

УДК 577.25:577.218

А. В. КОЛУБАКО, О. А. БАДАЛЯН, Е. А. НИКОЛАЙЧИК

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ *SOLANUM BULBOCASTANUM* ДЛЯ МОДЕЛИРОВАНИЯ
ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ МЕЖДУ ПАТОГЕНОМ *PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM*
И РАСТЕНИЕМ-ХОЗЯИНОМ***Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь, e-mail: oliagg@bk.ru*

Изучение роли компонентов сигнальной цепи, участвующей в детекции *P. carotovorum*, у растений культурного картофеля крайне затруднительно. В работе экспериментально проверена пригодность растений дикого картофеля *Solanum bulbocastanum* для моделирования взаимоотношений патоген–хозяин. Реакция *S. bulbocastanum* на заражение суспензиями клеток штаммов *P. carotovorum* сходна с таковой у *S. tuberosum* и других растений сем. *Solanaceae*. Выявлена дифференциальная экспрессия ключевых генов иммунного ответа во время заболевания. Показана пригодность *S. bulbocastanum* для вирус-индуцированного сайленсинга генов с использованием TRV-конструкций.

Ключевые слова: *Solanum bulbocastanum*, *Pectobacterium carotovorum*, DspE, вирус-инфицированный сайленсинг генов, PR-гены.

A. V. KOLUBAKO, O. A. BADALYAN, Y. A. NIKOLAICHIK

**USAGE OF *SOLANUM BULBOCASTANUM* PLANT FOR THE PURPOSE OF MODELING THE INTERACTION
BETWEEN *PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM* PATHOGEN AND THE HOST PLANT***Belarussian State University, Minsk, Belarus, e-mail: oliagg@bk.ru*

The components of the signal chain that is involved in *P. carotovorum* detection by domestic potato (*Solanum tuberosum*) plants are hard to study. This work experimentally verifies applicability of wild potato (*S. bulbocastanum*) plants for modeling interactions between *P. carotovorum* and the host plant. The response of *S. bulbocastanum* to inoculation by *P. carotovorum* cell suspensions is similar to that of *S. tuberosum* and other *Solanaceae* plants. We describe differential expression levels of the key immunity related genes and demonstrate suitability of *S. bulbocastanum* for the virus-induced gene silencing.

Keywords: *Solanum bulbocastanum*, *Pectobacterium carotovorum*, DspE, virus-induced gene silencing, PR-genes.

Введение. Фитопатогенные бактерии *Pectobacterium carotovorum* наносят значительный ущерб сельскому хозяйству, являясь причиной развития мягких гнилей клубней при длительном хранении картофеля. Кроме того, заражение стеблей картофеля бактериями *P. carotovorum* приводит к развитию заболевания «черная ножка».

Известны многие факторы вирулентности этих бактерий, из которых наиболее изученными являются гидролитические экзоферменты и необходимая для их секреции секреторная система II типа [1]. Однако наибольший интерес с точки зрения защиты растений от этого патогена играют начальные стадии развития заболевания. Целый ряд данных свидетельствует о важнейшей роли системы секреции III типа (ССТТ) во взаимодействии патогена с растением при их первичном контакте. Установлено, что эта секреторная система участвует во взаимодействии *P. carotovorum* как с чувствительными к этому патогену растениями-хозяевами (*Solanum tuberosum*), так и с устойчивыми растениями *Vicia faba* [2]. Степень важности этой секреторной системы существенно зависит от количества клеток патогена, используемых для заражения растений-хозяев [3] и устойчивых растений *Solanum lycopersicum* [4].

