
ГЕНЕТИКА И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY

УДК 577.2

9-цис-ЭПОКСИКАРОТИНОИДДИОКСИГЕНАЗА КАК ПЕРЕКЛЮЧАТЕЛЬ СВЯЗАННЫХ С ИММУНИТЕТОМ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ РАСТЕНИЙ *SOLANUM LYCOPERSICUM*

Е. С. СТЕПАНОВА¹⁾, Г. В. КУКРЕШ¹⁾,
Е. А. НИКОЛАЙЧИК¹⁾, А. В. КОЛУБАКО¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

Аннотация. Установлено, что снижение экспрессии гена *NCED3* вызывает уменьшение размеров растений *Solanum lycopersicum* и повышает их восприимчивость к заражению патогеном *Pectobacterium versatile*. Выявлено изменение экспрессии генов салицилатной сигнализации: возросла экспрессия генов сигнального белка NPR5 и защитного белка PR1a. Также отмечено, что повысилась экспрессия генов защитных белков PR3, PR5, PR10 и транскрипционного фактора WRKY65, а экспрессия гена защитного белка PR2 стала чувствительной к штамму патогена.

Образец цитирования:

Степанова ЕС, Кукреш ГВ, Николайчик ЕА, Колубако АВ. 9-цис-Эпоксикаротиноиддиоксигеназа как переключатель связанных с иммунитетом сигнальных путей растений *Solanum lycopersicum*. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2024;2:63–71. EDN: NYDQXM

For citation:

Stepanova ES, Kukresh GV, Nikolaichik YA, Kalubaka NV. 9-*cis*-Epoxycarotenoid dioxygenase as a switch of immunity-related signalling pathways in *Solanum lycopersicum* plants. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2024;2:63–71. Russian. EDN: NYDQXM

Авторы:

Елизавета Сергеевна Степанова – студентка биологического факультета. Научный руководитель – А. В. Колубако.
Глафира Васильевна Кукреш – студентка биологического факультета. Научный руководитель – А. В. Колубако.
Евгений Артурович Николайчик – кандидат биологических наук, доцент; заведующий кафедрой молекулярной биологии биологического факультета.
Анастасия Вячеславовна Колубако – заведующий научно-исследовательской лабораторией трансгенных растений кафедры молекулярной биологии биологического факультета.

Authors:

Elizaveta S. Stepanova, student at the faculty of biology. lisapersi@yandex.by
Glafigra V. Kukresh, student at the faculty of biology. glafigra.kukresh@yandex.by
Yevgeny A. Nikolaichik, PhD (biology), docent; head of the department of molecular biology, faculty of biology. yevgenynikolaichik@gmail.com
Nastassia V. Kalubaka, head of the laboratory of transgene plants, department of molecular biology, faculty of biology. kolubakoav@yandex.by

На основании полученных результатов высказано предположение о том, что ген *NCED3* обеспечивает устойчивость растений томата к пектобактериозу, сдерживая салицилатный сигнальный путь, приводящий к активации реакции сверхчувствительности.

Ключевые слова: 9-цис-эпоксикаротиноиддигидроксигеназа; *Solanum lycopersicum*; *Pectobacterium versatile*; иммунитет растений.

Благодарность. Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Б22М-053).

9-*cis*-EPOXYCAROTENOID DIOXYGENASE AS A SWITCH OF IMMUNITY-RELATED SIGNALLING PATHWAYS IN *SOLANUM LYCOPERSICUM* PLANTS

E. S. STEPANOVA^a, G. V. KUKRESH^a,
Y. A. NIKOLAICHUK^a, N. V. KALUBAKA^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliezhnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

Corresponding author: N. V. Kalubaka (kolubakoav@yandex.by)

Abstract. It has been established that reduced expression of the *NCED3* gene causes a decrease in the size of *Solanum lycopersicum* plants and increases their susceptibility to *Pectobacterium versatile* infection. A change in the expression of salicylate signalling genes was revealed: the expression of the genes for the signalling protein NPR5 and the pathogenesis-related protein PR1a increased. It was also noted that the expression of the genes for the pathogenesis-related proteins PR3, PR5, PR10 and the transcription factor WRKY65 increased, and the expression of the gene for the pathogenesis-related protein PR2 became sensitive to the pathogen strain. Based on the results obtained, it was suggested that the *NCED3* gene provides resistance to pectobacteriosis in tomato plants by inhibiting the salicylate signalling pathway, leading to activation of the hypersensitive response.

Keywords: 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase; *Solanum lycopersicum*; *Pectobacterium versatile*; plant immunity.

Acknowledgements. This work was carried out with financial support from the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (grant No. B22M-053).

