

ОСОБЕННОСТИ ИММУННЫХ РЕАКЦИЙ В ЛИСТЯХ И КЛУБНЯХ РАСТЕНИЙ *SOLANUM TUBEROSUM* ПРИ ЗАРАЖЕНИИ БАКТЕРИЯМИ *PECTOBACTERIUM VERSATILE*

А. В. КОЛУБАКО¹⁾, Н. А. ГРИГОРЬЕВА¹⁾,
Е. В. ШРУБ¹⁾, Е. А. НИКОЛАЙЧИК¹⁾

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

Аннотация. Проанализированы паттерны экспрессии генов основных компонентов гормональной регуляции в листьях и клубнях растений картофеля при внедрении бактерий *Pectobacterium versatile* в целях выявления зависимых от гормонального статуса механизмов иммунной защиты. На основе данных об экспрессии генов биосинтеза абсцизовой кислоты высказано предположение о том, что количество активной формы этой кислоты снижается. Отмечено подавление экспрессии жасмонатзависимых генов. Показано, что этилензависимые транскрипционные факторы экспрессируются разнонаправленно в листьях и клубнях растений картофеля.

Ключевые слова: молекулярная фитопатология; *Solanum tuberosum*; *Pectobacterium versatile*; гормональная регуляция иммунитета растений.

Благодарность. Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Б24М-035) и Министерства образования Республики Беларусь (№ гос. регистрации 20241129).

Образец цитирования:

Колубако АВ, Григорьева НА, Шруб ЕВ, Николайчик ЕА. Особенности иммунных реакций в листьях и клубнях растений *Solanum tuberosum* при заражении бактериями *Pectobacterium versatile*. Экспериментальная биология и биотехнология. 2025;3:62–73.
EDN: GBJKYN

For citation:

Kalubaka NV, Hryhoryeva NA, Shrub KV, Nikolaichik YA. Features of immune reactions in leaves and tubers of *Solanum tuberosum* plants during infection by *Pectobacterium versatile* bacteria. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2025;3:62–73. Russian.
EDN: GBJKYN

Авторы:

Анастасия Вячеславовна Колубако – заведующий научно-исследовательской лабораторией трансгенных растений кафедры молекулярной биологии биологического факультета.
Надежда Александровна Григорьева – студентка биологического факультета. Научный руководитель – А. В. Колубако.
Екатерина Викторовна Шруб – младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории трансгенных растений кафедры молекулярной биологии биологического факультета.
Евгений Артурович Николайчик – кандидат биологических наук, доцент; заведующий кафедрой молекулярной биологии биологического факультета.

Authors:

Nastassia V. Kalubaka, head of the laboratory of transgene plants, department of molecular biology, faculty of biology.
kolubakoav@yandex.by
Nadzeya A. Hryhoryeva, student at the faculty of biology.
grigorieva887@gmail.com
Katerina V. Shrub, junior researcher at the laboratory of transgene plants, department of molecular biology, faculty of biology.
shrubkaterina@gmail.com
Yevgeny A. Nikolaichik, PhD (biology), docent; head of the department of molecular biology, faculty of biology.
yevgenynikolaichik@gmail.com

FEATURES OF IMMUNE REACTIONS IN LEAVES AND TUBERS OF *SOLANUM TUBEROSUM* PLANTS DURING INFECTION BY *PECTOBACTERIUM VERSATILE* BACTERIA

N. V. KALUBAKA^a, N. A. HRYHORYEVA^a, K. V. SHRUB^a, Y. A. NIKOLAICHUK^a

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

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

Abstract. We analysed the expression patterns of genes of the main components of hormonal regulation in leaves and tubers of potato plants infected with *Pectobacterium versatile* bacteria to identify hormonal status-dependent immune defense mechanisms. Based on gene expression data for abscisic acid biosynthesis, it is suggested that the amount of the active form of this acid decreases. Suppression of jasmonate-dependent gene expression was observed. Ethylene-dependent transcription factors were shown to be expressed in different directions in potato leaves and tubers.

Keywords: molecular phytopathology; *Solanum tuberosum*; *Pectobacterium versatile*; hormonal regulation of plant immunity.

Acknowledgements. This work was carried out with financial support from the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (grant No. B24M-035) and the Ministry of Education of the Republic of Belarus (state registration No. 20241129).

Введение

Бактериозы являются актуальной проблемой, существенно ограничивающей продуктивность растений картофеля. Самые распространенные бактериальные патогены этой культуры – представители рода *Pectobacterium*. Для Беларуси наиболее актуален вид *P. versatile*, способный инфицировать как надземные, так и подземные части растения, вызывая развитие черной ножки стеблей и мягкой гнили клубней. Изолированный в Беларуси из клубней растений картофеля штамм 3-2, сейчас классифицируемый как *P. versatile*, первоначально был описан как *Erwinia atroseptica*, а в последующих публикациях в соответствии с изменениями классификации пектобактерий упоминался как *E. carotovora* subsp. *atroseptica* и *P. carotovorum*.

Вид *P. versatile*, будучи преимущественно некротрофом, активно продуцирует и секретирует ферменты для лизиса клеточной стенки растений (полигалактуроназы, пектацеллюлазы и целлюлазы [1]), а также вводит эффекторный белок DspE прямо в клетки растения-хозяина [2]. Белок DspE в клетках связывается с рецепторподобными киназами RLK2 и RLK5 [3] и меняет иммунный ответ растений, в результате чего происходят снижение экспрессии этих RLK, запуск киназного сигнального каскада [4], снижение экспрессии защитного белка PR1 [3; 5], обладающего антибактериальной активностью, а также запуск гибели клеток, что выгодно некротрофному патогену.