В настоящее время известно, что ключевым субстратом ССТТ, определяющим исход взаимодействия с растениями, является доставляемый с помощью этой секреторной системы в клетки

растений эффекторный белок DspE [3]. Бактерии *P. carotovorum* с инактивированным геном *dspE* обладают значительно сниженной вирулентностью по сравнению с бактериями дикого типа при заражении как растения-хозяина (картофеля), так и других растений из сем. *Solanaceae* (*Nicotiana tabacum* и *Nicotiana benthamiana*), не являющихся естественными хозяевами для *P. carotovorum* [3, 5]. Анализ экспрессии защитных *PR*-генов в интактных и зараженных бактериями дикого типа *P. carotovorum* клубнях картофеля выявил, что эти бактерии индуцируют экспрессию *PR*-генов на границе с очагом инфекции. В то же время в системных частях клубней экспрессия генов *PR3* и *PR5* значительно снижена. При заражении штаммами *P. carotovorum*, мутантными по генам системы секреции III типа или эффекторного белка DspE, уровень экспрессии *PR*-генов, в том числе *PR3* и *PR5*, оставался повсеместно высоким [3]. В растениях *N. benthamiana* при заражении штаммами *P. carotovorum* также наблюдалась ССТТ-опосредованная супрессия ряда защитных генов (*PR1* и генов рецепторподобных киназ) [6]. Таким образом, патоген *P. carotovorum* способен блокировать развитие защитных реакций, в том числе и системных, используя ССТТ и доставляемый в клетки растений с ее помощью эффекторный белок DspE.

Нам также удалось установить, что DspE непосредственно взаимодействует с киназными доменами рецепторподобных киназ RLK2 и RLK5 [7]. Инактивация последних в растениях *N. benthamiana* методом вирус-индуцированного сайленсинга генов (ВИСГ) приводила к снятию супрессии защитных генов, которую в норме вызывает штамм дикого типа *P. carotovorum* [7].

На основании полученных результатов предложена модель взаимодействия *P. carotovorum* с растениями *N. benthamiana*: DspE, связываясь с цитоплазматическими доменами рецепторподобных киназ RLK2 и RLK5, манипулирует растительным иммунитетом. С использованием DspE *P. carotovorum* блокирует развитие защитных реакций, эффективных против данного некротрофного патогена, и активирует иммунные реакции растений, которые могут способствовать благоприятному развитию заболевания [5].

Растения *N. benthamiana* не являются естественным хозяином для *P. carotovorum*, поэтому пригодность вышеописанной модели для растений-хозяев (картофеля) требует экспериментального подтверждения. Такая проверка, однако, существенно затруднена для растений *Solanum tuberosum* из-за неэффективности ВИСГ у этих растений. Система ВИСГ, примененная нами ранее для растений *N. benthamiana*, использует векторы на основе вируса TRV (tobacco rattle virus), а большинство современных сортов *Solanum tuberosum* устойчиво к этому вирусу. По данным литературы [8], наиболее близким к культурному картофелю видом, чувствительным к TRV, является *Solanum bulbocastanum*, один из клубненоносных видов дикого картофеля.

Цель данного исследования – проверить пригодность растений *S. bulbocastanum* для моделирования системы патоген–хозяин с участием *P. carotovorum*, а также способность векторов на основе TRV индуцировать сайленсинг генов у этих растений.

Материалы (объекты) и методы исследования. Растения *Solanum bulbocastanum* выращивали при 20 °C и 16-часовом световом дне. Штаммы бактерий *Pectobacterium carotovorum* JN42, *P. carotovorum* VKE и *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 культивировали на среде LB при 28 °C.

Для вирус-индуцированного сайленсинга использовалась конструкция pTRV2::*sIPDS*. Сайленсинг осуществляли по описанной в [9] методике. Способ заражения растений и отбора образцов описан в [6].

Методика ОТ-кПЦР описана в [3]. Используемые в работе олигонуклеотиды приведены в таблице.

