

УДК 577.25:577.218

О. А. БАДАЛЯН, Е. А. НИКОЛАЙЧИК

**ВЛИЯНИЕ САЙЛЕНСИНГА ГЕНОВ МАР-КИНАЗ SIPK И WIPK РАСТЕНИЙ
NICOTIANA BENTHAMIANA НА АКТИВАЦИЮ СИСТЕМНОЙ УСТОЙЧИВОСТИ
ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ БАКТЕРИЯМИ *PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM***

Белорусский государственный университет, Минск, e-mail: oliagg@bk.ru

(Поступила в редакцию 17.04.2014)

Введение. Для эффективной борьбы растений с патогеном крайне важно развитие системной устойчивости, предотвращающей дальнейшее распространение инфекции. В основе защитных реакций растений лежат салицилатный и жасмонатный сигнальные пути, так как именно через них происходит передача в ядро сигнала о детекции патогена, в результате чего индуцируются различные локальные и системные механизмы защиты [1]. Данные сигнальные пути находятся в тесном взаимодействии друг с другом и обеспечивают гибкую и эффективную защиту растений. Однако эффекты активации салицилатного и жасмонатного путей могут быть не только синергичными, но и антагонистичными [2]. Например, активация жасмонатного сигнального пути фитотоксином коронатином хемибиотрофного бактериального патогена *Pseudomonas syringae* блокирует активацию салицилатного пути, что способствует значительно более эффективной колонизации растений [3].

Pectobacterium carotovorum (*Pca*) является некротрофным патогеном с широким кругом хозяев, однако общие симптомы и степень поражения различных растений варьируют от штамма к штамму. Бактерии штамма *Pca* 3-2 были выделены из клубней картофеля *Solanum tuberosum*, и у своего природного хозяина способны вызывать мягкие гнили клубней, а также «черную ножку» вегетирующих стеблей. При заражении листьев растений *Nicotiana benthamiana*, не являющихся естественным хозяином для *Pca* 3-2, через 14–20 ч наблюдается гибель клеток растения (сходная с реакцией сверхчувствительности) в зоне инфильтрации суспензии клеток патогена, однако в последующие 36 ч зона поражения может увеличиваться вплоть до некроза всей листовой пластинки. В итоге как при заражении клубней картофеля, так и при заражении листьев *N. benthamiana* наблюдается постепенное, но относительно медленное распространение некроза за пределы области первоначальной инокуляции клеток *Pca*. Такое сходство в характере развития заболевания, а также легкость инактивации генов *N. benthamiana* методом вирус-индуцированного сайленсинга делает эти растения удобным модельным объектом для исследования статуса иммунной системы при инфекции растений бактериями *Pca*.

Ранее нами было показано, что для развития в растениях табака реакции сверхчувствительности при контакте с *Pca* данные бактерии должны иметь функциональную систему третьего типа (ССТТ) [4], а в клетках растений должны присутствовать специфические рецепторподобные киназы, которые непосредственно взаимодействуют с эффекторным белком патогена DspE [5]. В работе [6] мы показали, что важнейшими компонентами сигнальных путей, активируемых при распознавании бактерий *Pca*, являются МАР-киназы SIPK и WIPK. По нашим данным, SIPK и WIPK оказались ключевыми регуляторами локальных иммунных реакций, а поскольку от этих МАР-киназ зависит синтез низкомолекулярных медиаторов системного ответа, салициловой кислоты и метилжасмоната, в настоящей работе проведена оценка роли SIPK и WIPK в системной регуляции экспрессии связанных с иммунитетом генов растений *N. benthamiana* через 24 ч после контакта с *Pca*.

Материалы и методы исследования. Растения *Nicotiana benthamiana* выращивались при 20 °С и 16-часовом световом дне. Штаммы бактерий *Pectobacterium carotovorum* JN42 и *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 культивировали на среде LB при 28 °С.