Иммунные реакции растений в значительной степени контролируются гормонами. Гормоны регулируют все жизненные процессы растений – от прорастания семян и вегетативного развития до генеративной стадии и периода покоя. Помимо процессов развития и поддержания гомеостаза, они отвечают за регуляцию ответов растения на абиотические и биотические стрессовые факторы среды. Соответственно, количество гормонов и их относительный состав в разные периоды роста, в различных органах растений и при разных условиях среды отличаются.

Абсцизовая кислота (АБК), помимо регуляции стрессовых реакций, играет важную роль в поддержании периода покоя клубней картофеля *Solanum tuberosum* [6; 7]. Максимальное ее количество наблюдается после сбора урожая, затем, ближе к высадке, уровень АБК постепенно снижается, что позволяет клубню прорасти. Концентрация АБК находится в обратной зависимости от температуры окружающей среды [6]. Замечена прямая зависимость между содержанием этилена и количеством АБК в период покоя: уровень этилена в начале периода покоя клубней также довольно высок, однако затем быстро снижается [8]. Кроме того, известно, что на протяжении периода покоя в клубнях повышен уровень жасмонатов [9]. Ауксин и цитокинин регулируют процессы прорастания клубней, и их концентрация в этот период повышается [10; 11], затем активируются гиббереллины, которые регулируют рост проростков [12]. Сигнальные пути всех перечисленных гормонов напрямую или косвенно участвуют в иммунном ответе растений.

Поскольку иммунный ответ растений находится под гормональным контролем, а гормональный статус клубней и надземных частей растения различается, оценка тканеспецифичных аспектов иммунных реакций необходима как для понимания работы иммунной системы растений картофеля, так и для сравнения результатов экспериментов, проведенных разными исследовательскими группами в отличающихся условиях. В рамках настоящей работы был выполнен анализ различий в иммунном ответе надземной (листья) и подземной (клубни) частей растений картофеля на внедрение бактерий *P. versatilis*.

Материалы и методы исследования

Растения *S. tuberosum* сорта Рогнеда выращивали в климатической камере при температуре 22 °C и 16-часовом световом дне. Клубни картофеля хранили при температуре 4 °C. Бактерии *P. versatilis* JN42 (штамм дикого типа) и *P. versatilis* VKE (штамм, мутантный по эффектору системы секреции III типа DspE) культивировали при температуре 28 °C.

Клубни картофеля сорта Рогнеда категории «суперсуперэлита» заражали весной по окончании периода покоя. Для эксперимента использовали посадочный материал одинакового калибра (6+, или 60 мм). С помощью автоматической пипетки в клубни вводили по 10 мкл суспензий клеток штамма *P. versatilis* JN42 или *P. versatilis* VKE в 0,85 % NaCl плотностью $3 \cdot 10^7$ клеток на 1 мл. В каждый клубень делали два укола со стороны столона под углом 45° к продольной оси клубня. Эксперимент проводили в 11 биологических повторях.

Для исследования надземных частей растений *S. tuberosum* клубни высаживали в начале мая. Через 45 дней после посадки с использованием шприца без иглы проводили инфильтрацию листьев суспензиями клеток штаммов *P. versatilis* JN42 и *P. versatilis* VKE в 0,85 % NaCl плотностью $5 \cdot 10^8$ клеток на 1 мл. Площадь инфильтрации составляла примерно 1/10 часть конечной доли прерывисто-непарноперисто-рассеченного листа. Эксперимент проводили в 13 биологических повторях.

Плотность суспензий штаммов для инокуляции листьев и клубней растений картофеля различалась, так как для индукции реакции гиперчувствительности в листьях требуется значительно более высокая доза клеток патогена, чем для заражения клубней. Проявление симптомов в листьях происходит быстрее, чем в клубнях, поэтому учет результатов проводили в разное время: через 24 ч в листьях и через 48 ч в клубнях.

Измерение уровня экспрессии генов осуществляли методом количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией. Подбор референсных генов выполняли с помощью алгоритма *geNorm* (версия 3.5), расчет экспрессии по нескольким референсным генам и статистический анализ – с помощью программного обеспечения *REST 2009* (версия 2.0.13), округляя значения *p*-критерия до тысячных долей. В качестве референсных генов в листьях и клубнях растений картофеля были выбраны гены *CAC*, *SAND* и *EF1α*. Для измерения уровня экспрессии генов использованы олигонуклеотиды, перечисленные в табл. 1 (указаны идентификаторы генов сборки DM6.1 референсного генома дигаметоидной линии *S. tuberosum* DM1-3 516 R44 или идентификатор Национального центра биотехнологической информации (*National Centre for Biotechnology Information*, NCBI) в случае с геном *ERF13*, не аннотированным в сборке DM6.1).