Олигонуклеотиды

Ген	Продукт	Нуклеотидная последовательность
<i>EF1A</i>	Фактор элонгации	ttgatgctcttgaccagattaacg acgggcacagttccaatacc
<i>TBP</i>	ТАТА-связывающий белок	ggagcctaaagtgaacaacag cgtaactgagaaagcaccgt
<i>PR1</i>	PR белок с неизвестной функцией	gggagaagcctaaactacaactatg ttgcatgaaatgaaccaccatcc

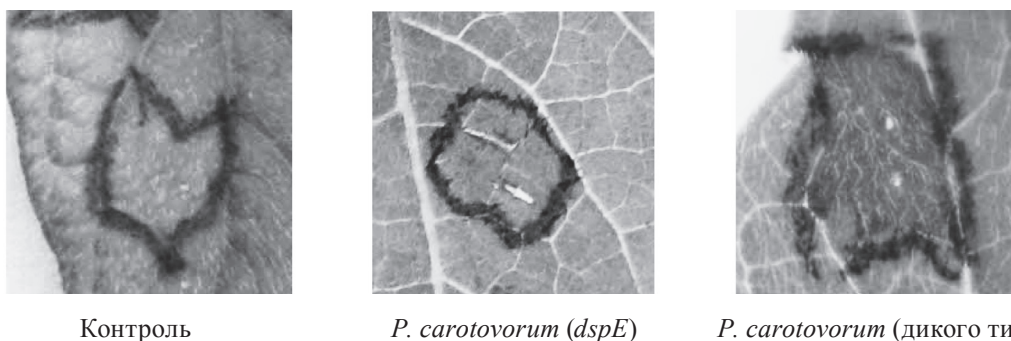
Ген	Продукт	Нуклеотидная последовательность
<i>PR2</i>	Эндоглюканаза	ctaatcgggtggtacaagatgg tgacacaacaattcctacagatcc
<i>PR5</i>	Осмотин	atttgaggtccataacaactgtcc gcaattagtagcagcccaataacg
<i>PR6</i>	Ингибитор протеаз	gggaaagaatatgctcaagttatc aattctccatcatcttccactg
<i>PR10</i>	Предполагаемая рибонулеаза	tatgagtcaacaaccacaatttccc tggaccaccttcaacaagttc
<i>HSR203J</i>	Маркер реакции сверхчувствительности	gtaatgatagtctgggtgataagc gaggaagacggagacaataatagc
<i>RLK5</i>	Рецепторподобная киназа	tggaattgtgttgatctgtatg atatgaaccacatcaacagacct
<i>GST1</i>	Глутатион S-трансфераза	catttgaaggcccttcattttg tctttagcttctctgttctctc

Определение уровней экспрессии генов проводилось относительно двух референсных генов *EF1A* и *TBP* с использованием программы REST [10].

Результаты и их обсуждение. Использование клубней *Solanum bulbocastanum* для моделирования экспериментальной системы взаимоотношений растение-хозяин–патоген *Pectobacterium carotovorum* несколько затруднено из-за их малых размеров (в среднем около 1 см в диаметре). Поэтому для проверки пригодности данных растений в качестве растения-хозяина использовали листья 1,5-месячных побегов, выращенных из клубней. Листья инфильтровали суспензиями штаммов *P. carotovorum* дикого типа и его мутантным производным по гену *dspE*, а в качестве контроля растения инфильтровали 10 мМ MgSO₄. Через 24 ч после введения в листья клеток штамма *P. carotovorum* дикого типа по всей зоне инфильтрации развивалась реакция сверхчувствительности, в то время как при введении суспензии клеток штамма, мутантного по *dspE*, данная реакция практически не развивалась (рис. 1).

Такое фенотипическое проявление реакции на контакт со штаммами *P. carotovorum* говорит о том, что бактерии *P. carotovorum*, мутантные по гену эффекторного белка DspE, обладают сниженной вирулентностью в растениях *S. bulbocastanum* по сравнению со штаммом дикого типа. Аналогичное развитие событий наблюдается в растениях *N. benthamiana* [5], *Solanum lycopersicum* [11] и растении-хозяине *S. tuberosum* [3].

Для проверки сходства молекулярных механизмов взаимодействия патогена с растениями *S. bulbocastanum* и *S. tuberosum* на следующем этапе работы в образцах листьев *S. bulbocastanum* через 24 ч после инфильтрации суспензиями клеток *P. carotovorum* дикого типа и *dspE*-мутанта методом ОТ-кПЦР были измерены уровни экспрессии ключевых генов иммунного ответа. В качестве контроля использовали образцы листьев, инфильтрованных 10 мМ MgSO₄ (раневой ответ), а также нетронутые листья (контроль).



