

ОТВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ РАСТЕНИЙ ТАБАКА НА ВОЗДЕЙСТВИЕ БИОТРОФА *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* И НЕКРОТРОФА *PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM*

С.В. Бояркина, Ю.В. Омеличкина, Т.Н. Шафикова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, *klyuevskaya@ya.ru*

Аннотация. Инфицирование растений суспензией биотрофного патогена *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* и его экзометаболитами индуцирует развитие системной устойчивости растения к последующему инфицированию некротрофом *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum*. Устойчивость к некротрофу сохраняется у второго поколения растений, что позволяет полагать о развитии иммунной памяти при инфицировании биотрофом.

Ключевые слова: *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, *Nicotiana tabacum*, *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum*, системная приобретенная устойчивость (СПУ)

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1195-1198

Введение. В природных условиях растения подвергаются действию стрессоров различной природы, как биотических, так и абиотических. К биотическим стрессорам относятся патогены с различными жизненными стратегиями – биотрофы и некротрофы. Отличительной чертой действия биотрофов является использование ими ресурсов живых клеток растения, в то время как некротрофы поселяются только на предварительно убитой ими ткани. Растения обладают рядом механизмов, направленных на противодействие инфицированию, обусловленных способностью своевременно распознать патоген и активировать различные сигнальные пути и защитные реакции при заражении фитопатогенами [Дьяков и др., 2001; Тютюрев, 2002].

Устойчивость растений определяется наличием у них R-генов, продукты которых участвуют в восприятии эффекторов патогена (продуктов *avr*-генов) и запуске защитных реакций. Одной из первичных реакций на воздействие патогена является генерация активных форм кислорода (окислительный взрыв) [Torres et al., 2006]. Другой защитной реакцией при действии биотрофа является индукция синтеза салициловой кислоты (SA) – сигнальной молекулы, способствующей активации ряда событий, связанных с защитой растения, что приводит к развитию реакции сверхчувствительности и системной приобретенной устойчивости (СПУ) – устойчивости всего растения к широкому кругу патогенов [Прудникова, 2008; Zhibing Lai, 2013]. При распознавании растением некротрофного патогена происходит индукция синтеза жасмоновой кислоты (JA), результатом чего является запуск системной индуцированной устойчивости (СИУ) [Шафикова, Омеличкина, 2015].

Таким образом, биотрофы и некротрофы активируют в растениях различные сигнальные системы, защитные реакции и иммунные механизмы (SA- или JA-типа), действие которых может иметь как синергический, так и антагонистический эффект в процессе развития системной устойчивости растений (СПУ или СИУ) к последующему заражению патогенами. Также может сопровождаться развитием иммунной памяти, реализуемой с помощью эпигенетической регуляции [Davidsson et al., 2013; Omelichkina et al., 2014]. Формирование системной приобретенной устойчивости приводит к устойчивости второго поколения растений к инфицированию патогенами.

Биотрофный патоген *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (*Cms*) – высоко специализированный возбудитель системного заболевания картофеля (*Solanum*

tuberosum L.), известного как «кольцевая гниль» [Eichenlaub, Gartemann, 2001]. *Cms* у растений табака (*Nicotiana tabacum* L.) запускает развитие реакций специфического эффектор-активируемого иммунитета: реакции сверхчувствительности (СЧ) и системной приобретенной устойчивости (СПУ) [Шафикова, Омеличкина, 2015]. Ранее было показано, что СЧ-реакция у растений табака развивается не только при действии бактерии *Cms*, но и при действии экзометаболического комплекса данного патогена и сопровождается развитием СПУ к широкому кругу патогенов, в том числе к нетипичному для растений патогену человека и животных *Escherichia coli* [Омеличкина и др., 2010; Тютюрев, 2002].

Некротроф *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* (*Pc*) вызывает заболевание «мягкая гниль» у растений семейства пасленовых, в том числе картофеля, имеет большой набор пектолитических ферментов и токсинов [Поликсенова, 2009; Davidsson et al., 2013]. Ткани растения повреждаются за счет ферментов деградации клеточной стенки (PCWDEs – пектиназы, целлюлазы и протеиназы, выделяемые через системы секреции II типа) и служат в дальнейшем источником питания для патогена, что приводит к гибели растения [Glazebrook, 2005]. К факторам патогенности некротрофного патогена относятся: комплекс энзимов – в основном пектацелиаза; экзополисахариды; липополисахариды; Hrp-система. В дополнении к PCWDEs у *Pectobacterium* обнаружены эффекторный белок DspE транспортируемый в клетки растений посредством системы секреции третьего типа [Кузьмич и др., 2014]. Несмотря на присутствие у некротрофного патогена большого количества факторов вирулентности, растения способны проявлять устойчивость за счет связывания токсинов и их выведения, а также присутствия фенолов, инактивирующих экзоферменты.