Введение

Пектобактерии – некротрофные патогены с широким кругом растений-хозяев. Факторами их вирулентности являются гидролитические ферменты, транспортируемые через систему секреции типа II [1], а также эффекторный белок, доставляемый в клетку растения-хозяина посредством системы секреции типа III и вызывающий изменения в его иммунной сигнализации в свою пользу, что способствует колонизации растения [2]. Пектобактерии выступают возбудителями черной ножки (стеблевой гнили) и мягкой гнили клубней и корнеплодов. Риск развития этих заболеваний повышает переувлажненность (избыточный полив, неблагоприятные погодные условия во время вегетации или нарушение режима хранения клубней). Пектобактериозы продолжают распространяться и регистрироваться в разных частях планеты [3; 4].

Важнейшим гормоном, регулирующим ответную реакцию растений на стрессы абиотической и биотической природы, является абсцизовая кислота. В контексте данного исследования наибольший интерес представляет роль абсцизовой кислоты в развитии заболеваний растений. Она регулирует закрытие устьиц при детекции патогена, что препятствует колонизации растения [5]. Однако патогены способны преодолевать эту защитную реакцию, продуцируя, к примеру, токсин коронатин [6], блокирующий закрытие устьиц и открывающий ворота инфекции.

Абсцизовая кислота регулирует иммунный ответ растений разнонаправленно: в одних случаях запускает защитные реакции, в других случаях подавляет иммунитет. Похоже, что не существует общего механизма регуляции иммунных реакций посредством абсцизовой кислоты. К примеру, в растениях риса она индуцирует устойчивость к некротрофному патогенному грибу *Cochliobolus miyabeanus*, вызывающему коричневую пятнистость [7], но снижает устойчивость к гемиботрофному грибу *Magnaporthe oryzae* [8]. В растениях арабидопсиса абсцизовая кислота подавляет защитный ответ против биотрофного патогена

Blumeria graminis, вызывающего мучнистую росу [9]. С другой стороны, растения арабидопсиса, дефицитные по абсцизовой кислоте, более устойчивы к некротрофному грибному патогену *Botrytis cinerea* [10].

Абсцизовая кислота подавляет активность фениланинаммонийлиазы, фермента пути биосинтеза фенилпропаноидов, к которым относятся многие антибактериальные вещества, в частности фитоалексины. Помимо этого, фенилпропаноидный путь метаболизма участвует в биосинтезе другого гормона иммунного ответа – салициловой кислоты. Также абсцизовая кислота подавляет образование активных форм кислорода, стимулирует отложение каллозы [11]. Сигнальный путь абсцизовой кислоты находится в постоянном взаимодействии с сигнальными путями салициловой и жасмоновой кислот, этилена и иных гормонов, что дает растениям возможность разнообразить ответ на стрессовые условия среды [11; 12].

Ранее в научно-исследовательской лаборатории трансгенных растений кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ было изучено изменение уровней экспрессии генов биосинтеза абсцизовой кислоты в клубнях растений картофеля в ответ на внедрение патогена *Pectobacterium versatile*. Полученные данные свидетельствуют о том, что при внедрении патогена снижается экспрессия генов биосинтеза абсцизовой кислоты и повышается экспрессия гена ее гидроксилазы, что должно приводить к уменьшению количества активной формы гормона рядом с зоной заражения. Такая реакция эффективна при защите от биотрофных патогенов, но в случае заражения некротрофными патогенами она может привести к колонизации растения и его гибели.

Абсцизовая кислота синтезируется в растениях из каротиноидов (рис. 1). Начальные этапы ее синтеза проходят в пластидах. На завершающих этапах 9-*цис*-эпоксикаротиноиддиоксигеназа (NCED3) расщепляет 9-*цис*-неоксантин и 9-*цис*-виолаксантин до ксантоксина [13], который экспортируется в цитоплазму [14]. Далее ксантоксиндегидрогеназа превращает ксантоксин в абсцизовый альдегид [15], который оксидаза абсцизового альдегида метаболизирует до абсцизовой кислоты [16]. В контроле количества активной формы абсцизовой кислоты и регуляции вегетативных и генеративных процессов растения важную роль играет фермент гидроксилаза абсцизовой кислоты [17]. Следует отметить, что гидроксилированная форма абсцизовой кислоты (8'-гидрокси-АБК) биологически неактивна, но она может превращаться в фазиновую кислоту [18], которая участвует в регуляции фотосинтеза и работы устьичного аппарата [19].



Рис. 1. Основные этапы метаболизма абсцизовой кислоты в растении

Fig. 1. Main stages of abscisic acid metabolism in a plant

Считается, что именно 9-*цис*-эпоксикаротиноиддиоксигеназа ограничивает скорость биосинтеза абсцизовой кислоты [20], а из всего семейства белков NCED только NCED3 дифференциально экспрессируется в ответ на стрессовые условия среды [14]. Можно предположить, что сайленсинг гена *NCED3* снизит содержание активной формы абсцизовой кислоты в тканях растений томата и тем самым позволит изучить влияние этого гормона на иммунные реакции растений *Solanum lycopersicum* на заражение патогеном *P. versatile*.