Таблица 1

Список использованных олигонуклеотидов

Table 1

List of primers

Ген	Идентификатор	Продукт	Последовательность олигонуклеотидов (5'–3')
<i>CAC</i>	Soltu.DM.02G019690	Компонент клатрин-адаптерного комплекса	CCTCCGTTGTGATGTAACCTGG ATTGGTGGAAAGTAACATCATCG
<i>SAND</i>	Soltu.DM.01G025490	Белок с неизвестной функцией	TTGCTTGGAGGAACAGACG GCAAAACAGGACCCCTGAATC
<i>EF1α</i>	Soltu.DM.11G022490	Субъединица 1-альфа фактора элонгации	TTGATGCTCTTGACCAGATTAACG ACGGGCACAGTTCCAATACC

Окончание табл. 1
Ending of the table 1

Ген	Идентификатор	Продукт	Последовательность олигонуклеотидов (5'–3')
<i>AAO3</i>	Soltu.DM.11G024460	Оксидаза абсцизового альдегида	CTGATTCGCCAGGCACAAACA CACTGACAGCAGCGCCAAAG
<i>NCED3</i>	Soltu.DM.07G022620	9- <i>цис</i> -Эпоксикаротиноид- диоксигеназа	TGCTGAACCATGGCCAAAAGT ACCATCGTCTTCCTCCTTGCT
<i>CYP707a1</i>	Soltu.DM.08G003250	Гидроксилаза АБК	GGCAATGGGGTTCATCATGTC GCCACCATAGACCACCTGTA
<i>PR1b</i>	Soltu.DM.09G007030	Связанный с патогенезом белок 1b	GGGAGAAGCCAAACTACAATATG TTGCATGAAATGAACCACCATCC
<i>PR2</i>	Soltu.DM.01G019850	Эндо-1,3-β-глюкозидаза, изоформа 2	CTAATGCGGTGGTACAAGATGG TGACACAACAATTCCTACAGATCC
<i>PR5</i>	Soltu.DM.08G027300	Осмотин	ATTTGAGGTCCATAACAACGTGCC GCAATTAGTACGACCCCAATACG
<i>PR10a</i>	Soltu.DM.09G027690	Связанный с патогенезом белок семейства Bet v1	TATGAGTCAACAACCACAATTTCCC TGGACCACCTTCAACAAAGTTC
<i>HIN1</i>	Soltu.DM.10G025370	NDR1/HIN1-подобный белок	GCAACTGCATTTTCCAAATCATC CACGTAGAAATTGACCTTGTTAGG
<i>JAZ1</i>	Soltu.DM.07G012950	Негативный регулятор жасмонатзависимых генов	ATCGGAACCGGAAAAGGCAC AAGGTACTTTTGCAGTCAGCCT
<i>AP2.1</i>	Soltu.DM.01G020840	Белок с доменом AP2/ERF	GAAGGGTGTCCGTGTTTGGC TAGCAGGTGGTGATGGGACG
<i>ERF13</i>	XM_006347891	Этилензависимый транскрипционный фактор, подобный ERF13	AGTCAACAACACCTTTGGAGCA CCTTTTCTCTCGGGGTCCCT
<i>WRKY71</i>	Soltu.DM.12G028900	Транскрипционный фактор WRKY	TGTCCAGCAACTCTTAGGGGA GCCCGCAGAAGTAATGAGGAG

Для идентификации сайтов связывания исследуемых транскрипционных факторов с помощью алгоритма *BLAST* в базе данных CIS-BP [13] выполняли поиск наиболее близких гомологов с известными мотивами сайтов связывания. При наличии нескольких вариантов мотивов выбирали лучший по комбинации двух критериев – степени сходства транскрипционных факторов и информационного содержания мотива. Характеристики использованных мотивов приведены в табл. 2. Поиск сайтов связывания в промоторных областях выполняли с помощью алгоритма *MAST* [14] (версия 5.5.7) с параметрами по умолчанию.

Таблица 2

Мотивы сайтов связывания транскрипционных факторов

Table 2

Motif of transcription factor binding sites

Транскрипционный фактор	Гомолог	Идентификатор в базе данных CIS-BP	Информационное содержание, бит
AP2.1	A0A1D6I4Y7 (<i>Zea mays</i>)	M08630_3.00	15,2
ERF13	Q8L9K1 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	M01697_3.00	14,6
WRKY71	Q93WV4 (<i>A. thaliana</i>)	M07779_3.00	15,1
MYC2	PK18474.1 (<i>Cannabis sativa</i>)	M01209_3.00	13,1

Результаты и их обсуждение

Реакция гиперчувствительности в листьях и мягкая гниль клубней растений *S. tuberosum*, вызываемые бактериями *P. versatile*. Инфильтрация листьев растений *S. tuberosum* суспензиями штаммов *P. versatile* JN42 (штамм дикого типа) и *P. versatile* VKE (*dspE*-мутант) индуцирует реакцию гиперчувствительности по всей зоне инфильтрации (рис. 1, а и в–д). Введение суспензий штаммов в клубни приводит к развитию мягкой гнили спустя 2 сут после заражения (рис. 1, б). Реакция растений картофеля на введение суспензий обоих штаммов (JN42 и VKE) четко отличается от их реакции на инфильтрацию 0,85 % NaCl (контроль), тогда как существенных фенотипических отличий в реакции растений на два использованных штамма в этой серии экспериментов не выявлено.

