

ИНДУКЦИЯ И СУПРЕССИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА РАСТЕНИЙ БАКТЕРИАЛЬНЫМ ПАТОГЕНОМ *PESTOVACTERIUM CAROTOVORUM*

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь



Николайчик Евгений Артурович, кандидат биологических наук, доцент кафедры молекулярной биологии Белорусского государственного университета

e-mail: nikolaichik@bsu.by

Научные интересы: молекулярные механизмы взаимодействия фитопатогенов с растениями, биоинформатика.

Введение

Для выживания организма в среде, насыщенной разнообразными патогенами, критично быстрое обнаружение опасности и активация соответствующих защитных механизмов. Универсальный способ детекции патогенов эукариотическими организмами (как растениями, так и животными) заключается в использовании мембранных (реже цитоплазматических) рецепторов, специфичных к определенным молекулам, характерным для патогена, или к молекулам, возникающим вследствие атаки патогеном организма хозяина и разрушения каких-либо молекул в клетках хозяина (чаще всего полимеров клеточной стенки). Для того, чтобы такой механизм был эффективным, распознаваемые молекулы должны быть консервативными и характерными для патогена. Такие молекулы получили название молекулярных образов (molecular patterns), и в зависимости от происхождения обозначаются MAMP, PAMP (microbe- или pathogen-associated molecular pattern) или DAMP (damage-associated molecular pattern) [1].

Детекция молекулярных образов осуществляется рецепторами, получившими обозначение PRR (pattern recognition receptor). В большинстве случаев такие рецепторы являются киназами из нескольких семейств. В том случае, когда рецептор не обладает киназной активностью, он обычно формирует гетеродимер с функциональной киназой. Распознавание патогена при помощи PRR активирует ряд защитных реакций, в конечном итоге приводящих к предотвращению (или существенному ограничению) развития инфекции. Такой комплекс иммунных реакций получил обозначение PAMP-активируемый иммунитет, или PTI (PAMP-triggered immunity) [2].

PTI выступает в качестве одного из первых барьеров на пути большинства патогенов, и для успешной колонизации организма хозяина патогену необходимо этот барьер преодолеть. Эта задача решается путем доставки в клетки хозяина эффекторных белков патогена, тем или иным способом блокирующих PTI. В свою очередь, клетки организма хозяина могут детектировать эффекторные белки патогена (либо индуцированные эффектором изменения в структуре/функции своих собственных белков), запуская уже эффектор-активируемую устойчивость, или ETI (effector-triggered immunity) [2]. Такая детекция осуществляется цитоплазматическими, реже мембранными (но отличными от PRR), рецепторами. Характерным признаком ETI часто (но не всегда) является развитие реакции сверхчувствительности (SCЧ) – программируемой гибели клеток в месте первичного проникновения патогена и последующая активация системной приобретенной устойчивости (SAR) [3]. Считается, что быстро развивающаяся реакция сверхчувствительности является эффективным средством защиты от биотрофных патогенов. Некротрофы, наоборот, могут извлечь пользу от этой реакции, поскольку они в любом случае убивают клетки растения, используя продукцию набора гидролитических ферментов и токсинов [4].

ETI является более сильной реакцией, чем PTI, однако зависит от детекции специфического эффектора. В отличие от PAMP/MAMP/DAMP, которые являются

консервативными, и любое изменение которых снизит жизнеспособность патогена, существенное изменение или даже утрата одного эффектора не является критичной для патогена (из-за присутствия большого числа эффекторов, по крайней мере частично дублирующих друг друга). Такая ситуация приводит к своеобразной эволюционной "гонке вооружений" между патогеном и его хозяином. За счет присутствия в геномах большинства растений большого количества генов (от 500 до нескольких тысяч) упомянутых выше рецепторов, различные рекомбинационные механизмы с высокой частотой генерируют новые версии этих генов, кодирующие рецепторы с измененной специфичностью. С другой стороны, патогены легко утрачивают утраченные хозяевами эффекторы и приобретают новые (например, за счет горизонтального переноса) [5].

Детали взаимодействия с растением довольно сильно отличаются у патогенов с разным стилем жизни. Биотрофы обычно имеют широкий спектр эффекторов, что позволяет им надежно блокировать (а часто даже перенастраивать в свою пользу) иммунную систему хозяина, не допуская гибели его клеток. Механизмы манипуляций биотрофами иммунной системой хозяина довольно хорошо изучены. Некротрофы имеют ограниченное число эффекторов и индуцируют быструю гибель клеток хозяина в месте контакта по различным механизмам, в том числе и за счет эксплуатации ЕП. В целом механизмы взаимодействия некротрофных патогенов с растениями изучены гораздо хуже, чем для биотрофов. Ниже представлен краткий обзор основных принципов молекулярной сигнализации между некротрофным бактериальным патогеном *Pectobacterium carotovorum* (*Pca*) и растениями семейства пасленовых с акцентом на работы, выполненные на кафедре молекулярной биологии БГУ.

Факторы вирулентности *Pectobacterium carotovorum*

Бактерии рода *Pectobacterium* – факультативные патогены, разные штаммы которых способны вызывать заболевания у различных видов растений, в том числе важнейших сельскохозяйственных культур, во многих случаях нанося значительный экономический ущерб. Основной тип заболеваний, вызываемый этими бактериями – мягкие (или мокрые) гнили преимущественно подземных частей растений, но некоторые штаммы *Pectobacterium* могут вызывать характерные заболевания и надземных частей растения, например «черную ножку» стеблей картофеля.

Pectobacterium является типичным представителем семейства *Enterobacteriaceae*, имеет относительно большой геном (около 5 млн. н. п.), обладает обширными метаболическими возможностями и соответствующими регуляторными системами, позволяющими этой бактерии вести сапрофитное существование, а при появлении растения-хозяина и наличии подходящих условий активировать экспрессию довольно большого количества факторов вирулентности и переключаться на паразитический образ жизни.

Классификация видов внутри рода *Pectobacterium* за последние годы претерпела существенные изменения, однако ее до сих пор нельзя назвать устоявшейся. Пектолитические энтеробактерии долгое время входили в один род *Erwinia* вместе с непектолитическими, однако затем сначала были выделены в отдельный род *Pectobacterium* [6], из которого бывшие *Erwinia chrysanthemi* были выделены в новый род как *Dickeya dadantii* [7], а вид *Pectobacterium carotovorum* был разбит на четыре: *P. carotovorum*, *P. atrosepticum*, *P. betavasculorum* и *P. wasabiae* [8]. Однако сравнение опубликованных к настоящему времени нескольких полных геномных последовательностей *P. carotovorum* (коды доступа в GenBank ABVY00000000, ABVX00000000, CP001657, CP003776, *P. atrosepticum* (BX950851), и *P. wasabiae* (NC_013421, AKVS00000000) показывает высокую степень сходства этих геномов, а также сопоставимость внутривидовых различий с межвидовыми. В этой связи можно предполагать, что большинство определяющих вирулентность свойств этих видов бактерий будут сходными. Важным исключением является полное отсутствие генов системы секреции III типа в геноме *P. wasabiae* [9].