Материалы и методы исследования

Растения *S. lycopersicum* сорта Micro-Tom выращивали при температуре +22 °C и 16-часовом световом дне. Бактерии *Escherichia coli* XL-1 Blue культивировали при температуре +37 °C, а бактерии *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (Rif^r, Gen^r, vir⁺) с *vir*-регулоном для доставки конструкций для сайленсинга генов, штамм *P. versatile* JN42 (r⁻, Cm^r (Tn9), Rif^r) дикого типа и штамм *P. versatile* VKE (JN42 *dspE*::pJP5603), мутантный по гену *dspE*, кодирующему основной эффектор системы секреции типа III [21], – при температуре +28 °C.

Конструкция для сайленсинга гена *NCED3* создана путем клонирования по сайтам *Bam*HI и *Sal*I в векторе pTRV2 амплифицированного с помощью праймеров agggatccgtcgccctgttttcctaaag, aatgtcgactgggtgtcatcatgaacc фрагмента (698 пар нуклеотидов) гена *NCED3* растения *S. bulbocastanum*. Последовательность вставки в полученной плазмиде pTRV2::*NCED3* верифицирована путем секвенирования, а возможность проведения процедуры сайленсинга гена *NCED3* в растениях томата (локус Solyc07g056570.1.1) с использованием плазмиды pTRV2::*NCED3* подтверждена с помощью веб-инструмента *SGN VIGS Tool* (vigs.solgenomics.net).

Полученной конструкцией трансформировали клетки штамма *A. tumefaciens* GV3101, которые использовали для индукции сайленсинга, как описано в работе [22]. В качестве контроля вирусного заражения растения трансформировали клетками штамма *A. tumefaciens* GV3101, несущими плазмиду pTRV2::*GFP*. Заражение растений культурами *P. versatile* проводили по истечении 92 дней с момента индукции сайленсинга. Использовали суспензии бактерий в растворе NaCl (0,85 %) с плотностью $1,5 \cdot 10^8$ клеток на 1 мл. По 5 мкл суспензий инокулировали в три последовательно расположенных междоузлия примерно посередине стебля. Учет результатов и отбор растительного материала проводили через 72 ч с момента заражения. Отобранный растительный материал замораживали в азоте и хранили при температуре –80 °C. Выделение РНК проводили по методике, описанной в работе [23]. Препараты РНК обрабатывали ДНКазой RQ1 RNase-Free (*Promega*, США) и синтезировали кДНК с помощью обратной транскриптазы М-MuLV (*New England Biolabs*, Великобритания). Количественную ПЦР проводили с применением амплификатора ДТ-96 (ООО «ДНК-технология», Россия). Для измерения экспрессии использовали по три растения каждой группы. Обработку полученных данных выполняли в программе *Relative Expression Software Tool (REST)* 2009 (версия 2.0.13). Выбор в качестве референсных генов *EF1a* (ген фактора элонгации 1a) и *TBP* (ген ТАТА-связывающего белка) осуществлен с помощью алгоритма *geNorm* (версия 3.5).

Оценку уровней экспрессии генов методом количественной ПЦР выполняли с использованием праймеров генов *EF1a* (tgaggctcttgaccagattaatg, gtttaacacgaccgacagg), *TBP* (ggagccaaaagtgaacaacag, cgtaacttgagaaagcaccgt), *NCED3* (tgctgaaccatggccaaaagt, accatcgtctctcctctgtct), *AAO3* (gctgtcagtgagggtggagataga, caacagctgcattcaagctctgt), *CYP707a1* (ggcaatgggggtcactcatgtc, gccaccatagaccactgtga), *JAZ* (atcggaaccggaaaaggac, aaggtacttttcagtcagcct), *NPR5* (gaaagtggcaccctgagga, aaccccgcccagttctttc), *TGA* (gcagctggccgattaggtga, aggatgcgggacatctgttg), *PR1a* (gagggcagccgtgcaa, cacattttccaccaacacattg), *PR2* (gactaatgtagtgtgacaagatgg, tgacacaactattcctacagatcc), *PR3* (gggtgatgatactgcgcgtaag, ttgattgccttccttaacaaaac), *PR4* (acgtatcattatataaccacagaaca, ccacagaagcagctccagccata), *PR5* (actatcgaggtacgcaacaattg, ccatatacgtgccatcttagtgc), *PR5o* (acaactgtccataaccgcttg, caccatcaaaagtgcattcgtac), *PR6* (agtggaaaatgatggcgaattg, ttggcataccaggaaatagaagc), *PR10* (tgctccaacaccaccatctccctc, tggaccacctcaacaaagtc), *NHL* (gccattgccagtgccactaa, ttgcggcgttcactctctgg), *WRKY65* (ccagccataatcatctgtgtcc, tggggatttcagctttgtgt), *U-box* (cctttgtaggctcgggtgcag, cgcgtgctatgtgtctgaga), *HSR515* (aactctcccttaagtacggac, caatagtcatacactcacga).

