РЕЦЕПТОРОПОДОБНАЯ КИНАЗА RLK2 РАСТЕНИЙ СЕМЕЙСТВА ПАСЛЕНОВЫХ УЧАСТВУЕТ В ДЕТЕКЦИИ НЕКРОТРОФНОГО ПАТОГЕНА *PECTOBACTERIUM CAROTOVORUMO*

О. А. Бадалян, Е. В. Кулик

Сигнальные системы растений позволяют им детектировать проникновение патогенов. В результате активации данных систем индуцируется целый ряд защитных механизмов растений: кислородный взрыв, синтез PR-белков, фитоалексинов и др. Как правило, сигнальная цепочка у растений, ответственная за детекцию внешних стимулов, включает в себя мембранные рецепторные комплексы, состоящие из специализированной рецепторной киназы и корецептора, а также целый ряд цитоплазматических сигнальных киназ, посредством которых сигнал поступает в ядро растительной клетки.

Лучше всего молекулярные механизмы распознавания патогена растением и подавление патогеном растительного иммунитета изучены для биотрофных патогенов. Так, в системе *Pseudomonas syringae – Arabidopsis thaliana* описано большое количество эффекторных белков, доставляемых *P. syringae* в клетки растений (до 30 для одного штамма) [1]. Однако каким образом растение детектирует инфекцию некротрофных патогенов, к настоящему времени изучено недостаточно.

Pectobacterium carotovorum (Pca) – факультативный некротрофный патоген, способный к сапротрофному существованию на растительных остатках [2]. При инфекции растения-хозяина (картофеля) бактериями *Pca*, а также при индукции реакции сверхчувствительности у других растений важнейшим фактором вирулентности является секреторная система III типа (ССТТ) [3]. Для *Pca* к настоящему времени описан лишь один эффекторный белок DspE, транспортируемый в клетки растений посредством ССТТ [4]. Было показано, что наличие активного белка DspE и функциональной ССТТ блокирует развитие системных защитных реакций в клубнях картофеля [5]. Инактивация генов, кодирующих DspE и компоненты ССТТ, значительно снижает вирулентность *Pca* в растении-хозяине и препятствует индукции реакции сверхчувствительности у растений табака [3,4].

О взаимодействии эффекторного белка DspE *Pca* с компонентами сигнальных цепей растений до недавнего времени практически ничего не было известно. Опубликована одна работа о взаимодействии родственного белка DspA/E *Erwinia amylovora* с рецепторными киназами рас-

тений *Malus x domestica* [6]. Основываясь на данной информации мы предприняли направленный поиск рецепторных киназ растений семейства пасленовых, которые могли бы участвовать в распознавании бактерий *Pca* посредством детекции белка DspE. В результате были идентифицированы две взаимодействующие с DspE рецепторные киназы, одна из которых (RLK5) охарактеризована в работе [7], а характеристика другой (RLK2) приводится ниже.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для амплификации фрагмента гена *slRLK2*, кодирующего киназный домен, использованы праймеры:

- CCGAATTCGGGTCACACATTCTTGAAGGT;
- CGCGTCGACTTGTCACTACTGACTAGCTGC.

Амплифицированный фрагмент *slRLK2* был клонирован в векторе pJG4-5 по сайтам *Eco* RI и *Xho* I. Для вирус-индуцированного сайленсинга *Nhe* I-*Eco* RI фрагмент гена *slRLK2* размером 484 н.п. был клонирован в векторе pTRV2 [8]. Остальные использованные плазмиды, методики, а также штаммы микроорганизмов описаны в работе [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ

В геномах растений обычно присутствует несколько сотен серин-треониновых рецепторных киназ с LRR-доменом (LRR-RLK). Предполагается, что большинство таких рецепторных киназ участвуют в распознавании различных патогенов. Поскольку ранее было показано взаимодействие эффектора DspA/E патогена яблони *Erwinia amylovora* с киназными доменами нескольких LRR-RLK рецепторов *Malus* x *domestica* [6], нами был произведен поиск гомологичных последовательностей в геномах растений семейства пасленовых. Для дальнейшего исследования был выбран локус Solyc05g009100.2, расположенный на пятой хромосоме томата. Гомологичные гены присутствовали также в геномах *Solanum tuberosum* и *Nicothiana benthamiana* (идентичность 95% и 89% соответственно). Локус Solyc05g009100.2 (далее *slRLK2*) имеет размер 3872 н.п., содержит один интрон размером 1722 н.п. и кодирует серин-треониновую RLK (669 аминокислотных остатков).