Контроль

P. carotovorum (*dspE*)*P. carotovorum* (дикого типа)

Рис. 1. Индукция реакции сверхчувствительности суспензиями клеток штаммов *Pectobacterium carotovorum* в листьях *Solanum bulbocastanum*. Листья растений инфильтрованы суспензиями клеток *P. carotovorum* плотностью $1,5 \cdot 10^9$ клеток/мл и сфотографированы через 24 ч

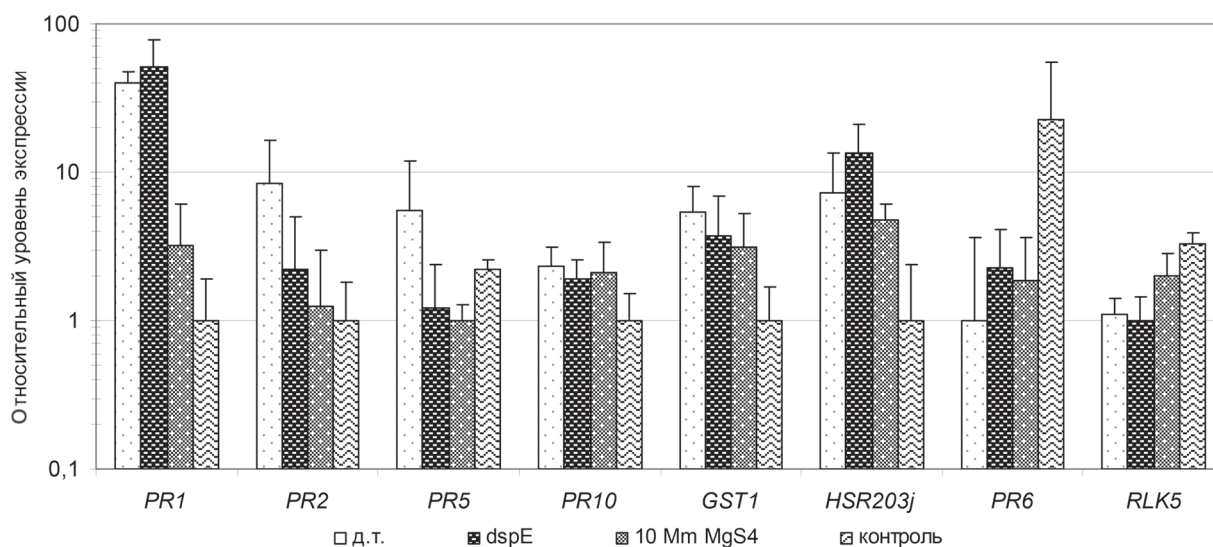


Рис. 2. Относительный уровень экспрессии генов в листьях растений *S. bulbocastanum*, инфицированных суспензиями клеток *P. carotovorum*. Представлены средние значения 3–4 измерений относительного числа копий мРНК с 95 %-ным доверительным интервалом. Листья инфильтрованы раствором 10 мМ MgSO₄, суспензиями клеток *P. carotovorum* дикого типа (д. т.) и *P. carotovorum dspE*

Уровень экспрессии *PR1* существенно повышался (более чем в 40–50 раз) при инфильтрации листьев суспензиями клеток *P. carotovorum* (вне зависимости от штамма *P. carotovorum*) по сравнению с таковым в нетронутых листьях (рис. 2). *PR2* и *PR5* индуцировались (в 8 и 5 раз соответственно) при введении клеток штамма дикого типа, в то время как инфильтрация суспензиями клеток штамма, мутантного по *dspE*, значительного влияния на экспрессию данных генов не оказала. Гены *PR10*, *GST1* и *HSR203J* индуцировались в результате раневого ответа, а присутствие клеток патогена существенно не повлияло на их экспрессию. Для гена *PR6* наблюдалась противоположная ситуация: в ходе раневого ответа его экспрессия снижалась в 3–5 раз в листьях *S. bulbocastanum*.