Результаты и их обсуждение

Обусловленное сайленсингом гена *NCED3* изменение фенотипа растений *S. lycopersicum*. Экспрессия гена *NCED3* в тканях растений *S. lycopersicum* с сайленсингом снизилась примерно на 50 % от уровня его экспрессии в контрольных растениях. Растения *S. lycopersicum* со сниженной экспрессией гена *NCED3* показали фенотипические отличия от контрольной группы. Используемый в исследовании сорт томата Micro-Tom является детерминантным, растения вырастают довольно низкими (до 10 см), однако растения с сайленсингом гена *NCED3* были еще ниже (примерно 5 см) и выглядели более слабыми по сравнению с контрольными образцами (рис. 2).

Известно, что сверхэкспрессия гена семейства *NCED* у растений томата приводит к повышению гидравлической проводимости корней и снижению гидравлической проводимости устьиц, что повышает эффективность использования воды [24]. При сниженной экспрессии генов *NCED* предполагается противоположный эффект, и фенотипические изменения, выявленные в растениях с сайленсингом гена *NCED3*, объяснимы с точки зрения нарушения водного баланса, хотя визуально увядания не наблюдалось.

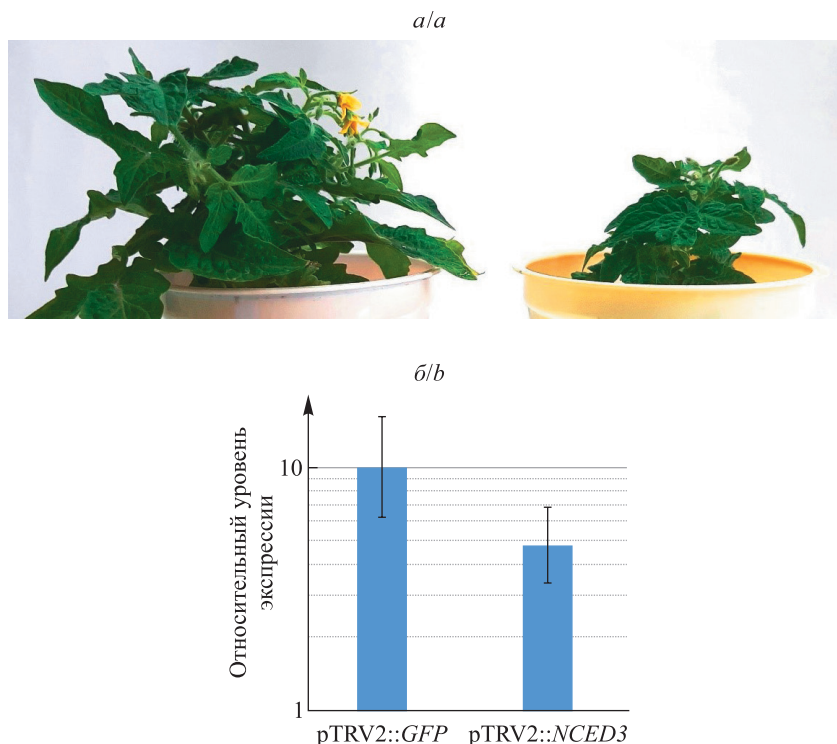


Рис. 2. Типичное растение *S. lycopersicum* сорта Micro-Tom с сайленсингом гена *NCED3* (справа) в сравнении с контрольным растением (слева) на 92-й день после индукции сайленсинга (а). Относительный уровень экспрессии гена *NCED3* в контрольных растениях (pTRV2::GFP) и растениях с сайленсингом (pTRV2::NCED3) (б)

Fig. 2. A typical *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom plant with *NCED3* gene silencing (right) compared to the control plant (left) on the 92nd day after silencing induction (a). Relative level of *NCED3* gene expression in control plants (pTRV2::GFP) and plants with silencing (pTRV2::NCED3) (b)

Для исследования влияния сниженной экспрессии гена *NCED3* на устойчивость растения *S. lycopersicum* к заражению некротрофным бактериальным патогеном использовали бактерии *P. versatile* двух штаммов: JN42 (штамм дикого типа) и VKE (*dspE*-мутант). Мутант по гену *dspE* использовали для оценки роли *NCED3* на фоне отсутствия эффекториндуцируемого компонента иммунной системы растения. Инокуляция стеблей растений томата суспензиями клеток *P. versatile* штамма дикого типа и *dspE*-мутанта вызывала у растений с сайленсингом гена *NCED3* развитие заболевания, выражавшегося в повреждении проводящей системы и увядании листьев при введении клеток обоих штаммов патогена, при этом у растений без сайленсинга гена *NCED3* симптомы заболевания не обнаруживались (рис. 3). Заболевание продолжало прогрессировать: наблюдалось отмирание листьев с почернением и последующим усыханием черешка.