Характерной особенностью бактерий рода *Pectobacterium* является продукция и секреция набора гидролитических ферментов, предназначенных для разрушения клеточной

стенки растений. Важнейшими из этих ферментов являются пектолитические (пектатлиазы и полигалактуроназы), поскольку именно они в конечном итоге приводят к гибели растительных клеток, обуславливая характерные симптомы поражения (размягчение пораженных тканей растения), и открывают патогену доступ к питательным ресурсам организма хозяина. Стандартный набор пектолитических ферментов для пектобактерий состоит из десяти пектатлиаз, четырех полигалактуроназ, одной пектинлиазы и одной пектинметилэстеразы [10]. Важную роль в разрушении клеточной стенки растения и вирулентности *Pectobacterium* играют также секретлируемые этими бактериями целлюлазы (и гемицеллюлазы) [11], а также протеазы [12]. Таким образом, *Pectobacterium* являются типичными некротрофами, для успешного распространения которых в организме растения-хозяина требуется гибель клеток последнего.

Широкий спектр продуцируемых *Pca* гидролитических ферментов, в каждом классе которых обычно присутствует по несколько изоформ [13] определяет способность этого патогена разрушать клеточные стенки и вызывать заболевания многих растений. Однако, несмотря на то, что круг растений-хозяев *Pca* довольно широк, он все-таки ограничен. Даже родственные растения в пределах одного семейства могут обладать существенно различающейся устойчивостью к инфекции этим патогеном. Кроме того, разные штаммы *Pca* существенно отличаются по спектру поражаемых растений. Так, бактерии выделенного в Беларуси штамма *Pca* 3-2 [14] являются патогеном картофеля *Solanum tuberosum*, а по отношению к другим видам пасленовых менее вирулентны (*Solanum lycopersicum*, *Nicotiana benthamiana*) или авирулентны (*Capsicum annuum*, *Nicotiana tabacum*).

Системы секреции белков являются ключом к патогенности *Pca*. Эти бактерии – одни из немногих, имеющих все шесть известных бактериальных секреторных систем [10]. Вклад в патогенные свойства этих бактерий четко показан для систем секреции I, II и III типа.

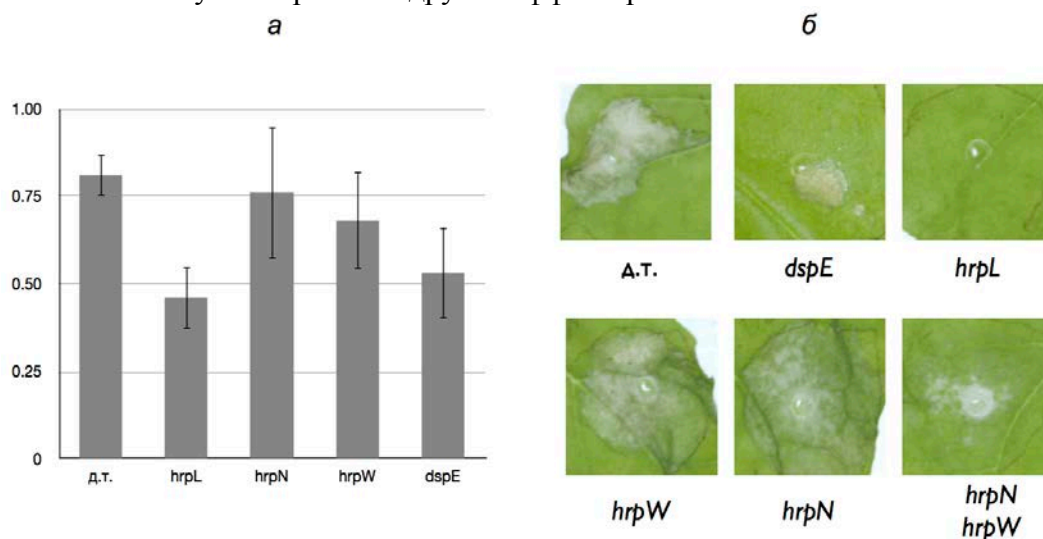
Система секреции I типа состоит всего из трех белков и используется для секреции протеаз и адгезинов [12, 15]. Доставка большинства гидролитических ферментов *Pca* к месту действия осуществляется системой секреции II типа (СС2Т). Это значительно более сложная система, состоящая из 13 компонентов, ответственных за транспорт через внешнюю мембрану, и зависящая от Sec-аппарата транспорта через цитоплазматическую мембрану [16]. Инактивация этой секреторной системы у бактерий *Pca* 3-2 полностью блокирует секрецию нескольких изоформ пектатлиаз, полигалактуроназ и целлюлаз и существенно снижает вирулентность *Pca* на вегетирующих растениях картофеля [17].

Следует отметить, что экспрессия как СС2Т, так и большинства ее субстратов зависят от плотности бактериальной популяции, в результате чего большинство гидролаз секретруется бактериями *Pca* только при достаточно высокой плотности бактериальной популяции (10^7 клеток/мл и выше) [18]. В результате такого контроля основные факторы вирулентности *Pca* явно не могут играть существенной роли на ранних этапах развития заболевания.

Исследования бактерий *Pca* 3-2 показывают более существенную роль в начале инфекции растений другого секреторного аппарата этих бактерий, системы секреции третьего типа (СС3Т), и транспортируемых с ее помощью белков. Из трех рассматриваемых здесь секреторных систем СС3Т имеет наиболее сложную организацию и состоит у *Pectobacterium* из 21 структурного и четырех регуляторных белков [19]. Эта секреторная система довольно хорошо изучена у биотрофных патогенов (таких как, например, *Pseudomonas syringae*), у которых она отвечает за доставку до 30 эффекторных белков непосредственно в клетки растений. Большая часть эффекторов *P. syringae* так или иначе модифицирует работу иммунной системы растения-хозяина в пользу патогена. Бактерии *Pca* имеют функциональную СС3Т, но очень ограниченный набор ее субстратов, причем роль этой секреторной системы у этой бактерии по-прежнему остается не совсем ясной.

Инактивация генов, кодирующих компоненты секреторной системы III типа, существенно снижает вирулентность бактерий *Pca* в растении-хозяине [20, 21] и препятствует индукции реакции сверхчувствительности у растений табака [22] (рисунок 1).