Цель работы – сравнительный анализ развития защитных реакций растений табака *Nicotiana tabacum* (L.) при воздействии биотрофного патогена *Cms* и некротрофного патогена *Pcc*, а также их экзометаболических комплексов.

Обсуждение результатов. Ранее в наших работах было показано, что при инфицировании листьев табака суспензией вирулентного штамма *Cms* происходила СЧ реакция. При инокулировании растений табака *CF Cms* и *DC Cms* наблюдали аналогичную картину развития локального некротического поражения, но по типу СЧ реакции [Омеличкина et al., 2014]. Инфицирование растений табака *in vitro* патогеном *Pcc* вызывало гибель растений в течение 2-х сут. Инокуляция листьев табака *CF Pcc* и *DC Pcc* не приводила к гибели растений, как при внесении суспензии живых бактерий *Pcc*, но происходило развитие ограниченных некрозов в месте инфицирования. *CF Cms* и *CF Pcc* вызывали хлороз и повреждение большего диаметра, предположительно из-за содержания пектолитических ферментов и факторов вирулентности, секретируемых патогенами, большинство из которых инактивируются при термической обработке.

Для изучения развития первичных защитных реакций на действие патогенов на уровне клеток растения определяли образование апопластного пероксида водорода. При действии *Pcc* и его метаболитов первый неспецифический пик образования пероксида водорода в суспензионной культуре клеток наблюдается в точке 3 ч, после чего происходило устойчивое повышение уровня внеклеточного пероксида водорода, что свидетельствовало о развитии неуправляемого обширного некротического процесса.

Различия в интенсивности генерации АФК в культуре клеток табака при воздействии инфекционных агентов *Cms* и *Pcc* согласуется с результатами, полученными на целом растении. В результате действия *DC*, в составе которой предполагается присутствие термостабильных эффекторов и паттернов происходил запуск генерации активных форм и разрушение клеток растений с образованием

некротов меньшего диаметра. А внесение *CF*, в котором молекулярные микробные паттерны отсутствуют, но присутствуют гидролитические ферменты и токсины, привело к более низкому уровню генерации АФК, а диаметры некротов в месте инфицирования были значительно больше.

Предварительная инокуляция растений табака *in vitro* экзометаболитами *Sms* и *Pcc* (*CF* и *DC*) приводила к развитию устойчивости растения к последующему инфицированию *Pcc* с КОЕ 1×10^9 – наблюдалось полное или частичное отмирание листа, но растение не погибало и сохраняло жизнеспособность. Инфицирование *Pcc* с КОЕ 2×10^9 , т.е. с высокой инфекционной нагрузкой – приводило к гибели растения, но гибель наступала на 4 сут, что на 2-е сут позже, чем без предварительной обработки, что свидетельствует о повышении жизнеспособности. Таким образом, предварительная обработка растений метаболитами *Sms* и *Pcc* способствовала повышению устойчивости к инфицированию.

Дальнейшие работы показали, что инфицирование растений табака биотрофом *Sms*, сопровождающееся развитием СЧ реакции, защищало растения второго поколения от инфицирования некротрофом *Pcc*. Наблюдалось отмирание листа инфицированного *Pcc*, но целое растение, выращенное из семян инфицированного *Sms* растения, оставалось не только неповрежденным, но происходило образование новых листьев. Растение табака выживало при любом способе первичного инфицирования – путем инъекции, нанесения капли бактериальной суспензии или заражения через корневую систему.

Выводы.

1. Действие экзометаболического комплекса как *Sms*, так и *Pcc* приводит к развитию у растений табака реакций специфического эффектор-активируемого иммунитета, что сопровождается индукцией реакцией сверхчувствительности. Культуральная жидкость, лишенная бактериальных клеток, более активна в отношении индукции СЧ-реакции, чем термически инактивированная бактериальная суспензия, вероятно, за счет содержания гидролитических ферментов и токсинов, выделяющихся бактерией в среду культивирования, которые инактивируются при термической обработке. Первичная элиситация биотрофным патогеном *Sms* активирует иммунитет растения, что приводит к индукции системной приобретенной устойчивости в период одной вегетации, определяющий устойчивость последующего поколения растений. Таким образом, полученные данные свидетельствуют в пользу синергизма при взаимодействии SA- и JA-сигнальных путей иммунитета растений в изучаемых нами фитопатосистемах.

