

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНА *dspE* У *ERWINIA CAROTOVORA* SUBSP. *ATROSEPTICA*

Л.Н.Валентович, Е.А.Николайчик, А.Н.Евтушенков.

Белорусский государственный университет, г. Минск, Беларусь, leony@bio.bsui.by

Система секреции третьего типа (ССТТ) используется многими фитопатогенными и симбиотическими бактериями для контроля взаимодействия с растением-хозяином. Ранее нами было показано, что инактивация этой секреторной системы у бактерий *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Eca*), патогена картофеля, снижает их вирулентность на растениях-хозяевах и делает их неспособными индуцировать реакцию гиперчувствительности (РГ) на растениях бобов. Известно, что у бактерий *Pseudomonas syringae* и *Xanthomonas campestris* ССТТ необходима для транслокации в клетки растений бактериальных эффекторных белков – непосредственных индукторов РГ. Эффекторные белки, являющиеся индукторами РГ, делают бактерии авирулентными на растениях, не являющихся для них хозяевами, поэтому такие эффекторы часто называют Avr-белками. Поскольку инактивация ССТТ у бактерий *Eca* лишает их способности индуцировать РГ, можно было предположить, что и у этих бактерий имеются эффекторные белки, транслокация которых в клетки растений оказывается нарушенной при инактивации ССТТ. В недавно опубликованной (июль 2004 г.) геномной последовательности штамма SCRI1043 *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* всего один белок (*DspE*) аннотирован как «предполагаемый белок авирулентности». Этот белок имеет значительную гомологию с *DspE* *Erwinia amylovora* (39,38%), а также с белком авирулентности *AvrE* *Pseudomonas syringae* (28,32%).

Цель нашей работы – определить участие *DspE* в индукции реакции гиперчувствительности у растений в ответ на внедрение патогена, а также изучить роль данного белка в вирулентности на растениях-хозяевах (картофеле). Полученные результаты позволят в дальнейшем более полно представлять процесс взаимодействия фитопатогена с хозяином и послужат для получения новых устойчивых сортов картофеля, как традиционными методами селекции, так и путём создания трансгенных растений.

Фрагмент гена *dspE* и прилегающая ДНК из штамма *Eca* 3-2 были амплифицированы с использованием праймеров 5' GTATTTGGCGTTCGACRTTCACYTGTARRTT 3' и 5' ACGAATTCTTGGCTGTTYTTNCSTATNGTCTG 3', сделанных на основе присутствующих в базах данных последовательностей генов *dspE* и *hrpW* из различных бактерий. ПЦР-продукт размером 2.2 т.н.п. был клонирован в pUC19 по сайтам *EcoRI*-*SalI*. Наличие фрагмента гена *dspE* в клонированном участке хромосомы было подтверждено определением последовательности ~ 600 нуклеотидов со стороны сайта *EcoRI* вектора.

Плазмида для инсерционной инактивации гена *dspE* была получена путем инсерции *AvaI*-*EcoRI* фрагмента плазмиды pZH430 размером около 320 п.н., содержащего фрагмент *dspE*, в суицидный вектор pJP5603 по сайтам *SmaI* и *EcoRI* ("липкий" *AvaI*-конец был затуплен с помощью полимеразы Клёнова). Поскольку основанная на репликоне R6K векторная плазмида pJP5603 неспособна реплицироваться в клетках *Eca*, все отобранные по плазмидному маркеру канамицинрезистентности клоны должны являться результатом интеграции плазмиды в хромосому за счет одиночного кроссинговера между гомологичными последовательностями хромосомной копии *dspE* и фрагмента этого гена, расположенного на плазмиде. В результате такой инсерции в хромосоме вместо одной

функциональной копии *dspE* появляется две дефектных – одна без начала этого гена, а другая без конца. Наличие искомой инсерции у сконструированного таким образом мутанта по гену *dspE* (штамм VKE) было подтверждено при помощи ПЦР.

Для получения полноразмерного гена *dspE* хромосомная ДНК из штамма VKE была обработана рестриктазой *Bsu15I*, а образовавшиеся фрагменты были залигированы сами на себя и электропорированы в клетки *E. coli* BW19851. Высев производился на селективную среду с канамицином, т.е. вёлся отбор тех клеток, в которые попала плаزمида pJP5603 и близлежащие области хромосомной ДНК. Таким образом удалось клонировать фрагмент гена *dspE* размером 3 т.п.о., что было подтверждено определением нуклеотидной последовательности.

В дальнейшем планируется клонировать полноразмерный ген *dspE*, а также подробно изучить функциональные домены белка, участвующие в индукции защитных систем и вирулентности.