Анализ геномов семи штаммов *Pectobacterium* позволяет идентифицировать всего шесть генов потенциальных субстратов, из которых пять (*hrpN*, *hrpW*, *hrpA*, *hrpJ*, *hrpK*) кодируют внеклеточные компоненты секреторного аппарата, скорее всего участвующие в транспорте эффекторов в клетки растений, и лишь один (*dspE*) – потенциальный эффекторный белок. Для штамма *Pca* 3-2 нам удалось показать ССЗТ-зависимую секрецию белков HrpN [23], HrpW [24] и HrpJ [25], а также доставку в клетки растений белка DspE [26]. Белки HrpN и HrpJ, очевидно, являются вспомогательными внеклеточными компонентами аппарата ССЗТ (хелперами), участвующими в транспорте эффектора DspE в клетки растений [22]. DspE сегодня остается единственным известным эффектором этой бактерии, однако ряд данных свидетельствует в пользу наличия дополнительных эффекторных белков у бактерий *Pca*. В частности, инактивация гена *dspE* не лишает полностью бактерии *Pca* способности индуцировать РСЧ у растений табака – при большем количестве клеток *dspE*-мутант, в отличие от мутантов с полностью инактивированной ССЗТ, все же индуцирует РСЧ, что предполагает наличие у бактерий *Pca* других эффекторов.



а – масса пораженных мягкой гнилью тканей клубней картофеля (г.) через 48 ч после инокуляции суспензиями клеток *Pca* дикого типа (д.т.) и мутантами по указанным генам ССЗТ (среднее $\pm 95\%$ -ный доверительный интервал)

б – симптомы, индуцируемые бактериями *Pca* дикого типа (д.т.) и мутантами по указанным генам ССЗТ через 24 ч после инфильтрации листьев *N. benthamiana*

Рисунок 1 – Инактивация ССЗТ или отдельных ее субстратов снижает вирулентность *Pectobacterium carotovorum*

Интересно, что не все штаммы *Pectobacterium* имеют функциональную ССЗТ. По крайней мере часть штаммов, выделяемых из пораженных растений картофеля в конце вегетационного сезона, этой секреторной системы не имеет [27], но тем не менее способна вызывать заболевания картофеля. Первоначально такие штаммы относили к *P. carotovorum*, однако теперь они классифицируются как *P. wasabiae* [9]. Поскольку тщательное сравнение геномов *P. wasabiae* с геномами *P. carotovorum* и *P. atrosepticum* показывает, что все известные факторы вирулентности за исключением ССЗТ у *P. wasabiae* присутствуют [9], способность этих бактерий вызывать при искусственном заражении картофеля симптомы, аналогичные индуцируемым *P. carotovorum*, ставит вопрос о важности ССЗТ в патогенности *Pectobacterium*. Проверка вирулентности производных штамма *Pca* 3-2 с инактивированными генами ССЗТ и ее субстратов показала, что ССЗТ-зависимая доставка эффекторов в клетки растений повышает вирулентность *Pca* при плотности инокулирующих популяций ниже 10^7 , а при более высокой плотности не играет существенной роли [21]. Такие условия искусственного заражения клубней картофеля соответствуют начальной фазе инфекции. Таким образом, ССЗТ и доставляемые с ее помощью эффекторы играют важную

роль при становлении инфекции, а после начала массивной продукции гидролитических ферментов ее роль может быть минимальной.

Помимо перечисленных выше бактерии *Pca* имеют и другие свойства, определяющие их патогенность – подвижность, способность продуцировать сидерофоры, экзополисахариды, синтезировать поверхностные структуры, ответственные за адгезию и т.д. [28, 29].

Таким образом, бактерии *Pca* имеют довольно большое количество факторов вирулентности, каждый из которых вносит относительно небольшой вклад в общую приспособленность патогена к растению-хозяину. Как правило, инактивация какого-то одного фактора лишь частично снижает вирулентность *Pca*, что может быть заметно лишь в определенных условиях. С другой стороны, инактивация секреторных систем II или III типа существенно снижает вирулентность, поскольку препятствует доставке к месту действия целого комплекса факторов вирулентности.

Детекция *Pectobacterium carotovorum* и активация иммунитета растениями

Детекция патогенов растениями возможна либо за счет распознавания молекул, характерных для патогена (РАМР/МАМР или эффекторов) или за счет обнаружения модификации каких-либо молекул в клетках растения-хозяина и появления DAMP. Результатом такой детекции является активация сигнальной цепочки (у растений изученной лишь частично), приводящей в конечном итоге к запуску целого ряда защитных физиологических реакций растения: генерации активных форм кислорода, синтезу фитоалексинов, лигнификации клеточных стенок, отложению каллозы и синтезу целого ряда PR-белков (pathogenesis-related) и т.д. [30]. Часть генов, ответственных за указанные реакции, традиционно применяются в качестве маркеров иммунного ответа. в нашей работе для этой цели обычно использовалось несколько PR-генов, гены биосинтеза фитоалексинов, а также HSR-гены в качестве специфических маркеров РСЧ.

В качестве механизма специфической детекции растениями некротрофных патогенов, в том числе *Pca*, одной из первых была изучена способность растений реагировать на атаку своей клеточной стенки гидролитическими ферментами патогена. Расщепление полигалактуроната, составляющего основу пектинового матрикса клеточной стенки, пектолитическими ферментами *Pca* в благоприятных для растения условиях идет постепенно, и продукты его частичного гидролиза (с числом галактуроновых остатков 10–12) являются сильными индукторами защитных реакций растений [31, 32]. Такая индукция иммунитета особенно актуальна на ранних стадиях инфекции, когда численность клеток в популяции патогена еще невелика, низка активность пектацелиаза, а количество высвобождающихся элиситорных олигогалактуронатов оказывается максимальным.

Многолетние поиски механизма детекции олигогалактуронатов растениями недавно принесли первые результаты. Было выявлено семейство мембранных рецепторных киназ, взаимодействующих с клеточной стенкой растения, – WAK (wall associated kinases) [33]. Для части из них показана непосредственная связь с пектинами клеточной стенки растения [34], а недавно стали появляться данные о том, что по крайней мере две киназы из этого семейства могут являться непосредственными рецепторами целостности полигалактуронатов клеточной стенки [35, 36], активирующими нижележащие цитоплазматические сигнальные каскады и транскрипцию генов устойчивости. Несмотря на то, что роль WAK при инфекции пектобактериями не была продемонстрирована, имеется одно сообщение о повышенной устойчивости к *Pca* растений *A. thaliana* с резко повышенной экспрессией WAK1 [37].

