что растения томата (но не картофеля) имеют DspE-специфический рецептор, взаимодействие которого с этим эффекторным белком запускает стандартный сигнальный каскад, приводящий к развитию РГ и последующей активации системной приобретенной устойчивости. Идентификация гена такого рецептора и изучение механизма активации сигнального пути, приводящего к индукции РГ, откроет дорогу к конструированию трансгенных растений (в первую очередь картофеля), устойчивых к бактериям *Pca*.

Работа выполнена при поддержке гранта БРФФИ № Б08-161.

### Список литературы

1. Лысак, В.В. Бактериоцины бактерий рода *Erwinia*: дис. канд. биол. наук / Минск, 1983 – 159 л.
2. Бабицкая, Е.В., Песнякевич, А.Г., & Николайчик, Е.А. Характеристика мутантов бактерий *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* 3-2 с нарушенной секрецией пектацелиязы // Прикладная биохимия и микробиология – 1995. – Vol. 31, № 4. – P. 447-452.
3. Ghosh, P. Process of protein transport by the type III secretion system // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2004. – Vol. 68, № 4. – P. 771-95.
4. Grant, S. R., Fisher, E. J., Chang, J. H., Mole, B. M., Dangl, J. L. Subterfuge and manipulation: type III effector proteins of phytopathogenic bacteria // Annu. Rev. Microbiol. – 2006. – Vol. 60, – P. 425-49.
5. McNale, L., Tan, X., Koehl, P., Michelmore, R. Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards // Genome Biol. – 2006. – Vol. 7, № 4. – P. 212.
6. Durrant, W., Dong, X. Systemic acquired resistance // Annu. Rev. Phytopathol. – 2004. – Vol. 42, № 1. – P. 185-209.
7. Николайчик, Е.А., Овчинникова, Т.В., Валентович, Л.Н., Губич, О.И., Шолух, М.В., Евтушенков, А.Н. Белок DspE транслоцируется фитопатогенными бактериями *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* в клетки *Nicotiana tabacum* и является необходимым для индукции реакции гиперчувствительности // Докл. НАН Б. – 2005. – Vol. 49, № 5. – P. 81-85.
8. Николайчик, Е.А., Хомская, Л.Л., & Игнатенко, Е.И. Фитопатоген *Pectobacterium carotovorum* использует аппарат секреции III типа для блокирования системного защитного ответа растения-хозяина // Труды БГУ – 2009. – Vol. 4, – P. 197-204.
9. 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 Б. – 2007. – Vol. 51, № 5. – P. 85-89.
10. Pontier, D., Tronchet, M., Rogowsky, P., Lam, E., Roby, D. Activation of *hsr203*, a plant gene expressed during incompatible plant-pathogen interactions, is correlated with programmed cell death // Mol. Plant-Microbe Interact. – 1998. – Vol. 11, № 6 – P. 544-554.