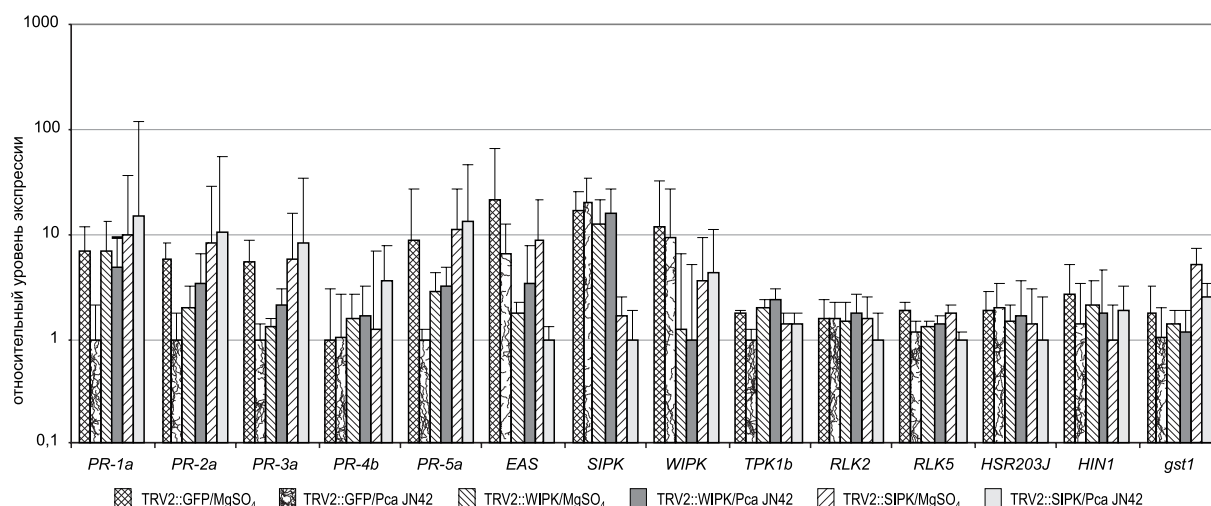
Для вирус-индуцированного сайленсинга генов использовались конструкции, содержащие фрагменты генов *SIPK* и *WIPK*, описанные в работе [6], а сайленсинг проводился по методике, описанной в [7]. В качестве негативного контроля использовалась конструкция pTRV2::GFP.

Листья *N. benthamiana* инфильтровались суспензиями клеток *P. carotovorum* JN42 плотностью $1,5 \cdot 10^8$ клеток/мл в $MgSO_4$. В качестве негативных контролей использованы растения, инфильтрованные 10 мМ $MgSO_4$. Образцы для анализа экспрессии генов отбирали через сутки после заражения из второго или третьего листа непосредственно над инфильтрованным.

Методика ОТ-кПЦР описана в [8], использованные олигонуклеотиды – в [6]. Определение уровней экспрессии генов проводилось относительно двух референсных генов *EF-1a* и *CAC* с использованием программы REST [9] версии 2.0.13 в соответствии с инструкцией к программе.

Результаты и их обсуждение. Ранее нами было показано, что локальная реакция растений *Nicotiana benthamiana* на инфекцию бактериями *Pca* зависит от работы сигнального каскада, ключевыми компонентами которого являются MAP-киназы *SIPK* и *WIPK*. Инфекция бактериями *Pca* приводила к увеличению экспрессии *PR*-генов (*PR-2b*, *PR-3a*, *PR-4b*, *PR-5b*, *EAS*, *HSR203J*, *HIN1*) в листьях *Nicotiana benthamiana*, непосредственно инфицированных патогеном, однако для генов рецепторподобной киназы *RLK2* и *PR-1a* детектировалась репрессия. Инактивация любой из MAP-киназ приводила к существенному повышению экспрессии *PR-2a*, *PR-4b*, *PR-5a*, *HIN1*, *PR-3a*. Сайленсинг как *SIPK*, так и *WIPK* не влиял на локальную экспрессию *HSR203J* и *EAS*, а уровень индукции *PR-2b* и *PR-5b* существенно снижался. Кроме того, в таких растениях полностью снималась репрессия *RLK2* и *PR-1a* [6]. Таким образом, локальные изменения уровней экспрессии большинства связанных с иммунитетом генов зависели от *SIPK* и *WIPK*. А поскольку при инфекции немодифицированных растений распространение инфекции за пределы зоны первоначальной инфильтрации зависело от этих MAP-киназ, в настоящей работе были проверены уровни экспрессии связанных с иммунитетом генов в системных тканях зараженных растений.

При контакте немодифицированных (без сайленсинга каких-либо генов) *N. benthamiana* с *Pca* в системной части растений для ряда *PR*-генов (*PR-1a*, *PR-2a*, *PR-3a*, *PR-5a*, *EAS*) наблюдалось снижение уровней экспрессии в 4–9 раз (рисунок). Стоит отметить, что сходная супрессия для генов *PR-3* и *PR-5* была ранее нами показана в удаленных от места инфекции (т. е. системных) частях клубней картофеля при заражении бактериями *Pca* [8]. Для слабо экспрессирующихся



Относительный уровень экспрессии генов в системных листьях *N. benthamiana*, предварительно инфицированных конструкциями TRV2::GFP, TRV2::SIPK и TRV2::WIPK, через 24 ч после инфильтрации суспензиями клеток *Pca*. Представлены средние значения 3–5 измерений относительного числа копий мРНК с 95%-ным доверительным интервалом. В качестве контроля использованы растения, инфильтрованные раствором 10 мМ $MgSO_4$.