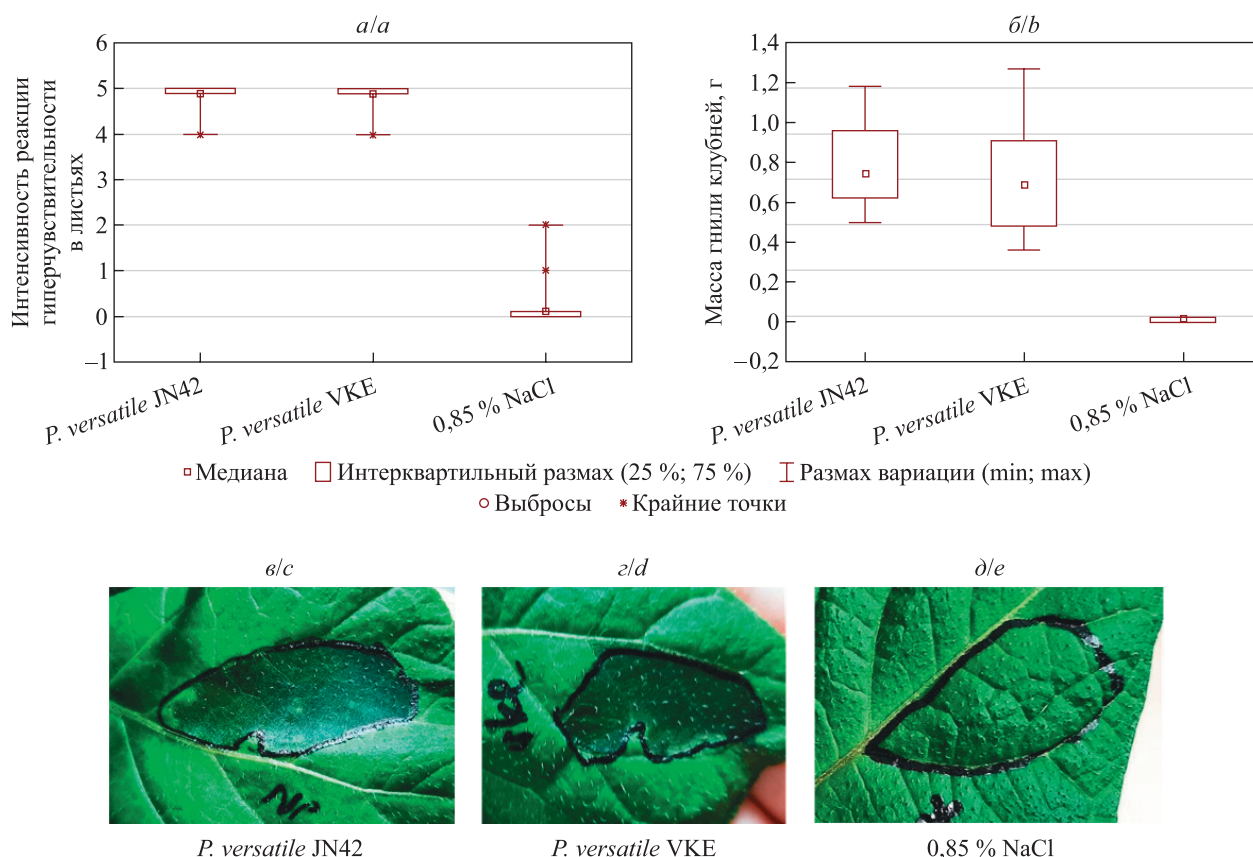


Рис. 1. Интенсивность реакции гиперчувствительности в листьях (а) и масса гнили клубней (б) растений *S. tuberosum* при внедрении бактерий *P. versatile* JN42 (штамм дикого типа) и *P. versatile* VKE (*dspE*-мутант). Фотографии типичной реакции в листьях растений картофеля на заражение патогеном (в–д). Различия по сравнению с контролем (0,85 % NaCl) в листьях достоверны при $p = 0,000\ 005$ для штамма дикого типа и $p = 0,000\ 012$ для *dspE*-мутанта, в клубнях – при $p = 0,000\ 003$ для штамма дикого типа и $p = 0,000\ 132$ для *dspE*-мутанта

Fig. 1. Intensity of the hypersensitivity reaction in leaves (a) and tuber rot weight (b) of *S. tuberosum* plants inoculated with *P. versatile* JN42 (wild-type strain) and *P. versatile* VKE (*dspE* mutant) bacteria.

Photographs of a typical reaction in potato plant leaves to pathogen infection (c–e).

Differences compared to the control (0.85 % NaCl) in leaves are significant at $p = 0.000\ 005$ for the wild-type strain and $p = 0.000\ 012$ for the *dspE* mutant, in tubers – at $p = 0.000\ 003$ for the wild-type strain and $p = 0.000\ 132$ for the *dspE* mutant

Разница в изменении экспрессии PR-генов при заражении бактериями *P. versatile* в листьях и клубнях растений *S. tuberosum*. В целом в листьях растений картофеля в ответ на внедрение патогена экспрессия PR-генов возрастает (рис. 2, а). Экспрессия гена *PR1b* конечного звена салицилатной сигнализации при заражении штаммом дикого типа повышается в 3,5 раза ($p = 0,000$), а при заражении *dspE*-мутантом возрастает десятикратно ($p = 0,000$) по сравнению с экспрессией данного гена в контрольных растениях. Экспрессия гена *PR2* β-глюкозидазы при заражении бактериями *P. versatile* JN42 и *P. versatile* VKE увеличивается в 15 раз ($p = 0,000$) и 39 раз ($p = 0,000$), экспрессия гена *PR5* осмотина – в 4 раза ($p = 0,000$) и 7 раз ($p = 0,000$), а экспрессия гена *PR10a* – в 2 раза ($p = 0,000$) и 7 раз ($p = 0,000$) соответственно.

В клубнях растений картофеля наблюдается иная картина (рис. 2, б). В ответ на заражение бактериями *P. versatile* ген защитного белка PR1b снижает свою экспрессию в среднем в 250 раз ($p = 0,001$) при использовании штамма дикого типа и только в 6 раз ($p = 0,001$) при использовании мутантного штамма. Экспрессия гена PR2 при внедрении бактерий *P. versatile* JN42 и *P. versatile* VKE индуцируется в 37 раз ($p = 0,009$) и 23 раза ($p = 0,011$), а экспрессия гена PR5 – в 16 раз ($p = 0,008$) и 9 раз ($p = 0,009$) соответственно. Ген защитного белка PR10a при заражении бактериями *P. versatile* снижает свою экспрессию в диапазоне от 5 раз ($p = 0,001$) до 8 раз ($p = 0,003$).