Олигогалактуронаты, образующиеся в результате атаки пектинов клеточной стенки растения пектацелиазами и полигалактуроназами патогенов, являются типичным примером DAMP, т.е. связанных с повреждением молекулярных образцов. DAMP удобны для детекции растением, поскольку разрушить полимеры клеточной стенки растения без образования какого-то количества олигомеров патоген не может, а структура этих олигомеров константна и не может контролироваться патогеном. Поэтому высвобождение DAMP является надежным сигналом об атаке растения патогеном, однако очевидно, что это не самая ранняя

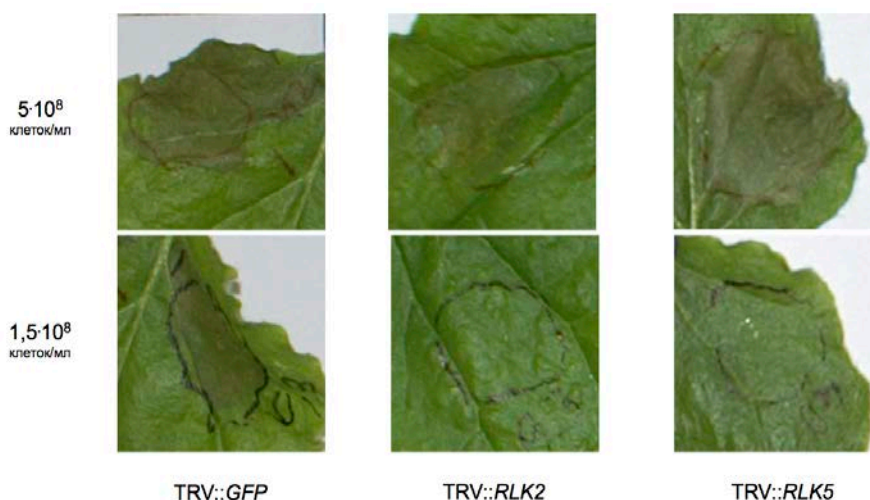
стадия инфекции. В наших исследованиях пасленовые растения реагировали на инфильтрацию бактерий *Pca* в широком диапазоне концентраций, но по-разному. Например, у растений томата наблюдался разный спектр индукции *PR*-генов при концентрациях клеток выше и ниже порога кворум-зависимой активации гидролитических ферментов (10^7 кл/мл), причем при низкой концентрации клеток индукция *PR*-генов является максимальной и требует присутствия ССЗТ, а при более высокой концентрации индукция *PR*-генов была в целом слабее, но возрастала при инактивации ССЗТ [38]. Эти результаты свидетельствуют о том, что детекция бактерий *Pca* растениями может происходить с использованием различных механизмов. Поскольку при высокой концентрации клеток для индукции *PR*-генов участие ССЗТ не требуется, а плотность популяции патогена достаточна для продукции пектолитических ферментов, одним из вероятных механизмов наблюдаемой индукции иммунитета растений томата в таких условиях может быть специфическая детекция растением олигогалактуронатов.

Наиболее сильная иммунная реакция растений при инфекции бактериями *Pca* развивается за счет детекции эффекторного белка DspE. Особенно четко такая реакция заметна при инфильтрации листьев многих видов растений (в том числе картофеля) суспензиями штаммов *Pca* с функциональной ССЗТ и выражается она в быстрой гибели клеток, непосредственно контактирующих с патогеном, что напоминает РСЧ [20, 26]. Первые макроскопические симптомы поражения тканей заметны обычно через 5–7 часов после инфильтрации листьев, а завершается процесс полной гибелью клеток в зоне инфильтрации. Интересно, что такая динамика процесса соответствует кинетике транслокации эффекторного белка DspE в клетки растений, существенное количество которого регистрируется в клетках растений через 4 часа после инфильтрации листьев, а пиковые концентрации достигаются через 6–8 часов [26]. Индукция программируемой гибели клеток растения в результате контакта с бактериями *Pca* сопровождается активацией характерных локальных (в гибнущих клетках и в соседних с ними), а также системных (в неинфицированных частях растения) защитных реакций. В наших экспериментах четко фиксировалась как локальная, так и системная активация экспрессии ряда *PR*-генов, генов биосинтеза фитоалексинов, а также маркеров РСЧ [21, 38, 39]. Локальная индукция этих генов во всех случаях была максимальной в случае использования клеток *Pca* с функциональной ССЗТ и интактным геном *dspE*. Наблюдаемая реакция растений *Solanum lycopersicum* и *Nicotiana tabacum* по всем признакам соответствовала ЕТІ и обеспечивала устойчивость к этому патогену, предотвращая его дальнейшее распространение по растению. Эти результаты предполагают наличие у растений специфического механизма детекции эффекторного белка *dspE*. С другой стороны, у растений *Solanum tuberosum* и *Nicotiana benthamiana* при таких же признаках локальной реакции системный защитный ответ был существенно ослаблен, что позволяло бактериям *Pca* вызывать характерные симптомы заболеваний – мягкую гниль клубней картофеля и мацерацию листьев *Nicotiana benthamiana*, распространяющуюся за пределы зоны инокуляции. Интересно, что в обоих случаях симптомы заболевания были видны только на вторые сутки после заражения. При инфильтрации листьев *N. benthamiana* суспензиями *Pca* через 18–24 часа видимая реакция растений по всем признакам напоминала РСЧ, однако позднее наблюдалась мацерация тканей листа, начинавшаяся с зоны инфильтрации и распространявшаяся за ее пределы. Очевидно, что у растений *N. benthamiana* интенсивность реакции сверхчувствительности является недостаточной для подавления патогена. В таком случае некротрофный патоген способен извлекать выгоду из гибели клеток растения и успешно распространяться за пределы зоны первичного проникновения, используя широкий спектр продуцируемых им гидролитических экзоферментов для разрушения растительных клеточных стенок. Таким образом, события в листьях *N. benthamiana* при их инфицировании бактериями *Pca* напоминают таковые при инфекции клубней картофеля: гибель клеток в зоне непосредственного контакта с патогеном с последующей утилизацией высвобождающихся питательных веществ и распространением инфекции на соседние ткани.

Поскольку работа ССЗТ бактерий *Pca* приводит к очевидной индукции защитных реакций растений, причем белок DspE вносит наиболее весомый вклад в такую индукцию, у устойчивых к этому патогену растений томата и табака (*N. tabacum*) с помощью дрожжевой двухгибридной системы был произведен поиск белков, с которыми взаимодействует единственный известный эффекторный белок *Pca*. В результате нам удалось выявить взаимодействие DspE с цитоплазматическими киназными доменами трех рецепторподобных трансмембранных киназ (две из растений *S. lycopersicum*, одна – из *N. tabacum*), одна из которых была охарактеризована детально [40].

Оценка роли этих киназ во взаимодействии с бактериями *Pca* была произведена с помощью вирус-индуцированного сайленсинга их генов (ВИСГ) [41]. Преимущество этой технологии заключается в том, что при наличии нескольких сходных генов (с высокой вероятностью функционально дублирующих друг друга, по крайней мере частично) ВИСГ позволяет инактивировать все паралогичные гены. Поскольку использованные нами ВИСГ-векторы на основе вируса TRV максимально эффективны для *N. benthamiana*, инактивация генов искомым киназ проводилась именно на этих растениях. Следует отметить, что *N. benthamiana* является аллотетраплоидом, поэтому для каждого гена в геноме можно ожидать присутствия еще одной гомеологичной последовательности, однако ВИСГ должен надежно инактивировать обе копии.