генов цитоплазматической киназы TPK1b и рецепторподобной киназы RLK5 было отмечено лишь незначительное (в 1,5 раза) снижение уровней экспрессии. Для генов *PR-4b*, *gst1* (ген глутатион S трансферазы), *HSR203J* (ген, участвующий в развитии реакции гиперчувствительности), *HIN1* (харпин-индуцируемый ген), *RLK2*, *SIPK* и *WIPK* достоверных изменений в уровнях экспрессии при системной реакции на инфекцию *Pca* не детектировалось.

Эффективность сайленсинга MAP-киназ в системных образцах *N. benthamiana* сохранялась на уровне локальных образцов – около 5–10 % от исходного (рисунок). Кроме того, инактивация *SIPK* приводила к снижению экспрессии *WIPK* почти в 3 раза.

В системной части растений с сайленсингом *WIPK* детектировалось значительное снижение экспрессии генов *PR-3a*, *PR-5a*, *EAS*, а также гена рецепторной киназы *RLK5*. Ни для одного из генов у таких растений не отмечено повышения уровня экспрессии. На фоне сайленсинга *WIPK* супрессии генов в ходе инфекции *Pca* не наблюдалось.

Инактивация в растениях гена *SIPK* полностью снимала системную супрессию *PR*-генов, а для нескольких генов (*PR-1a*, *PR-2a*, *PR-3a* и *gst1*) экспрессия оказалась в 5–9 раз более интенсивной, чем у контрольных растений.

В условиях данной экспериментальной системы MAP-киназы выступают в качестве как позитивного (преимущественно *WIPK*), так и негативного (преимущественно *SIPK*) регулятора экспрессии генов иммунитета, однако наиболее интересным феноменом является наблюдаемая супрессия как минимум четырех *PR*-генов, тоже зависящая от этих двух MAP-киназ.

Поскольку нам не удалось ни в системных, ни (ранее) в инфицированных [6] листьях зафиксировать изменений уровня транскрипции *SIPK* при сайленсинге *WIPK*, а примерно 3-кратное системное снижение уровня экспрессии *WIPK* при сайленсинге *SIPK* не коррелировало с направлением изменения транскрипции прочих генов при инактивации *WIPK*, наблюдаемые эффекты могут быть результатом кратковременных изменений транскрипции генов этих киназ непосредственно после заражения, либо изменений активности *WIPK* и *SIPK*, скорее всего, в зоне инфильтрации. Известно, что после обработки элиситорами интенсивность транскрипции *SIPK* не меняется, а *WIPK* – кратковременно возрастает [10–12]. Активность как *WIPK*, так и *SIPK* быстро (в течение десятков минут) возрастает также непосредственно после заражения растений или раневого повреждения [13]. Активация системных реакций связана с действием низкомолекулярных медиаторов, синтез которых находится под контролем *WIPK* и *SIPK*. *WIPK* абсолютно необходима для синтеза жасмонатов [13], а *SIPK* негативно регулирует синтез салициловой кислоты [11]. Кроме того, известно, что *WIPK* также может негативно контролировать синтез салициловой кислоты [14], скорее всего, опосредованно через повышение концентрации жасмонатов [15]. Таким образом, локальная активация обеих MAP-киназ должна приводить к повышению концентрации жасмоната и снижению концентрации салицилата и соответствующим реакциям на изменение концентраций этих медиаторов системного ответа. Обычно считается, что локальная активация MAP-киназ в ходе заражения является кратковременной (от нескольких десятков минут до нескольких часов) [10], однако в определенных условиях, в частности, при заражении некротрофным патогеном *Botrytis cynerea*, может быть значительно более продолжительной – до 36 ч [16].

В наших экспериментах основной причиной индукции защитных реакций у растений табака является доставка бактериями *Pca* в клетки растений эффекторного белка DspE [4]. В настоящей работе для заражения растений использованы культуры *Pca*, выращенные на полноценной питательной среде, т. е. с неиндуцированной секреторной системой III типа, необходимой для транспорта DspE. В такой ситуации заметное количество бактериального эффектора в клетках табака детектируется не ранее, чем через 4 ч после заражения, а максимальная его концентрация достигается только через 8–10 ч [4]; тогда же становятся заметными и самые первые симптомы поражения инфильтрованных участков листьев. Кроме того, в растениях *N. benthamiana* инфекция *Pca* не ограничивается исключительно зоной первоначальной инфильтрации суспензий клеток патогена, а постепенно распространяется на соседние участки того же листа. В такой ситуации можно ожидать более позднюю, но продолжительную активацию MAP-киназ, что приведет

к сохранению пониженных концентраций салицилата в системных листьях через 24 ч после заражения и может определять наблюдаемую супрессию салицилатзависимых *PR*-генов. Поскольку такое снижение концентрации салицилата зависит от активности SIPK, сайленсинг гена этой киназы снимает вызываемую *Pca* супрессию салицилатзависимых генов и приводит к общему повышению уровня их экспрессии как у интактных, так и у зараженных *Pca* растений. Сайленсинг WIPK, с другой стороны, у интактных растений существенно не влияет на экспрессию супрессируемых при заражении генов (что еще раз подтверждает их преимущественно салицилатную регуляцию), однако предотвращает супрессию салицилатзависимых генов при заражении *Pca*. Отсутствие супрессии может быть результатом вышеописанной обратной зависимости между концентрациями жасмоната и салицилата [14,15]: снижение у растений с сайленсингом WIPK концентрации жасмонатов может снимать ингибирование синтеза салициловой кислоты и таким образом снимать супрессию салицилатзависимых генов.