Рис. 3. Растения *S. lycopersicum* с сайленсингом гена *NCED3* (три растения слева) в сравнении с контрольными растениями (три растения справа) через 72 ч после заражения патогеном *P. versatile*

Fig. 3. *S. lycopersicum* plants with *NCED3* gene silencing (three plants on the left) compared to the control plants (three plants on the right) 72 h after infection with *P. versatile*

Картина изменений в сигнальных цепях растений *S. lycopersicum* в ответ на внедрение патогена *P. versatile*. При заражении патогеном *P. versatile* меняется экспрессия нескольких генов метаболизма абсцизовой кислоты: незначительно (чуть менее чем в 2 раза) снижается экспрессия гена *NCED3*,

кодирующего 9-*цис*-эпоксикаротиноиддиоксигеназу, однако в отсутствие эффектора DspE экспрессия этого гена восстанавливается до уровня раневого ответа; экспрессия гена *AAO3*, кодирующего оксидазу абсцизового альдегида, в среднем возрастает в 2 и 3 раза при заражении штаммом дикого типа и *dspE*-мутантом соответственно; экспрессия гена *CYP707a1*, кодирующего гидроксилазу абсцизовой кислоты, при внедрении штамма дикого типа не меняется, но в отсутствие эффектора возрастает в 5 раз (рис. 4).

Экспрессия гена *JAZ*, кодирующего негативный регулятор жасмонатзависимых генов, при внедрении патогена обоих штаммов меняется незначительно (см. рис. 4).

Детекция патогена *P. versatile* вызывает колебания экспрессии салицилатзависимых генов в растениях томата: средние значения экспрессии гена регуляторного белка NPR5 возрастают в 3 раза при внедрении штамма дикого типа, однако от образца к образцу данные разнятся, что отражается на доверительном интервале, не позволяющем с уверенностью сказать об изменениях в растении. Кроме того, в 4 раза повышается экспрессия гена защитного белка PR1a, классического маркера салицилатного сигнального пути (см. рис. 4). Для белков этого семейства показано участие в самых разных метаболических процессах, а в регуляторных областях их генов обнаружены 24 типа *цис*-регуляторных элементов в сайтах связывания транскрипционных факторов [25].

Экспрессия генов защитных белков β -1,3-глюканазы PR2, хитиназ PR3 и PR4, тауматинподобного белка PR5, ингибитора протеаз PR6 при внедрении патогена не меняется. Ранее было показано, что дифференциальная экспрессия защитных генов растений томата зависит от плотности бактериальной культуры, и такой эффект может быть обусловлен концентрацией клеток в суспензии, которой заражено растение [26]. Экспрессия гена осмотинподобного белка PR5o при внедрении штамма дикого типа повышается в 3 раза, причем этот эффект зависит от наличия интактного эффектора DspE, в то время как экспрессия гена предполагаемой рибонуклеазы с антимикробной активностью PR10 возрастает в 3 раза при внедрении обоих штаммов.

При заражении патогеном не меняется экспрессия гена транскрипционного фактора WRKY65. Детекция патогена вызывает двукратную индукцию экспрессии гена NDR1/HIN1-подобного белка NHL, компонента E3 убиквитинлигазы U-box и трехкратную индукцию экспрессии гена маркера сверхчувствительности HSR515, причем для последних двух генов указанные изменения DspE-зависимы (см. рис. 4).

Влияние сайленсинга гена *NCED3* на картину экспрессии защитных генов и чувствительность сигнальных компонентов растений *S. lycopersicum* к эффекторному белку DspE. Снижение экспрессии гена *NCED3* не оказывает влияния на экспрессию генов *CYP707a1*, *JAZ*, *PR5o*, но приводит к повышению экспрессии генов *AAO3*, *NPR5*, *PR1a*, *PR3*, *PR5*, *PR10*, *WRKY65* в среднем в 2–4 раза (см. рис. 4).

В условиях сайленсинга гена *NCED3* экспрессия гена *PR2* при заражении штаммом дикого типа возрастает в 6 раз, а при заражении *dspE*-мутантом – лишь в 2 раза. Сниженная экспрессия гена *NCED3* приводит к изменению чувствительности некоторых сигнальных компонентов к эффектору DspE. При раневом ответе экспрессия генов *NHL*, *U-box* и *HSR515* в растениях с сайленсингом не меняется по сравнению с таковой в контроле. Сайленсинг гена *NCED3* приводит к повышению экспрессии гена *NHL* в 3 раза при внедрении штамма дикого типа. В отсутствие эффектора экспрессия данного гена восстанавливается до уровня раневого ответа, в то время как в растениях без сайленсинга гена *NCED3* экспрессия гена *NHL* не зависит от эффектора DspE. Картина экспрессии гена *HSR515* противоположная: при снижении количества транскриптов *NCED3* экспрессия этого гена становится нечувствительной к DspE (не восстанавливается до уровня раневого ответа в случае заражения *dspE*-мутантом) (см. рис. 4). Экспрессия гена *PR4* возрастает в 2 раза при раневом ответе и становится чувствительной к DspE при заражении патогеном (снижается при наличии в среде эффектора и восстанавливается до уровня раневого ответа при введении мутантного штамма) (см. рис. 4).