Сходство нуклеотидных последовательностей RLK5 *S. lycopersicum* и *N. tabacum* составляет около 90%, а их сравнение с черновой версией генома *N. benthamiana* [42] показало, что фрагменты последовательностей этих двух генов в ВИСГ-векторах должны инактивировать одну и ту же пару гомеологичных генов *N. benthamiana*. Поэтому в наших экспериментах использовались две ВИСГ-конструкции с фрагментами генов *ntRLK5* и *slRLK2*. У растений с сайленсингом гена любой из двух киназ при инфекции *Pca* наблюдалось четкое отличие от контрольных (зараженных вектором с нейтральной вставкой фрагмента гена *GFP*). При инфильтрации суспензиями клеток *Pca* плотностью $1,5 \cdot 10^8$ кл/мл реакция сверхчувствительности через 24 часа практически не развивалась, а при инфекции суспензиями клеток *Pca* с плотностью в 3 раза выше реакция сверхчувствительности была значительно слабее по сравнению с контрольными растениями (рисунок 2). Более четкий фенотип был у растений с сайленсингом *RLK2*. Интересно, что у растений с сайленсингом этих киназ, в отличие от контрольных, не наблюдалось распространение патогена за пределы зоны инфильтрации.



Растения *N. benthamiana* были заражены указанными ВИСГ-конструкциями за 40 дней до инфильтрации бактериями *Pca*. Фотография сделана через 30 ч после заражения патогеном.

Рисунок 2 – RLK5 и RLK2 необходимы для развития заболевания у растений *N. benthamiana*

Таким образом, наличие функциональных рецепторных киназ RLK2 и RLK5 в растениях *N. benthamiana* способствует развитию обоих фенотипических признаков реакции на инфекцию *Pca*, РСЧ и мацерации тканей листа. Несмотря на то, что RLK2 и RLK5 имеют

некоторое сходство последовательностей киназных доменов, гомология последовательностей их генов не детектируется, следовательно «перекрестный» сайленсинг генов этих двух киназ использованными ВИСГ-конструкциями невозможен (что было подтверждено экспериментально). Частичное сохранение растениями *N. benthamiana* с сайленсингом *RLK2* или *RLK5* способности индуцировать реакцию сверхчувствительности в ответ на контакт с бактериями *Pca* позволяет говорить о дублировании функций этих рецепторов.

Супрессия иммунитета растений бактериями *Pca*

Во многих случаях распознавание патогена и последующая активация иммунитета растений обеспечивается мембранными рецепторными комплексами, состоящими из рецепторной киназы (например, рецептора флагеллина FLS2), специфически распознающей патоген-ассоциированный молекулярный образ (PAMP), и корецептора из SERK-семейства (например, BAK1) [43]. Такой PAMP-индуцируемый иммунитет, однако, не обеспечивает абсолютной защиты от патогенов, поскольку последние имеют разнообразные механизмы преодоления врожденного иммунитета растений-хозяев. Универсальным подходом бактериальных патогенов к решению этой задачи является доставка в клетку растения при помощи системы секреции III типа белков-эффекторов, способных взаимодействовать с компонентами сигнальных цепей растений и нарушать их нормальное функционирование [44]. В большинстве изученных случаев мишенью эффектора является мембранная рецепторная киназа (RLK), расположенная в самом начале сигнальной цепочки. Например, эффекторный белок AvrPto бактерий *Pseudomonas syringae* взаимодействует с рецептором флагеллина FLS2 и универсальным корецептором BAK1, блокируя киназную активность рецепторного комплекса [45]; AvrPtoB, другой эффектор *P. syringae*, является убиквитинлигазой, направляющей на деградацию несколько RLK, включая FLS2, [46]; еще один эффектор *P. syringae*, AvrPphB, является цистеиновой протеазой, ответственной за деградацию как минимум трех связанных с рецепторными комплексами киназ (BIK1, PBL1 и PBL2) [47]. Обрыв сигнальной цепи, ответственной за детекцию *P. syringae*, в самом начале блокирует развитие РТИ и позволяет этому патогену успешно колонизировать растения. Ни один из упомянутых выше способов блокирования сигнальных цепочек растения не описан для некротрофных патогенов, включая *Pca*.

Основной используемый в нашей работе штамм бактерий *Pca* 3-2 оказался слабым индуктором классического варианта РТИ. В тестах на этот защитный ответ [48] штамм дикого типа использовать в качестве индуктора РТИ было невозможно из-за сильной индукции РСЧ, а при использовании ССЗТ-мутанта симптомы оказались слишком нечеткими в сравнении со стандартным индуктором РТИ *Pseudomonas fluorescens*. При использовании родственного штамма *P. atrosepticum* SCRI 1043, не являющегося индуктором РСЧ у растений *N. benthamiana*, симптомов РТИ также не наблюдалось (рис. 3, б), однако инактивация гена *dspE* у этого штамма позволила зарегистрировать типичные симптомы РТИ (рисунок 3а). Эти результаты свидетельствуют в пользу способности *Pectobacterium* преодолевать РТИ и указывают на возможную роль DspE в такой супрессии базового механизма иммунитета (С.В. Кузьмич и Е.А. Николайчик, неопубл.). Интересно, что взаимодействующая с DspE рецепторная киназа RLK2 была необходима для такой реакции (рисунок 3в).

ВИСГ у растений *N. benthamiana* компонентов рецепторного комплекса, ответственных за распознавание наиболее изученного *mapr* флагеллина, рецепторной киназы FLS2 и корецептора BAK1, не оказал никакого влияния на взаимодействие с бактериями *Pca* 3-2. Кроме того, нам не удалось выявить непосредственного взаимодействия DspE с BAK1, что делает маловероятным использование бактериями *Pca* механизма супрессии РТИ, аналогичного таковому биотрофного патогена *P. syringae*.

Эти результаты показывают, что бактерии рода *Pectobacterium* способны супрессировать РТИ за счет доставки белка DspE в клетки растений, однако механизм такой супрессии отличается от описанного для *P. syringae* и пока остается неясным. Кроме того, супрессия РТИ не может являться единственной функцией DspE, поскольку этот белок важен

для вирулентности *Pca*, а в устойчивости растений к этому виду бактерий РТИ играет минимальную роль.