Экспрессия гена харпининдуцируемого белка HIN1 (часто рассматриваемого как еще один PR-ген) сильно индуцируется при заражении клубней (в диапазоне от 53 раз ($p = 0,004$) при внедрении мутантного штамма до 84 раз ($p = 0,011$) при внедрении штамма дикого типа), однако в листьях такой сильной индукции не наблюдается: достоверная разница (в 1,8 раза ($p = 0,000$)) выявлена лишь при заражении бактериями *P. versatile* JN42.

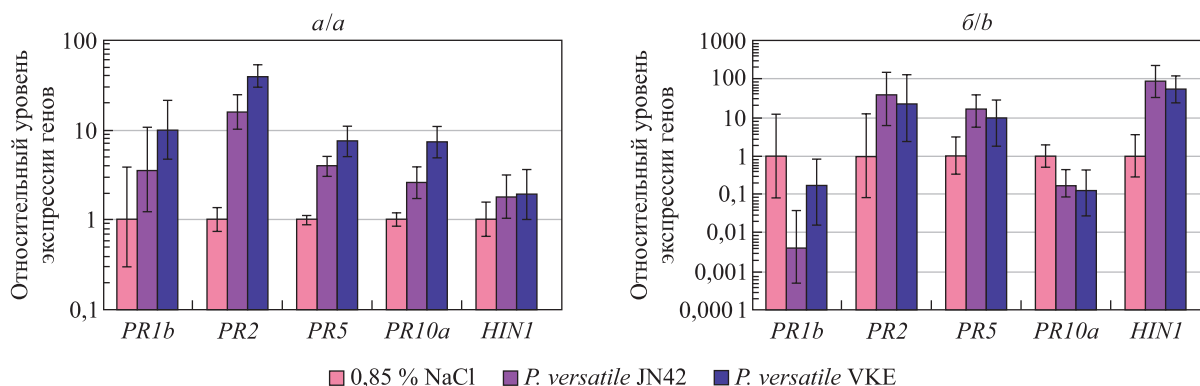


Рис. 2. Изменение уровня экспрессии PR-генов в листьях (а) и клубнях (б) растений *S. tuberosum* в ответ на внедрение бактерий *P. versatile* JN42 (штамм дикого типа) и *P. versatile* VKE (*dspE*-мутант) по сравнению с уровнем их экспрессии в контрольных растениях (0,85 % NaCl).

Указаны средние значения с 95 % доверительным интервалом

Fig. 2. Changes in PR gene expression level in leaves (a) and tubers (b) of *S. tuberosum* plants in response to the introduction of *P. versatile* JN42 (wild-type strain) and *P. versatile* VKE (*dspE* mutant) bacteria compared to their expression level in control plants (0.85 % NaCl).

Mean values with 95 % confidence intervals are shown

Можно предположить, что экспрессия исследуемых PR-генов зависит от сигнальных путей, контролируемых разными гормонами. Однако результаты опубликованных исследований неоднозначны и противоречивы, что может быть связано как с особенностями конкретных патосистем, так и с описанием под одним названием разных (неортологических) изоформ PR-генов. В ходе анализа доступных данных для наиболее вероятных ортологов (идентифицированных методом взаимного лучшего попадания) рассматриваемых в настоящей работе генов установлены следующие закономерности.

Белок PR1b был выявлен как один из мажорных внеклеточных белков листьев растений картофеля, зараженных патогеном *Phytophthora infestans* [15]. Экспрессия гена PR1b достигала максимума через 36 ч после заражения *P. infestans* и через 48 ч после заражения *P. syringae*, салицилат и жасмонат не влияли на уровень экспрессии, тогда как раны и этилен вызывали накопление мРНК гена PR1b через 72 ч [15]. Ортолог данного PR-гена у томата (называемый также у этого растения P6 и P14a) ингибирует сигнальную цепочку активации программируемой гибели клеток [16; 17].

Экспрессия гена PR10a в листьях растений томата индуцируется при заражении бактериями *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, причем инактивация гена основного эффектора данного патогена (XopN) усиливает эту индукцию, как и в зафиксированном нами случае с эффектором *P. versatile* [18]. Обработка растений томата салициловой кислотой индуцирует экспрессию гена PR10a (*TSI-1*) [19].

Ген HIN1, охарактеризованный у растений *S. tuberosum* как ген *StPOTHR1* устойчивости к патогену *P. infestans* и индуцирующийся при заражении этим патогеном [20; 21], в проведенном нами эксперименте имеет паттерн экспрессии, аналогичный таковому генов PR2 и PR5, но согласно данным опубликованного транскриптомного исследования (NCBI BioProject PRJNA851775) сильно индуцируется при раневом ответе, что характерно для жасмонатзависимых генов.

В патосистеме *S. lycopersicum* – *Ralstonia solanacearum* происходит рост экспрессии генов PR1b, PR2 и PR5 при увеличении в растении концентрации салициловой кислоты [17]. В растениях картофеля при заражении некротрофным патогеном *Rhizoctonia solani* повышение уровня экспрессии гена PR2 связано с жасмонат- и этилензависимым сигнальным путем [20].

Для ортолога гена *PR2* в суспензионной культуре клеток *Nicotiana tabacum* показана репрессия транскрипции при добавлении АБК [22]. В растениях *A. thaliana* не только продемонстрирована АБК-зависимая транскрипционная регуляция данной изоформы гена *PR2*, но и подтверждена роль ферментативной β -1,3-глюканазной активности продукта этого гена в деградации каллозы, являющейся протекторным β -глюканом, откладываемым растениями вокруг очага первичной инфекции [23].