Как видно из рис. 2, уровень экспрессии *RLK5* снижается в 3 раза при контакте *S. bulbocastanum* со штаммами *P. carotovorum*. Продуктом данного гена является рецепторподобная киназа, с цитоплазматическим киназным доменом которой взаимодействует DspE [12]. Ранее нами было показано, что наличие функциональной системы секреции III типа у патогена *P. carotovorum* супрессирует экспрессию генов рецепторподобных киназ у растений *N. benthamiana* [6]. Можно предположить, что способность *P. carotovorum* супрессировать экспрессию ключевых рецепторов, ответственных за распознавание этих бактерий, является универсальной и распространяется на многие растения, в том числе и на растения картофеля.

Таким образом, нами зарегистрированы значимые изменения уровней экспрессии 4 генов (*PR1*, *PR2*, *PR5* и *RLK5*) растений *S. bulbocastanum* при контакте с бактериями *P. carotovorum*. Следует отметить, что эти изменения являются разнонаправленными, т. е. наблюдается как индукция, так и супрессия компонентов иммунной системы растения, что в целом характерно для взаимодействия *P. carotovorum* с растениями [5]. Для двух генов (*PR2* и *PR5*) индукция экспрессии требует присутствия функционального гена *dspE*, а в случае генов *PR1* и *RLK5* изменение уровней их экспрессии при контакте с патогеном от DspE, очевидно, не зависит. Такая ситуация тоже является стандартной и может отражать участие во взаимодействии с растением пока еще не идентифицированных эффекторных белков ССТТ или других факторов вирулентности.

Для окончательного выяснения роли ССТТ и транспортируемых с ее помощью в клетки растений эффекторов на начальных стадиях взаимодействия с растениями картофеля может быть использована инактивация в клетках растений компонентов сигнальной цепочки, активирующей иммунный ответ. В рамках настоящей работы была проверена возможность осуществления ВИСГ у растений *S. bulbocastanum* как наиболее простого и быстрого способа инактивации генов у растений. Важным преимуществом данного метода является то, что если в геноме присутствует



Рис. 3. Фенотип растений *S. bulbocastanum* через 5 недель после инфицирования конструкциями TRV2::*GFP* (контроль, слева) и TRV2::*PDS* (справа)

несколько высокоомологичных копий гена, то ВИСГ способен одновременно инактивировать все копии, что особенно актуально для растений картофеля.

Проверка пригодности растений *S. bulbocastanum* для ВИСГ проводилась с использованием векторной системы на основе вируса TRV. Фенотипически присутствие вирусных частиц, собравшихся на основе TRV1 и TRV2 конструкций, в растениях никак не проявляется. Для оценки эффективности сайленсинга в растениях *S. bulbocastanum* использовали конструкции с клонированным фрагментом гена фитоиндесатуразы – *PDS*, продуктом которого является фермент пути синтеза каротиноидов. Инактивация этого гена приводит к побелению листьев вследствие разрушения хлорофилла. В качестве контроля использовали конструкцию TRV::*GFP* с клонированным фрагментом гена, не имеющего гомологии с растительным геномом.

Растения *S. bulbocastanum* инфицировались TRV-конструкциями на стадии 4–6 настоящих листочков. Уже через 2,5–3 недели наблюдались первые характерные признаки инактивации гена фитоиндесатуразы в растениях, трансформированных TRV::*PDS*, а к 5-й неделе отмечалось значительное побеление всех листьев (рис. 3). Полученные результаты позволяют заключить, что растения *S. bulbocastanum* действительно являются чувствительными к вирусу TRV, что делает их пригодными для осуществления ВИСГ, хотя зафиксированная неравномерность сайленсинга потребует оптимизации этой процедуры.