SCRI1043
dspE

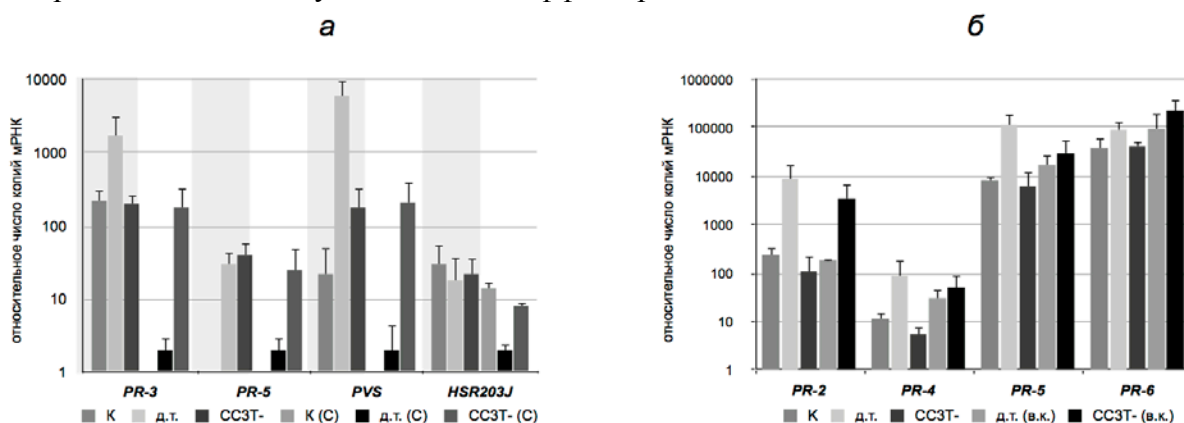
SCRI1043
TRV::GFP

SCRI1043
TRV::RLK2

Листья *N. benthamiana* инфильтрованы суспензией *P. atrosepticum* SCRI 1043 дикого типа или *dspE*-мутанта (нижняя зона инфильтрации), а через 8 часов – суспензией *P. carotovorum* 3-2 (верхняя зона инфильтрации). Фотографии сделаны через 24 ч после второй инфильтрации.

Рисунок 3 – RLK2 участвует в супрессии РТИ белком DspE

Гораздо более четко способность бактерий *Pca* супрессировать иммунный ответ растений проявляется в ходе инфекции клубней картофеля. При взаимодействии *Pca* со своим естественным хозяином наблюдается довольно интересная картина локальных и системных реакций растения. Оценка уровней экспрессии *PR*-генов в интактных и зараженных бактериями *Pca* растениях картофеля продемонстрировала сильную индукцию в зоне инфекции двух *PR*-генов (*PR-3* и *PR-5*) [21], а также гена *PVS*, кодирующего ключевой фермент биосинтеза фитоалексинов (рисунок 4а), но значительно более низкий уровень экспрессии этих генов в непораженных частях растений. При этом ни локальной, ни системной индукции маркеров РСЧ не наблюдалось. При заражении растений мутантами бактерий *Pca* по гену *dspE* или по генам, контролирующим синтез компонентов ССЗТ, наблюдался повсеместно высокий уровень экспрессии *PR*-генов [21]. Следует заметить, что в случае системного ответа растений томата на инфекцию *Pca* по крайней мере для одного *PR*-гена (*PR-2*) также наблюдается явная ССЗТ-зависимая репрессия его транскрипции (рисунок 4б), причем в данном случае этот эффект не зависит от DspE [38], что предполагает наличие у бактерий *Pca* как минимум еще одного эффектора ССЗТ.



а – локальная и системная экспрессия *PR*-генов в клубнях картофеля через 48 ч после инокуляции 0,85%-ным раствором NaCl (К), штаммом *Pca* дикого типа (д.т.) или его *hrpL*-мутантом (ССЗТ-). Для каждого гена приведены данные по экспрессии в зоне контакта с *Pca* (серый фон) и в диаметрально противоположной части клубня (белый фон).

б – системная экспрессия *PR*-генов в настоящих листьях томата через 24 ч после инокуляции семядольных листьев 0,85%-ным раствором NaCl (К), штаммом *Pca* дикого типа (д.т.) или его *hrpL*-мутантом (ССЗТ-). Для каждого гена приведены данные по экспрессии после инокуляции суспензиями низкой и высокой (в.к.) концентраций (10^6 и 10^7 кл/мл соответственно)

Рисунок 4 – *P. carotovorum* блокирует системную экспрессию *PR*-генов у растений картофеля и томата

Эти данные свидетельствуют о том, что доставка при помощи ССЗТ эффекторных белков (в первую очередь DspE) в клетки клубней картофеля и листьев томата стимулирует локальные защитные реакции, но блокирует развитие некоторых системных защитных реакций в организме растения-хозяина. В случае клубней картофеля (естественного хозяина для бактерий *Pca* штамма 3-2) локальный ответ растения, сопровождаемый гибелью его клеток, благоприятен для некротрофного патогена, а супрессия системной защиты способствует последующей колонизации соседних тканей.

Индукция бактериями *Pca* локальных реакций у растений зависит от взаимодействия эффекторного белка DspE с рецепторными киназами RLK2 и RLK5, а предварительные данные свидетельствуют и об участии этих рецепторов в супрессии системных защитных реакций у растений *N. benthamiana*. Так, сайленсинг *RLK2* значительно повышает системную экспрессию генов *PR-5* и *HIN1* у растений *N. benthamiana* после контакта с *Pca* (О.А. Бадалян и Е.А. Николайчик, неопубл.).

Неизученной пока остается сигнальная цепочка, соединяющая RLK2 и RLK5 с наблюдаемыми иммунными реакциями. Использование ВИСГ-технологии на растениях *N. benthamiana* позволило провести оценку участия известных компонентов сигнальных систем растений в детекции *Pca*. Эти эксперименты показали, что во взаимодействии *N. benthamiana* с *Pca* принимают участие SGT1, известный позитивный регулятор клеточной смерти [49], и MAP-киназы SIPK, но не участвуют белки RAR1 и EDS1. Для SGT1 и киназ из МРК3/6 семейства (к которому относится SIPK) достаточно четко продемонстрирована роль ключевых компонентов конвергирующих сигнальных цепей, индуцируемых PAMP/MAMP и эффекторами, и приводящих к активации системной устойчивости к биотрофным патогенам [50–52]. Однако этот механизм защиты от биотрофных патогенов (в основном связанный с активацией салицилатного сигнального пути) неэффективен против некротрофов [4]. Более того, салицилатный сигнальный путь антагонистичен жасмонатному, контролирующему устойчивость к некротрофам [53]. Вполне вероятно, что механизм супрессии иммунных реакций бактериями *Pca* опирается на провоцируемую взаимодействием эффектора DspE с рецепторными киназами RLK2/5 активацию ETI, что блокирует жасмонатный сигнальный путь и приводит к репрессии генов, ответственных за устойчивость к некротрофам, к числу которых принадлежит и *Pca*.

Приведенный здесь краткий обзор полученной в последние годы информации о механизмах взаимодействия бактерий *Pca* с растениями показывает, что распространенное до недавнего времени представление об этой бактерии как о достаточно примитивном оппортунистическом патогене, использующем в основном "грубую силу" своего арсенала гидролитических ферментов для атаки растений в определенных благоприятных условиях является несколько упрощенным. Сейчас все более очевидным становится наличие достаточно тонкой молекулярной сигнализации между *Pca* и их хозяевами, в конечном итоге определяющей успешность заражения этим патогеном или индукцию надежной иммунной реакции растения.