Заключение. Принадлежность *S. tuberosum* и *N. benthamiana* к одному семейству и похожая реакция обоих растений на заражение бактериями *Pca* позволяет предполагать сходные регуляторные механизмы. Инфекция клубней картофеля бактериями *Pca* приводит к индукции *PR*-генов на границе области мягкой гнили, однако сильно репрессирует ряд генов на удалении от зоны инфекции [8], что соответствует характеру локальной и системной экспрессии генов иммунитета *N. benthamiana*, зафиксированному нами ранее [6] и в настоящей работе. В свете полученных нами на *N. benthamiana* данных о роли «классических» сигнальных киназ в регуляции генов иммунитета представляется вероятным, что бактерии *Pca* и при заражении своего природного хозяина, активируя жасмонатный сигнальный путь и репрессируя салицилатный, нарушают работу иммунной системы растения в свою пользу. Следует отметить также, что такой сдвиг регуляции в клетках растений происходит под контролем патогена и зависит от активного транспорта его основного эффекторного белка DspE в клетки растений.

Литература

1. Pieterse C. M. J., Leon-Reyes A., Van der Ent S., Wees S. C. M. V. // Nat. Chem. Biol. 2009. Vol. 5, № 5. P. 308–316.
2. Mur L. A. J., Kenton P., Atzorn R. et al. // Plant Physiol. 2006. Vol. 140, № 1. P. 249–262.
3. Geng X., Cheng J., Gangadharan A., Mackey D. // Plant Cell. 2012. Vol. 24, № 11. P. 4763–4774.
4. Николайчик Е. А., Овчинникова Т. В., Валентович Л. Н. и др. // Докл. НАН Беларуси. 2005. Т. 49, № 5. С. 81–85.
5. Николайчик Е. А., Кулик Е. В., Бадалян О. А. и др. // Докл. НАН Беларуси. 2012. Т. 56, № 1. С. 112–117.
6. Бадалян О. А., Николайчик Е. А. // Докл. НАН Беларуси. 2013. Т. 57, № 6. С. 75–81.
7. Liu Y., Schiff M., Dinesh-Kumar S. P. // Plant J. 2002. Vol. 31, № 6. P. 777–786.
8. Николайчик Е. А., Хомская Л. Л., Игнатенко Е. И. // Тр. БГУ. 2009. Т. 4. С. 197–204.
9. Pfaffl M. W., Horgan G. W., Dempfle L. // Nucleic Acids Res. 2002. Vol. 30, № 9. P. e36.
10. Romeis T., Piedras P., Zhang S. et al. // Plant Cell. 1999. Vol. 11, № 2. P. 273–287.
11. Samuel M. A., Hall H., Krzymowska M. et al. // Plant J. 2005. Vol. 42, № 3. P. 406–416.
12. Sharma P. C., Ito A., Shimizu T. et al. // Mol. Genet. Genomics. 2003. Vol. 269, № 5. P. 583–591.
13. Seo S., Katou S., Seto H. et al. // Plant J. 2007. Vol. 49, № 5. P. 899–909.
14. Seo S., Okamoto M., Seto H. et al. // Science. 1995. Vol. 270, № 5244. P. 1988–1992.
15. Truman W., Bennett M. H., Kubigsteltig I. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2007. Vol. 104, № 3. P. 1075–1080.
16. Ren D., Liu Y., Yang K. Y. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. 2008. Vol. 105, № 14. P. 5638–5643.

O. A. BADALYAN, Y. A. NIKOLAICHUK

MAP KINASES SIPK AND WIPK OF *NICOTIANA BENTHAMIANA* ARE REQUIRED FOR ALTERATION OF SYSTEMIC IMMUNE REACTIONS DURING INFECTION BY *PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM*

Summary

It was measured systemic changes in expression levels of pathogenesis related genes in *Nicotiana benthamiana* plants infected by *Pectobacterium carotovorum*. Contrary to the situation in infected leaves, we have observed no induction of *PR* genes in systemic tissues. Moreover, expression of four *PR* genes was significantly decreased. Virus induced silencing of the *SIPK* and *WIPK* genes in *N. benthamiana* has shown that these genes are required for the observed suppression effect.