Взаимодействие эффекторного белка DspE *Pca* с данной рецепторной киназой было проверено с помощью LexA-зависимой дрожжевой двухгибридной системы. Для экспрессии в клетках дрожжей химерного белка-"приманки" с ДНК-связывающим доменом LexA фрагмент *dspE* был клонирован в векторе pJK202, а для экспрессии химерного белка-"добычи" с активаторным доменом B42 фрагмент гена *slRLK2*, соответ-

ствующий киназному домену, был клонирован в векторе pJG4-5. Введение одиночных плазмид pJG4-5::*slRLK2* в клетки *Saccharomyces cerevisiae* SKY473, или pJK202::*dspE* в клетки SKY48 не позволяло им расти на среде без лейцина. Прототрофность восстанавливалась только у диплоидных клеток дрожжей, содержащих совместно с pJK202::$dspE_{1\text{-}3200}$ плазмиду с pJG4-5::*slRLK2* (рис. 1). Эти данные свидетельствуют о непосредственном взаимодействии бактериального эффекторного белка DspE с киназным доменом трансмембранного рецептора *slRLK2*

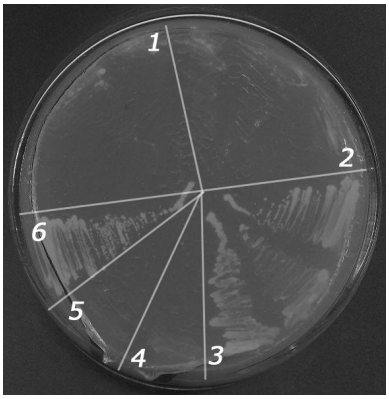

Рис. 1. DspE взаимодействует с киназным доменом *slRLK2* в клетках *S. cerevisiae:*

На среду без лейцина высеяны клетки S. cerevisiae, содержащие плазмиды pJG4-5::slRLK2 и pJK202 (1), pJG4-5::slRLK2 и pJK202::$dspE_{1\text{-}480}$ (2), pJG4-5::slRLK2 и pJK202::$dspE_{1\text{-}3200}$ (3), pJG4-5::slRLK2 (4), pJK202::$dspE_{1\text{-}3200}$ (5), pJG4-5::dspF+pJK202::$dspE_{1\text{-}3200}$ (6).

Участие рецепторoподобной киназы RLK2 в детекции бактерий *Pca* было проверено при помощи методики вирус-индуцированного сайленсинга генов (ВИГС) [8]. Эти эксперименты проводились с растениями *N. benthamiana,* поскольку в их геноме содержится ген с высокой гомологией с *RLK2*, а эффективность сайленсинга гораздо выше, чем в растениях *Solanum lycopersicum*.

Через 36 дней после инфекции конструкциями для сайленсинга TRV::*GFP* (контроль) или TRV::*slRLK2* растения *N. benthamiana* были инфицированы бактериями *Pca*. Реакция контрольных растений на контакт с бактериями не отличалась от реакции интактных растений: при инфильтрации листьев суспензиями клеток *Pca* через 24 часа развивалась реакция сверхчувствительности (рис. 2 а, б) с последующей мацерацией тканей листа через 48 часов.

У растений с сайленсингом гена *RLK2* при инфекции *Pca* наблюдалось четкое отличие от контрольных. При инфильтрации суспензиями клеток *Pca* плотностью $1{,}5\times10^8$ кл/мл реакция сверхчувствительности через 24 часа практически не развивалась, а при инфекции суспензиями клеток *Pca* плотностью в 3 раза выше реакция сверхчувствительности была значительно слабее по сравнению с контрольными растениями (рис. 2 в, г).