Таким образом, *NCED3* в растениях *S. lycopersicum* оказывает значительное влияние на экспрессию компонентов сигнальных цепей растения. Для растений *Arabidopsis thaliana* было показано, что ген *NCED3* играет важную роль в накоплении абсцизовой кислоты: изменение уровня его экспрессии приводило к пропорциональному изменению содержания абсцизовой кислоты в растениях [27]. Сайленсинг гена *NCED3*, по всей видимости, снижает накопление абсцизовой кислоты в растениях томата, что, предположительно, активизирует экспрессию компонентов салицилатной сигнализации. Согласно данным литературы продукция абсцизовой кислоты лимитирует количество киназы SID2, регулирующей запуск салицилатной сигнализации [28]. *NCED3* негативно влияет на экспрессию ряда генов защитных белков. Это может быть обусловлено тем, что абсцизовая кислота снижает экспрессию генов с GCC-боксом в промоторе, которыми являются, например, гены *PR1*, *PR2*, *PR3* и *PR5* [29]. Поскольку уровень экспрессии гена *NCED3* биосинтез абсцизовой кислоты снижается, а уровень экспрессии гена *CYP707a1* гидроксилазы, переводящей абсцизовую кислоту в неактивную форму, не меняется, можно предположить, что и количество активной формы абсцизовой кислоты в клетке снижается. Таким образом, *NCED3* является регулятором вегетации растений *S. lycopersicum* и их иммунного ответа (обеспечивает нормальное развитие растений и корректный запуск защитных реакций при внедрении некротрофного патогена).

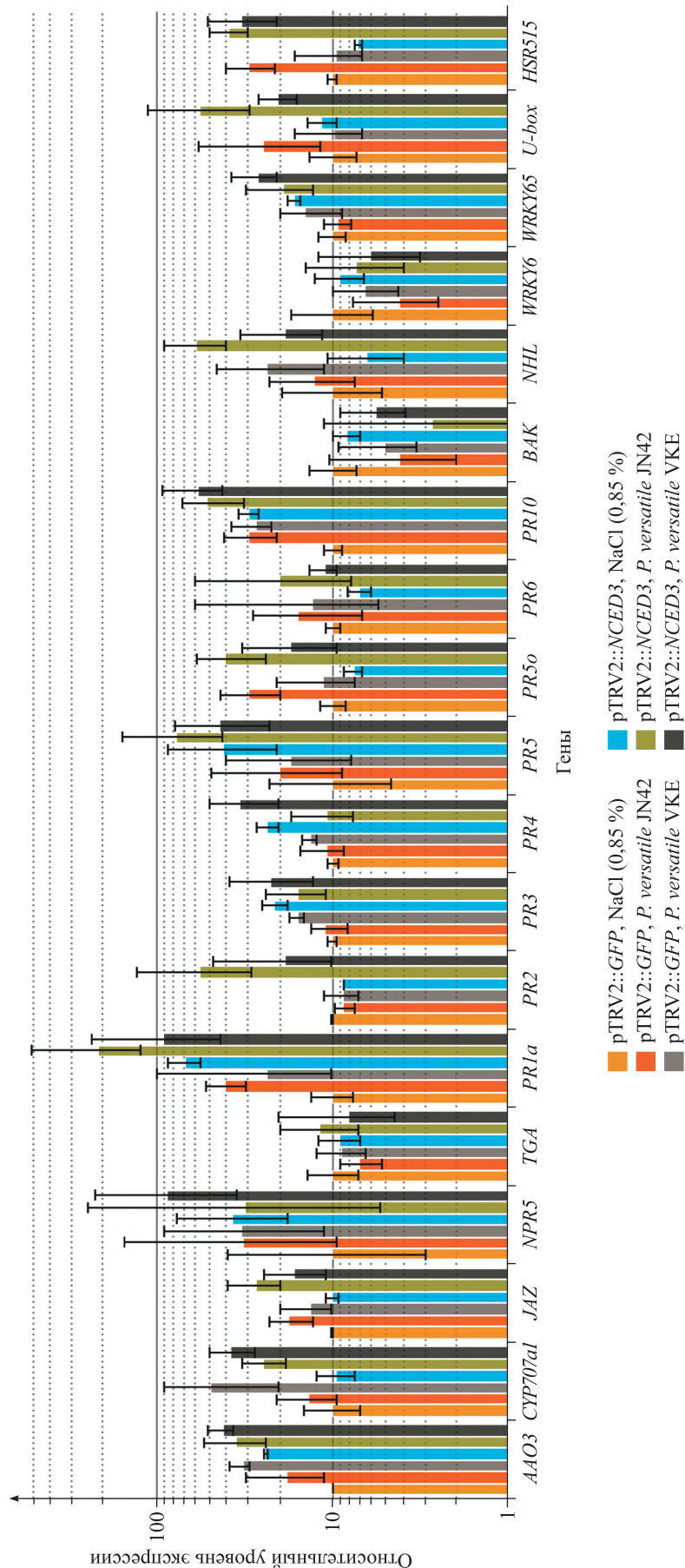


Рис. 4. Изменение экспрессии генов иммунной сигнализации в растениях *S. lycopersicum* сорта Micro-Tom с сайленсингом гена *NCED3* (pTRV2::NCED3) и контрольных растений (pTRV2::GFP) в ответ на заражение патогеном *P. versatilis* (представлены средние значения экспрессии генов с 95 % доверительным интервалом)