Поскольку характер экспрессии *PR*-генов существенно отличался в двух исследованных органах, а данные литературы содержали противоречивую информацию о регуляции этих генов, была проведена оценка уровня экспрессии маркерных генов основных гормональных путей.

Дифференциальная экспрессия генов метаболизма АБК, указывающая на снижение концентрации активной формы гормона при заражении бактериями *P. versatile* и в листьях, и в клубнях растений *S. tuberosum*. В листьях растений картофеля в ответ на заражение штаммом *P. versatile* JN42 в 3,4 раза ($p = 0,000$) уменьшается экспрессия гена *NCED3* 9-цис-эпоксикаротиноиддиоксигеназы – фермента, отвечающего за биосинтез АБК (рис. 3, а). При внедрении штамма *P. versatile* VKE достоверного снижения уровня экспрессии этого гена не наблюдается. Экспрессия гена *AAO3* оксидазы абсцизового альдегида уменьшается незначительно. В 3 раза ($p = 0,000$) возрастает экспрессия гена *CYP707a1* гидроксилазы АБК, переводящей АБК в неактивную форму, при инфицировании бактериями дикого типа. Большие доверительные интервалы не позволяют говорить о достоверном изменении уровня экспрессии данного гена в случае заражения мутантным штаммом.

В клубнях растений картофеля вызываемый патогеном эффект более выражен (рис. 3, б). Так, уровень экспрессии гена *NCED3* снижается в 9 раз ($p = 0,002$) при заражении штаммом дикого типа и в 4 раза ($p = 0,000$) при заражении *dspE*-мутантом. Экспрессия гена *AAO3* уменьшается примерно в 50 раз ($p = 0,000$) и 43 раза ($p = 0,001$), а экспрессия гена *CYP707a1* возрастает в 33 раза ($p = 0,001$) и 22 раза ($p = 0,000$) при инфицировании штаммами *P. versatile* JN42 и *P. versatile* VKE соответственно.

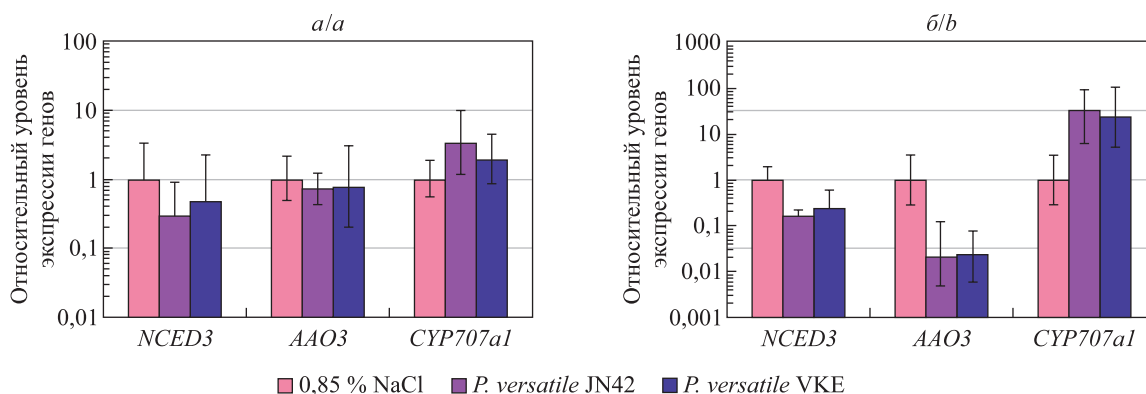


Рис. 3. Изменение уровня экспрессии генов метаболизма АБК в листьях (а) и клубнях (б) растений *S. tuberosum* в ответ на внедрение бактерий *P. versatile* JN42 (штамм дикого типа) и *P. versatile* VKE (*dspE*-мутант) по сравнению с уровнем их экспрессии в контрольных растениях (0,85 % NaCl).

Указаны средние значения с 95 % доверительным интервалом

Fig. 3. Changes in the expression level of abscisic acid metabolism genes in leaves (a) and tubers (b) of *S. tuberosum* plants in response to the introduction of *P. versatile* JN42 (wild-type strain) and *P. versatile* VKE (*dspE* mutant) bacteria compared to their expression level in control plants (0.85 % NaCl). Mean values with 95 % confidence intervals are shown

Таким образом, зафиксировано более выраженное изменение уровня экспрессии генов метаболизма АБК в клубнях растений картофеля, однако направленность их экспрессии в обоих органах сходная. Можно предположить, что и в клубнях, и в листьях количество активной формы АБК уменьшается при заражении патогеном, а значит, сигнальный путь АБК подавляется. Это обстоятельство может приводить к снижению иммунитета, еще более сильной активации гниения клубней и индукции реакции гиперчувствительности в листьях, что только способствует развитию некротрофного бактериального патогена [24]. Примечательно, что в патосистеме с участием биотрофного фитопатогена *R. solanacearum* в корнях чувствительного варианта растений дикого вида картофеля *S. commersonii* отмечалось подавление экспрессии гена *CYP707a1* гидроксилазы АБК [25]. Увеличение количества АБК также негативно сказывалось на устойчивости растения табака к этому же патогену [26]. Все вышеперечисленное указывает на неоднозначную роль АБК в устойчивости растений к различным бактериальным фитопатогенам.