Таким образом, наличие функционального белка RLK2 в растениях *N. benthamiana* обеспечивает развитие таких фенотипических признаков реакции на инфекцию *Pca*, как сверхчувствительность и мацерация тканей листа. Похожий фенотипический эффект был получен нами при инактивации другого рецептора, RLK5 [7]. 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 здесь и в работе [7] ВИГС-конструкциями невозможен. Частичное сохранение растениями *N. benthamiana* с сайленсингом *RLK2* или *RLK5* способности индуцировать реакцию сверхчувствительности в ответ на контакт с бактериями *Pca* позволяет говорить о частичном дублировании функций этих рецепторов.

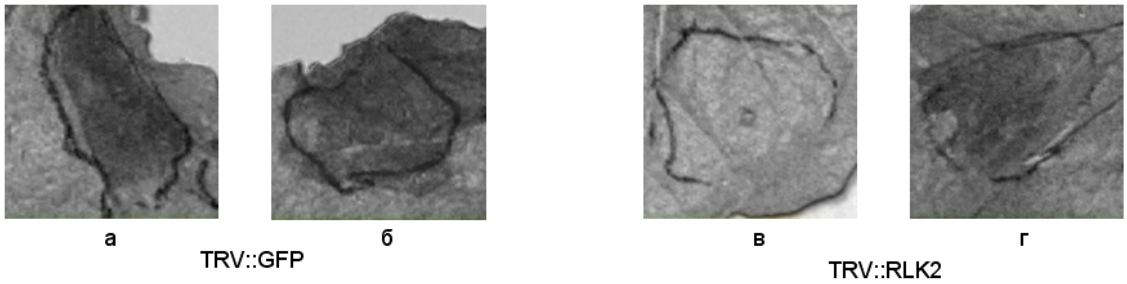

Рис. 2. Вирус-индуцированный сайлейнсинг гена *RLK2* в растениях *Nicotiana benthamiana* блокирует развитие реакции сверхчувствительности:
Листья растений инфильтрованы суспензиями клеток *P. carotovorum* плотностью $1{,}5\times10^8$ (а, в) и 5×10^8 (б, г) клеток/мл. Сфотографировано через 24 часа после заражения.

Литература

1. *Block A., Alfano J. R.* Plant targets for *Pseudomonas syringae* type III effectors: virulence targets or guarded decoys? // Current Opinion in Microbiology. 2011. Vol. 14. P. 39–46.
2. *Евтушенков А. Н. и др.* Теоретические и практические аспекты изучения пектолитических бактерий рода *Erwinia* // Избранные научные труды Белорусского государственного университета. Минск: БГУ, 2001. Vol. 7. P. 79–101.
3. *Ageichik A. V., Evtushenkov A. N., Nikolaichik Y. A.* The role of type III secretion system in *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* virulence // Plant Protection Science. 2002. Vol. 38, № Sp.Issue 2. P. 523–527.
4. *Николайчик Е. А., Хомская Л Л., Игнатенко Е. И.* Фитопатоген *Pectobacterium carotovorum* использует аппарат секреции III типа для блокирования системного защитного ответа растения-хозяина // Труды БГУ. 2009. Vol. 4. P. 197–204.
5. *Николайчик Е. А. и др.* Белок DspE транслоцируется фитопатогенными бактериями Erwinia carotovora subsp. atroseptica в клетки *Nicotiana tabacum* и является необходимым для индукции реакции гиперчувствительности // Докл. НАН Б. 2005. Vol. 49, № 5. P. 81–85.
6. *Meng X. et al.* Apple proteins that interact with DspA/E, a pathogenicity effector of Erwinia amylovora, the fire blight pathogen // Mol Plant Microbe Interact. 2006. Vol. 19, № 1. P. 53–61.
7. *Николайчик Е. А. и др.* Роль рецепторподобной трансмембранной киназы растений семейства пасленовых во взаимодействии с фитопатогеном *Pectobacterium carotovorum* // Доклады НАН Б. 2012. т.56, №1. С.106–112.
8. *Liu Y., Schiff M., Dinesh-Kumar S. P.* Virus-induced gene silencing in tomato // The Plant Journal. 2002. Vol. 31, № 6. P. 777–786.