Fig. 4. Change in the expression of immune signalling genes in *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom plants with *NCED3* gene silencing (pTRV2::NCED3) and control plants (pTRV2::GFP) in response to *P. versatilis* infection (mean gene expression values with 95 % confidence intervals are presented)

Заклучение

Показана важная роль NCED3 в регуляции вегетации растений *S. lycopersicum* и их иммунного ответа на заражение патогеном *P. versatilis*. Опосредованное NCED3 изменение чувствительности к эффектору DspE требует дополнительного изучения, поскольку фенотипических отличий растений, зараженных *dspE*-мутантом, от растений, зараженных штаммом дикого типа, отмечено не было. Предположительно, ген *NCED3* обеспечивает устойчивость растений томата к пектобактериозу, сдерживая салицилатный сигнальный путь активации иммунного ответа, приводящий к развитию реакции сверхчувствительности. Такой ответ растения выгоден некротрофному патогену, использующему отмершие ткани как среду для роста и толерантному к окислительному взрыву.

Библиографические ссылки / References

1. Charkowski A, Blanco C, Condemine G, Expert D, Franza T, Hayes C, et al. The role of secretion systems and small molecules in soft-rot Enterobacteriaceae pathogenicity. *Annual Review of Phytopathology*. 2012;50:425–449. DOI: 10.1146/annurev-phyto-081211-173013.
2. Badalyan OA, Nikolaichik YA. Receptor-like kinases RLK2 and RLK5 of *Nicotiana benthamiana* are involved in regulation of gene expression of key plant immune system components during the contact with *Pectobacterium carotovorum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological Series*. 2014;4:75–80. Russian. EDN: TRPIQT.
3. Marković S, Milić Komić S, Jelušić A, Ilić R, Bagi F, Stanković S, et al. First report of *Pectobacterium versatilis* causing blackleg of potato in Serbia. *Plant Disease*. 2022;106(1):312. DOI: 10.1094/PDIS-06-21-1128-PDN.
4. Voronina MV, Lukianova AA, Shneider MM, Korzhakov AA, Toschakov SV, Miroshnikov KA, et al. First report of *Pectobacterium polaris* causing soft rot and black leg of potato in Russia. *Plant Disease*. 2021;105(6):1851. DOI: 10.1094/PDIS-09-20-1864-PDN.
5. Bharath P, Gahir S, Raghavendra AS. Abscissic acid-induced stomatal closure: an important component of plant defense against abiotic and biotic stress. *Frontiers in Plant Science*. 2021;12:615114. DOI: 10.3389/fpls.2021.615114.
6. Toun L, Torres PS, Gallego SM, Benavides MP, Vojnov AA, Gudesblat GE. Coronatine inhibits stomatal closure through guard cell-specific inhibition of NADPH oxidase-dependent ROS production. *Frontiers in Plant Science*. 2016;7:1851. DOI: 10.3389/fpls.2016.01851.
7. De Vleeschauwer D, Yang Y, Cruz CV, Höfte M. Abscissic acid-induced resistance against the brown spot pathogen *Cochliobolus miyabeanus* in rice involves MAP kinase-mediated repression of ethylene signaling. *Plant Physiology*. 2010;152(4):2036–2052. DOI: 10.1104/pp.109.152702.
8. Yazawa K, Jiang C-J, Kojima M, Sakakibara H, Takatsuki H. Reduction of abscissic acid levels or inhibition of abscissic acid signaling in rice during the early phase of *Magnaporthe oryzae* infection decreases its susceptibility to the fungus. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 2012;78:1–7. DOI: 10.1016/j.pmp.2011.12.003.
9. Jensen MK, Hagedorn PH, de Torres-Zabala M, Grant MR, Rung JH, Collinge DB, et al. Transcriptional regulation by an NAC (NAM-ATAF1,2-CUC2) transcription factor attenuates ABA signalling for efficient basal defence towards *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* in *Arabidopsis*. *Plant Journal*. 2008;56(6):867–880. DOI: 10.1111/j.1365-3113X.2008.03646.x.
10. L'Haron F, Besson-Bard A, Binda M, Serrano M, Abou-Mansour E, Balet F, et al. A permeable cuticle is associated with the release of reactive oxygen species and induction of innate immunity. *PLOS Pathogens*. 2011;7(7):e1002148. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002148.
11. Asselbergh B, de Vleeschauwer D, Höfte M. Global switches and fine-tuning – ABA modulates plant pathogen defense. *MPMI*. 2008;21(6):709–719. DOI: 10.1094/MPMI-21-6-0709.
12. Denancé N, Sanchez-Vallet A, Goffner D, Molina A. Disease resistance or growth: the role of plant hormones in balancing immune responses and fitness costs. *Frontiers in Plant Science*. 2013;4:155. DOI: 10.3389/fpls.2013.00155.
13. Qin X, Zeevaert JAD. The 9-*cis*-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscissic acid biosynthesis in water-stressed bean. *PNAS*. 1999;96(26):15354–15361. DOI: 10.1073/pnas.96.26.15354.
14. Xiong L, Zhu J-K. Regulation of abscissic acid biosynthesis. *Plant Physiology*. 2003;133(1):29–36. DOI: 10.1104/pp.103.025395.
15. González-Guzmán M, Apostolova N, Bellés JM, Barrero JM, Piqueras P, Ponce MR, et al. The short-chain alcohol dehydrogenase ABA2 catalyzes the conversion of xanthoxin to abscissic aldehyde. *Plant Cell*. 2002;14(8):1833–1846. DOI: 10.1105/tpc.002477.
16. Seo M, Peeters AJM, Koiwai H, Oritani T, Marion-Poll A, Zeevaert JAD, et al. The *Arabidopsis* aldehyde oxidase 3 (*AAO3*) gene product catalyzes the final step in abscissic acid biosynthesis in leaves. *PNAS*. 2000;97(23):12908–12913. DOI: 10.1073/pnas.220426197.
17. Okamoto M, Kuwahara A, Seo M, Kushiro T, Asami T, Hirai N, et al. *CYP707A1* and *CYP707A2*, which encode abscissic acid 8'-hydroxylases, are indispensable for proper control of seed dormancy and germination in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 2006;141(1):97–107. DOI: 10.1104/pp.106.079475.
18. Milborrow BV, Carrington NJ, Vaughan GT. The cyclization of 8'-hydroxy abscissic acid to phaseic acid *in vivo*. *Phytochemistry*. 1988;27(3):757–759. DOI: 10.1016/0031-9422(88)84088-3.
19. Sharkey TD, Raschke K. Effects of phaseic acid and dihydrophaseic acid on stomata and the photosynthetic apparatus. *Plant Physiology*. 1980;65(2):291–297. DOI: 10.1104/pp.65.2.291.
20. Thompson AJ, Jackson AC, Symonds RC, Mulholland BJ, Dadswell AR, Blake PS, et al. Ectopic expression of a tomato 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase gene causes over-production of abscissic acid. *Plant Journal*. 2000;23(3):363–374. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2006.01606.x.
21. Nikolaichik EA, Ovchinnikova TV, Valentovich LN. Translocation of the DspE protein by phytopathogenic bacteria *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* into *Nicotiana tabacum* cells and its requirement for inducing a hypersensitivity reaction. *Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*. 2005;49(5):81–85. Russian.
22. Liu Y, Schiff M, Dinesh-Kumar SP. Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant Journal*. 2002;31(6):777–786. DOI: 10.1046/j.1365-3113x.2002.01394.x.