Подавление жасмонатной сигнализации при заражении бактериями *P. versatile* надземных и подземных тканей растений картофеля. В листьях растений картофеля при внедрении бактерий *P. versatile* JN42 и *P. versatile* VKE экспрессия гена негативного регулятора жасмонатзависимых генов *JAZ1* возрастает

ет в 3,0 раза ($p = 0,000$) и 6,7 раза ($p = 0,000$) соответственно (рис. 4, а). В инфицированных клубнях растений картофеля уровень экспрессии гена *JAZ1* повышается в 13 раз ($p = 0,004$) и 7 раз ($p = 0,026$) (рис. 4, б).

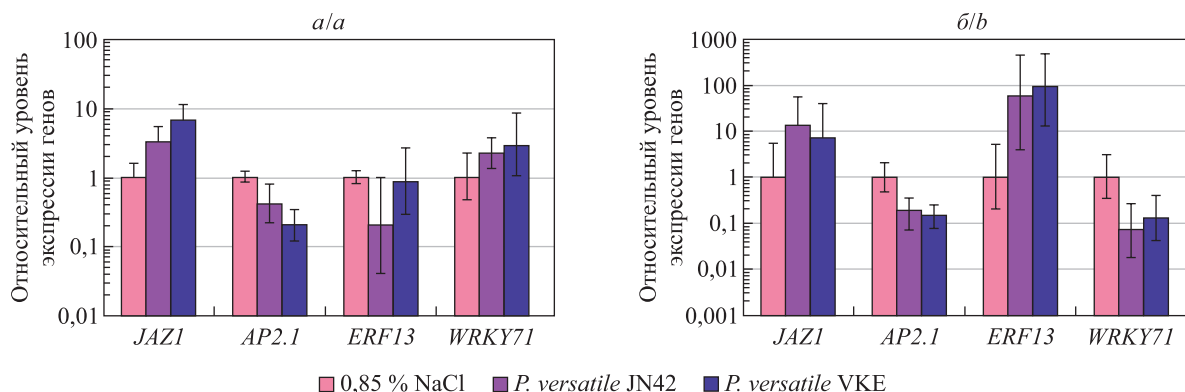


Рис. 4. Изменение уровня экспрессии генов транскрипционных факторов в листьях (а) и клубнях (б) растений *S. tuberosum* в ответ на внедрение бактерий *P. versatile* JN42 (штамм дикого типа) и *P. versatile* VKE (*dspE*-мутант) по сравнению с уровнем их экспрессии в контрольных растениях (0,85 % NaCl). Указаны средние значения с 95 % доверительным интервалом

Fig. 4. Changes in the expression level of transcription factor genes in leaves (a) and tubers (б) of *S. tuberosum* plants in response to the introduction of *P. versatile* JN42 (wild-type strain) and *P. versatile* VKE (*dspE* mutant) bacteria compared to their expression level in control plants (0.85 % NaCl). Mean values with 95 % confidence intervals are shown

Индукция гена *JAZ1* была зафиксирована в патосистеме *S. tuberosum* – *Dickeya solani* на ранних этапах заражения (через 1 ч), что может свидетельствовать о схожей реакции растений на внедрение некротрофных фитопатогенов [27].

Разница в регуляции транскрипционных факторов этиленовой сигнализации в листьях и клубнях растений *S. tuberosum* при заражении бактериями *P. versatile*. В листьях растений картофеля при инфицировании бактериями *P. versatile* JN42 и *P. versatile* VKE происходит снижение экспрессии гена транскрипционного фактора этиленовой сигнализации *AP2.1* примерно в 2,4 раза ($p = 0,000$) и 5,0 раза ($p = 0,000$) соответственно (см. рис. 4, а). Экспрессия гена другого транскрипционного фактора этого семейства – *ERF13* – при заражении штаммом дикого типа уменьшается в 5 раз ($p = 0,000$), а при заражении *dspE*-мутантом не снижается.

В клубнях растений картофеля экспрессия гена *AP2.1* при внедрении патогена меняется схожим образом: снижается примерно в 5 раз ($p = 0,005$) и 6 раз ($p = 0,003$) при инфицировании штаммами *P. versatile* JN42 и *P. versatile* VKE соответственно (см. рис. 4, б). Однако экспрессия гена *ERF13*, в отличие от реакции в тканях листьев, в тканях клубней, наоборот, возрастает в 59 раз ($p = 0,018$) при заражении штаммом дикого типа и в 94 раза ($p = 0,005$) при заражении *dspE*-мутантом.

Ген транскрипционного фактора *WRKY71* в листьях индуцируется примерно в 2 раза ($p = 0,000$) при внедрении патогена *P. versatile* JN42 (см. рис. 4, а), в то время как в клубнях его экспрессия, наоборот, снижается приблизительно в 14 раз ($p = 0,001$) при инфицировании штаммом дикого типа и в 8 раз ($p = 0,002$) при инфицировании мутантным штаммом бактерий (см. рис. 4, б).

Участие данных генов или их ортологов в растительном иммунитете слабо изучено. Транскрипционный фактор *SlWRKY71* активирует фермент *SIDCD1*, который стимулирует эндогенную продукцию H_2S , тем самым повышая устойчивость листьев к *P. syringae* pv. DC3000 [28].

Анализ сайтов связывания транскрипционных факторов, предполагающий перекрестную сигнализацию между гормонзависимыми сигнальными путями. Для оценки участия четырех исследуемых транскрипционных факторов выполнен анализ их потенциальных сайтов связывания в пределах 1000 пар нуклеотидов перед кодирующей последовательностью. Поскольку транскрипционные факторы семейства JAZ не связываются непосредственно с ДНК, а действуют, формируя комплекс с ДНК-связывающими транскрипционными факторами семейства MYC2 [29], для оценки жасмонатзависимой транскрипционной регуляции использован представитель последнего семейства (идентификатор M1BHA0 в базе данных UniProt), взаимодействующий с белком *JAZ1* по данным веб-ресурса KEGG.