Список литературы

1. Tör, M. Receptor-mediated signalling in plants: molecular patterns and programmes / M. Tör, M.T. Lotze, N. Holton // *Journal of Experimental Botany*. – 2009. – Vol. 60, № 13. – P. 3645–3654.
2. Zhang, J. Plant immunity triggered by microbial molecular signatures / J. Zhang, J.-M. Zhou // *Molecular Plant*. – 2010. – Vol. 3, № 5. – P. 783–793.
3. Durrant, W.E. Systemic acquired resistance / W.E. Durrant, X. Dong // *Annual Review of Phytopathology*. – 2004. – Vol. 42, № 1. – P. 185–209.
4. Glazebrook, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens / J. Glazebrook // *Annual Review of Phytopathology*. – 2005. – Vol. 43, № 1. – P. 205–227.
5. Ingle, R.A. PAMP recognition and the plant–pathogen arms race / R.A. Ingle, M. Carstens, K.J. Denby // *BioEssays*. – 2006. – Vol. 28, № 9. – P. 880–889.

6. Phylogenetic position of phytopathogens within the Enterobacteriaceae / L. Hauben [et al.] // *Syst Appl Microbiol.* – 1998. – Vol. 21, № 3. – P. 384–397.
7. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al. 1953) Brenner et al. 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zeae* sp. nov. / R. Samson [et al.] // *Int J Syst Evol Microbiol.* – 2005. – Vol. 55, № 4. – P. 1415–1427.
8. Gardan, L. Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavasculorum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. / L. Gardan // *Int J Syst Evol Microbiol.* – 2003. – Vol. 53, № 2. – P. 381–391.
9. Revised Phylogeny and Novel Horizontally Acquired Virulence Determinants of the Model Soft Rot Phytopathogen *Pectobacterium wasabiae* SCC3193 / J. Nykyri [et al.] // *PLoS Pathog.* – 2012. – Vol. 8, № 11. – P. E1003013.
10. Niche-specificity and the variable fraction of the *Pectobacterium* pan-genome / J.D. Glasner [et al.] // *Molecular Plant-Microbe Interactions.* – 2008. – Vol. 21, № 12. – P. 1549–1560.
11. Walker, D.S. The major secreted cellulase, CelV, of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* is an important soft rot virulence factor / D.S. Walker, P.J. Reeves, G.P.C. Salmond // *Molecular Plant-Microbe Interactions.* – 1994. – Vol. 7, № 3. – P. 425–431.
12. Isolation of an extracellular protease gene of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* strain SCC3193 by transposon mutagenesis and the role of protease in phytopathogenicity / R. Marits [et al.] // *Microbiology.* – 1999. – Vol. 145 (pt 8). – P. 1959–1966.
13. Шевчик, В.Е. Изоферменты внеклеточных пектатлиаз бактерий рода *Erwinia* / В.Е. Шевчик, А.Н. Евтушенков, Ю.К. Фомичев // *Биохимия.* – 1988. – Т. 53, № 10. – С. 1628–1638.
14. Лысак, В.В. Бактериоцины бактерий рода *Erwinia*: Дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07. / В.В. Лысак – Минск, БГУ – 1983. – 159 с.
15. A multi-repeat adhesin of the phytopathogen, *Pectobacterium atrosepticum*, is secreted by a Type I pathway and is subject to complex regulation involving a non-canonical diguanylate cyclase / D. Pérez-Mendoza [et al.] // *Molecular microbiology.* – 2011. – Vol. 82, № 3. – P. 719–733.
16. Molecular cloning and characterization of 13 out genes from *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*: genes encoding members of a general secretion pathway (GSP) widespread in gram-negative bacteria / P.J. Reeves [et al.] // *Mol Microbiol.* – 1993. – Vol. 8, № 3. – P. 443–456.
17. Бабицкая, Е.В. Характеристика мутантов бактерий *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* 3-2 с нарушенной секрецией пектатлиазы / Е.В. Бабицкая, А.Г. Песнякевич, Е.А. Николайчик // *Прикладная биохимия и микробиология.* – 1995. – Т. 31, № 4. – С. 447–452.
18. Pérombelon, M.C.M. Potato diseases caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis / M.C.M. Pérombelon // *Plant Pathology.* – 2002. – Vol. 51, № 1. – P. 1–12.
19. Sample sequencing of a selected region of the genome of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* reveals candidate phytopathogenicity genes and allows comparison with *Escherichia coli* / K.S. Bell [et al.] // *Microbiology.* – 2002. – Vol. 148, № 5. – P. 1367–1378.
20. 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, № Sp.issue 2. – P. 523–527.
21. 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 // *Труды БГУ.* – 2009. – Т. 4 – С. 197–204.
22. Анализ роли внеклеточных компонентов системы секреции III типа *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* в транслокации белковых факторов вирулентности бактерий в клетки растений / Е.А. Николайчик [и др.] // *Труды БГУ.* – 2008. – Т. 2 – С. 200–213.