23. Eric Carpenter. RNA isolation from plant tissue. Protocol 15: hot acid phenol method for algae. *Protocols.io* [Internet]. 2019 June 27 [cited 2024 March 21]. DOI: 10.17504/protocols.io.4u3gwyn.
24. Thompson AJ, Mulholland BJ, Jackson AC, Mckee JMT, Hilton HW, Symonds RC, et al. Regulation and manipulation of ABA biosynthesis in roots. *Plant, Cell and Environment*. 2007;30(1):67–78. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2006.01606.x.
25. Akbudak MA, Yildiz S, Filiz E. Pathogenesis related protein-1 (PR-1) genes in tomato (*Solanum lycopersicum* L.): bioinformatics analyses and expression profiles in response to drought stress. *Genomics*. 2020;112(6):4089–4099. DOI: 10.1016/j.ygeno.2020.07.004.
26. Zhan Y, Nikolaichik YA. The dependence of immune response of *Solanum lycopersicum* plants on the number of cells *Pectobacterium carotovorum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological Series*. 2012;3:44–48. Russian. EDN: XQTEWZ.
27. Iuchi S, Kobayashi M, Taji T, Naramoto M, Seki M, Kato T, et al. Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Journal*. 2001;27(4):325–333. DOI: 10.1046/j.1365-3113x.2001.01096.x.
28. Alazem M, Lin K-Y, Lin N-S. The abscisic acid pathway has multifaceted effects on the accumulation of *Bamboo mosaic virus*. *MPMI*. 2014;27(2):177–189. DOI: 10.1094/MPMI-08-13-0216-R.
29. Zhou Jinxin, Zhang Hongbo, Yang Yuhong, Zhang Zhijin, Zhang Haiwen, Hu Xinwen, et al. Absciscic acid regulates TSRF1-mediated resistance to *Ralstonia solanacearum* by modifying the expression of GCC box-containing genes in tobacco. *Journal of Experimental Botany*. 2008;59(3):645–652. DOI: 10.1093/jxb/erm353.

Получена 02.05.2024 / исправлена 30.05.2024 / принята 03.06.2024.
Received 02.05.2024 / revised 30.05.2024 / accepted 03.06.2024.