2. Детальное изучение состава и структуры экзометаболических некротрофного и биотрофного патогена, которые наиболее эффективны в активации собственных иммунных сил растительного организма, позволит создать экологически безопасные средства защиты растений от широкого круга фитопатогенов, что особенно актуально в условиях ухудшающейся экологической обстановки с повышающейся устойчивостью фитопатогенов к пестицидам.

Работа выполнена на оборудовании ЦКП «Биоаналитика» с использованием коллекции ЦКП «Биоресурсный центр» Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (г. Иркутск).

Литература

Дьяков Ю.Т., Озерецковская О.Л., Джавахия В.Г., Багирова Ф.С. Общая и молекулярная фитопатология: учеб. пособие. – М.: Общество фитопатологов, 2001. – 302 с.

Кузьмич С.В., Доменикан А.В., Николайчик Е.А. Идентификация hrpL-зависимых генов *Pectobacterium carotovorum*. – Тез. докл. Второй летней школы по биоинформатике (СПб., 27 июля– 1 августа 2014 г.), 2014. – С. 31–34.

Омеличкина Ю.В., Шафикова Т.Н., Алексеенко А.Л., Маркова Ю.А., Еникеев А.Г., Рихванов Е.Г. Ответные реакции растений и культуры клеток табака на заражение *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* // В мире научных открытий. –2010. – № 1-4. – С. 89–94.

Поликсенова В.Д. Индуцированная устойчивость растений к патогенам и абиотическим стрессовым факторам (на примере томата) // Вестник Белорусского государственного университета. Сер. 2. – 2009. – № 1. – С. 48–60.

Прудникова С.В. Микробиология с основами вирусологии: конспект лекций. – Красноярск: ИПК СФУ, 2008. – 152 с.

Тютюрев С.Л. Научные основы индуцированной болезнестойчивости растений. – СПб.: ВИЗР, 2002. – С. 328.

Шафикова Т.Н., Омеличкина Ю.В. Молекулярно-генетические аспекты иммунитета растений к фитопатогенным бактериям и грибам // Физиология растений. – 2015. – Т. 62, № 5. – С. 611–625.

Davidsson P.R., Kariola T., Niemi O., Palva E.T. Pathogenicity of and plant immunity to soft rot pectobacteria // *Frontiers in Plant Science*. – 2013. – V. 4. – P. 264–272.

Eichenlaub R., Gartemann K.H. The *Clavibacter michiganensis* subspecies: molecular investigation of gram-positive bacterial plant pathogens // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 2001. – V. 49. – P. 445–464.

Glazebrook J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens // *Annu Rev Phytopathol.* – 2005. – V. 43. – P. 205–227.

Omelichkina Y.V., Boyarkina S.V., Shafikova T.N. Induction of systemic acquired resistance of plants by exometabolites of causal agent of potato ring rot // *In the world of scientific discoveries*. – 2014. – No. 10 (58). – P. 156–167.

Torres M.A., Jones J. D. J., Dangl J. L. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens // *Plant Physiology*. – 2006. – V. 141, No. 2. – P. 373–378.

Zhibing Lai T.M. Genetic and cellular mechanisms regulating plant responses to necrotrophic pathogens // *Current Opinion in Plant Biology*. – 2013. – V. 16, No. 4. – P. 505–512.

RESPONSE REACTIONS OF TOBACCO PLANTS ON THE IMPACT OF BIOTROPHIC *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* AND NECROTHROPHIC *PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM*

S.V. Boyarkina, Yu.V. Omelichkina, T.N. Shafikova

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, klyuevskaya@ya.ru

Abstract. Infection of plants with a suspension of the biotrophic pathogen *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* and its exometabolites induces the development of systemic resistance of the plant to subsequent infection with the necrotrophic of *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum*. Resistance to necrotrophic microorganism persists in the second generation of plants. It allows one to consider the development of immune memory when infected with biotrophic microorganism.

Keywords: *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, *Nicotiana tabacum*, *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum*, systemic acquired resistance (RAS)