23. Сравнительная характеристика харпинов HrpN бактерий *Erwinia carotovora* и *Erwinia amylovora* / Е.А. Николайчик [и др.] // Докл. НАН Б. – 2007. – Т. 51, № 3. – С. 81–85.
24. Лагоненко, А.Л. Характеристика харпина HrpW бактерий *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. / А.Л. Лагоненко, Е.А. Николайчик, А.Н. Евтушенко // Докл. НАН Б. – 2006. – Т. 50, № 1. – С. 70–73.
25. Характеристика белка HrpJ, компонента системы секреции III типа бактерий *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* / А.Л. Лагоненко [и др.] // Доклады НАН Беларуси. – 2004. – Т. 48, № 5. – С. 74–78.
26. Белок DspE транслируется фитопатогенными бактериями *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* в клетки *Nicotiana tabacum* и является необходимым для индукции реакции гиперчувствительности / Е.А. Николайчик [и др.] // Докл. НАН Б. – 2005. – Т. 49, № 5. – С. 81–85.
27. Phylogeny and virulence of naturally occurring type III secretion system-deficient *Pectobacterium* strains / H.-S. Kim [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. – 2009. – Vol. 75. – P. 4539–4549.
28. Perombelon, M.C.M. Potato diseases caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis / M.C.M. Perombelon // Plant Pathol. – 2002. – Vol. 51, № 1 – P. 1–12.
29. Toth, I.K. Comparative genomics reveals what makes an enterobacterial plant pathogen / I.K. Toth, L. Pritchard, and P.R. Birch // Annu Rev Phytopathol. – 2006. – Vol. 44. – P. 305–336.
30. Desender, S. Activation of defence reactions in Solanaceae: where is the specificity? / S. Desender, D. Andrivon, F. Val // Cellular Microbiology. – 2007. – Vol. 9, № 1. – P. 21–30.
31. Host-pathogen interactions: XXII. A galacturonic acid oligosaccharide from plant cell walls elicits phytoalexins / E.A. Nothnagel [et al.] // Plant Physiology. – 1983. – Vol. 71, № 4. – P. 916–926.
32. Forrest, R.S. Substrate degradation patterns of polygalacturonic acid lyase from *Erwinia carotovora* and *Bacillus polymyxa* and release of phytoalexin-eliciting oligosaccharides from potato cell walls / R.S. Forrest, G.D. Lyon // Journal of Experimental Botany. – 1990. – Vol. 41, № 4. – P. 481–488.
33. WAKs: cell wall-associated kinases linking the cytoplasm to the extracellular matrix / C.M. Anderson [et al.] // Plant Mol. Biol. – 2001. – Vol. 47, № 1 – P. 197–206.
34. Decreux, A. Wall-associated kinase WAK1 interacts with cell wall hemicelluloses in a calcium-induced conformation / A. Decreux, J. Messiaen // Plant and Cell Physiology. – 2005. – Vol. 46, № 2. – P. 268–278.
35. Pectin activation of MAP kinase and gene expression is WAK2 dependent / B.D. Kohorn [et al.] // The Plant Journal. – 2009. – Vol. 60, № 6. – P. 974–982.
36. A domain swap approach reveals a role of the plant wall-associated kinase 1 (WAK1) as a receptor of oligogalacturonides / A. Brutus [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2010. – Vol. 107, № 20. – P. 9452.
37. Engineering plant resistance by constructing chimeric receptors that recognize damage-associated molecular patterns (DAMPs) / G. De Lorenzo [et al.] // FEBS Letters. – 2011. – Vol. 585, № 11. – P. 1521–1528.
38. Чжан, Я. Зависимость иммунного ответа растений *Solanum lycopersicum* от численности клеток *Pectobacterium carotovorum* / Я. Чжан, Е.А. Николайчик // Известия НАН Беларуси. – 2012. – № 3. – С. 44–48.
39. Николайчик, Е.А. Системная индукция PR-генов растений *Solanum lycopersicum* при контакте с бактериями *Pectobacterium carotovorum*: роль гена *dspE* / Е.А. Николайчик // Труды БГУ. – 2009. – Т. 4, № 2. – С. 215–219.
40. Роль рецептороподобной трансмембранной киназы растений семейства пасленовых во взаимодействии с фитопатогеном *Pectobacterium carotovorum* / Е.А. Николайчик [и др.] // Доклады НАН Беларуси. – 2012. – Т. 56, № 1. – С. 112–117.
41. Baulcombe, D.C. Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing / D.C. Baulcombe // Current Opinion in Plant Biology. – 1999. – Vol. 2, № 2. – P. 109–113.

42. A draft genome sequence of *Nicotiana benthamiana* to enhance molecular plant-microbe biology research / A. Bombarely [et al.] // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. – 2012. – Vol. 25, № 12. – P. 1523–1530.
43. A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence / D. Chinchilla [et al.] // *Nature*. – 2007. – Vol. 448, № 7152. – P. 497–500.
44. Block, A. Plant targets for *Pseudomonas syringae* type III effectors: virulence targets or guarded decoys? / A. Block, J.R. Alfano // *Current Opinion in Microbiology*. – 2011. – Vol. 14, – P. 39–46.
45. *Pseudomonas syringae* effector AvrPto blocks innate immunity by targeting receptor kinases / T. Xiang [et al.] // *Current Biology: CB*. – 2008. – Vol. 18, № 1. – P. 74–80.
46. A tomato LysM receptor-like kinase promotes immunity and its kinase activity is inhibited by AvrPtoB / L. Zeng [et al.] // *The Plant Journal*. – 2011. – Vol. 69, № 1. – P. 92–103
47. Receptor-like cytoplasmic kinases integrate signaling from multiple plant immune receptors and are targeted by a *Pseudomonas syringae* effector / J. Zhang [et al.] // *Cell Host & Microbe*. – 2010. – Vol. 7, № 4. – P. 290–301.
48. Chakravarthy, S. Assay for pathogen-associated molecular pattern (PAMP)-triggered immunity (PTI) in plants / S. Chakravarthy, A.C. Velásquez, G.B. Martin // *Journal of Visualized Experiments: JoVE*. – 2009. – № 31. – P. e1442.
49. SGT1 positively regulates the process of plant cell death during both compatible and incompatible plant-pathogen interactions / K. Wang [et al.] // *Molecular Plant Pathology*. – 2010. – Vol. 11, № 5. – P. 597–611.
50. Tsuda, K. Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity / K. Tsuda, F. Katagiri // *Current Opinion in Plant Biology*. – 2010. – Vol. 13. – P. 459–465.
51. Sgt1, but not Rar1, is essential for the RB-mediated broad-spectrum resistance to potato late blight / P. Bhaskar [et al.] // *BMC Plant Biology*. – 2008. – Vol. 8, № 1. – P. 8.
52. Segonzac, C. Hierarchy and roles of PAMP-induced responses in *Nicotiana benthamiana* / C. Segonzac [et al.] // *Plant Physiology*. – 2011. – Vol. 156, № 2. – P. 687–699.
53. Pozo, M.J. Jasmonates – signals in plant-microbe interactions / M.J. Pozo, L.C. Loon, C.M.J. Pieterse // *Journal of Plant Growth Regulation*. – 2005. – Vol. 23, № 3. – P. 211–222.

INDUCTION AND SUPPRESSION OF PLANT IMMUNE RESPONSE BY BACTERIAL PATHOGEN *PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM*

Y.A. Nikolaichik

Belarusian State University, Minsk, Belarus

This paper provides comparative review of recent advances in studies of Solanaceae plants interaction with necrotrophic pathogen *Pectobacterium carotovorum* with specific accent on the research carried out in the Belarusian State University. First, known virulence factors of *P. carotovorum* are briefly reviewed with emphasis on the type II and III secretion systems and their substrates. Then, possible ways of *P. carotovorum* detection by plants are discussed. There are clearly several modes of *P. carotovorum* recognition, one of which depends on the effector proteins delivered into plant cells via the type III secretion system (T3SS). DspE appears to directly interact with at least two receptor-like kinases from tomato and tobacco. Virus-induced gene silencing of those two receptor kinases in *Nicotiana benthamiana* blocks disease symptom development. T3SS-deficient *P. carotovorum* mutants still induce quite strong immune reactions in *Solanaceae* plants and there is some evidence that T3SS is responsible for partial suppression of plant immune response to contact with *P. carotovorum*. This suppression depends on DspE in *S. tuberosum*, but another effector protein might be involved in *S. lycopersicum*. The varying plant reaction to PAMPs/DAMPs produced by different strains of *Pectobacterium* is noted. The involvement of the known plant signaling proteins in recognition of *P. carotovorum* and activation of immune response is also discussed.