Заключение. Реакция растений *S. bulbocastanum* на заражение бактериями *P. carotovorum* сходна с таковой других растений семейства пасленовых [3, 6, 11]. Выявлено четкое фенотипическое проявление активации иммунитета этих растений (реакция сверхчувствительности), зависящее от присутствия в клетках патогена белка DspE, ключевого эффектора системы секреции III типа. На молекулярном уровне у этих растений после контакта с патогеном детектируется дифференциальная экспрессия генов иммунной системы, сходная с таковой у других пасленовых растений, особенно у культурного картофеля *Solanum tuberosum*. Такая реакция растений *S. bulbocastanum* на контакт с *P. carotovorum* (учитывая их близость к культурному картофелю), а также возможность использования ВИСГ делают эти растения удобным объектом для исследования на молекулярном уровне механизмов иммунитета к важнейшему патогену картофеля.

Выражаем благодарность А. П. Ермашину за предоставленный семенной материал *S. bulbocastanum*.

Список использованной литературы

1. Молекулярные механизмы взаимодействия фитопатогенных бактерий *Erwinia* с растениями / Е. А. Николайчик [и др.] // Вестн. БГУ. – 2006. – Т. 4. – С. 60–64.
2. Ageichik, A. V. The role of type III secretion system in *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* virulence / A. V. Ageichik, A. N. Evtushenkov, Y. A. Nikolaichik // Plant Protection Science. – 2002. – Vol. 38, N 7. – P. 523–527.
3. Николайчик, Е. А. Фитопатоген *Pectobacterium carotovorum* использует аппарат секреции III типа для блокирования системного защитного ответа растения-хозяина / Е. А. Николайчик, Л. Л. Хомская, Е. И. Игнатенко // Тр. БГУ. – 2009. – Т. 4. – С. 197–204.

4. Чжан, Янь. Зависимость иммунного ответа растений *Solanum lycopersicum* от численности клеток *Pectobacterium carotovorum* / Янь Чжан, Е. А. Николайчик // Вес. НАН Беларусі. Сер. біял. навук. – 2012. – № 3. – С. 44–48.
5. Николайчик, Е. А. Индукция и супрессия иммунного ответа растений бактериальным патогенном *Pectobacterium carotovorum* / Е. А. Николайчик // Тр. БГУ. – 2012. – Т. 7, № 1. – С. 43–55.
6. Бадалян, О. А. Участие MAP-киназ WIPK И SIPK растений *Nicotiana benthamiana* в детекции фитопатогена *Pectobacterium carotovorum* / О. А. Бадалян, Е. А. Николайчик // Докл. НАН Беларусі. – 2013. – Т. 57, № 6. – С. 75–81.
7. Бадалян, О. А. Рецепторподобные киназы RLK2 и RLK5 *Nicotiana benthamiana* участвуют в регуляции экспрессии генов ключевых компонентов иммунной системы растения при контакте с *Pectobacterium carotovorum* / О. А. Бадалян, Е. А. Николайчик // Вес. НАН Беларусі. Сер. біял. навук. – 2014. – № 4. – С. 75–80.
8. Virus-induced gene silencing in *Solanum* species / G. Brigneti [et al.] // The Plant J. – 2004. – Vol. 39, N 2. – P. 264–272.
9. Liu, Y. Virus-induced gene silencing in tomato / Y. Liu, M. Schiff, S. P. Dinesh-Kumar // Plant J. – 2002. – Vol. 31, N 6. – P. 777–786.
10. Pfaffl, M. W. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR / M. W. Pfaffl, G. W. Horgan, L. Dempfle // Nucl. Acids Res. – 2002. – Vol. 30, N 9. – P. e36.
11. Николайчик, Е. А. Системная индукция PR-генов растений *Solanum lycopersicum* при контакте с бактериями *Pectobacterium carotovorum*: роль гена *dspE* / Е. А. Николайчик // Тр. БГУ. – 2009. – Т. 4, № 2. – С. 215–219.
12. Роль рецепторподобной трансмембранной киназы растений семейства пасленовых во взаимодействии с фитопатогеном *Pectobacterium carotovorum* / Е. А. Николайчик [и др.] // Докл. НАН Беларусі. – 2012. – Т. 56, № 1. – С. 112–117.

Поступила в редакцию 17.12.2015