Сайты связывания хотя бы одного транскрипционного фактора выявлены в промоторных областях всех исследуемых генов, за исключением генов *PR10a* и *ERF13* (табл. 3). Несмотря на не самые надежные

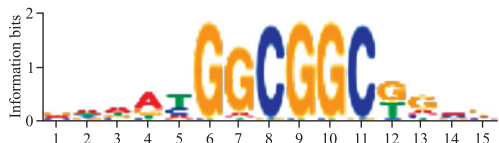
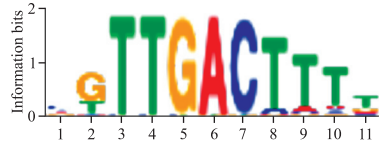
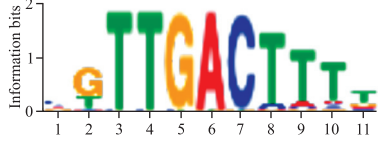
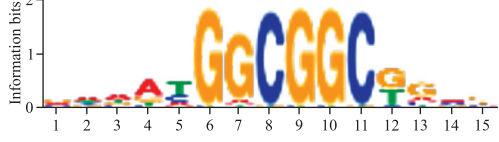
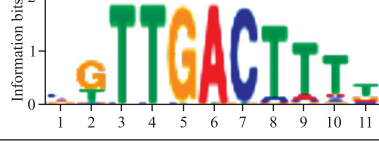
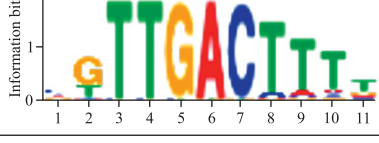
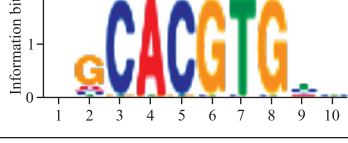
значения p -критерия, заслуживают внимания и дальнейшего экспериментального исследования следующие наблюдения. Идентификация сайтов связывания транскрипционного фактора WRKY71 перед своим собственным геном и транскрипционного фактора MYC2 перед геном *JAZ1* соответствует известным данным об их авторегуляции и подчеркивает корректность использованного метода анализа [25; 26]. Транскрипционный фактор ERF13 имеет сайт связывания в промоторной области гена *PR1b*, а паттерны экспрессии генов *ERF13* и *PR1b* совпадают и зависят от белка DspE. Для генов метаболизма АБК актуальна этилензависимая сигнализация с помощью транскрипционных факторов семейства AP2: прямая сигнализация через транскрипционный фактор AP2.1 для гена *AAO3* или сигнализация посредством потенциального транскрипционного каскада ERF13 → MYC2 для генов *NCED3* и *CYP707a1*. Сигнализация через транскрипционный фактор WRKY71 может быть связана с индукцией при контакте с пектобактериями генов *PR2*, *PR5* и *HIN1*. Наконец, расположение сайтов связывания свидетельствует о взаимосвязях между этилензависимой и салицилатзависимой, а также между этилензависимой и жасмонатзависимой сигнализацией.

Таблица 3

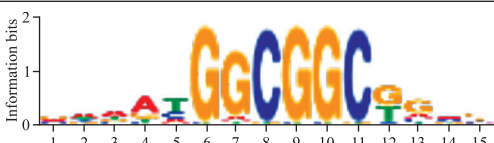
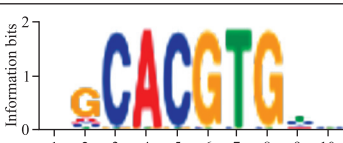
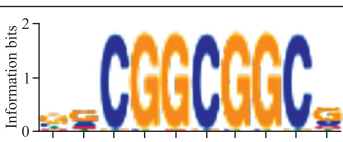
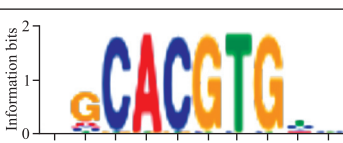
Сайты связывания транскрипционных факторов в промоторных областях исследуемых генов

Table 3

Binding sites of transcription factors in the promoter regions of the studied genes

Ген	Транскрипционный фактор	Логотип мотива	Число сайтов	Лучший сайт связывания	
				Последовательность олигонуклеотидов	Значение p -критерия
<i>PR1b</i>	ERF13		1	TTTAGGGCGGCTCAA	0,000 079
<i>PR2</i>	WRKY71		1	CTTTGACTTGA	0,000 053
<i>PR5</i>	WRKY71		1	AGTTGACTAAT	0,000 063
	ERF13		1	ATCTAGGCGGCTATA	0,000 087
<i>HIN1</i>	WRKY71		1	GATTGACTTTT	0,000 023
<i>JAZ1</i>	WRKY71		1	CGTTAACTTTT	0,000 095
	MYC2		1	AACACGTGTT	0,000 047

Окончание табл. 3
Ending of the table 3

Ген	Транскрипционный фактор	Логотип мотива	Число сайтов	Лучший сайт связывания	
				Последовательность олигонуклеотидов	Значение <i>p</i> -критерия
<i>AP2.1</i>	WRKY71		1	CTTTGACTTAT	0,000 011
<i>WRKY71</i>	WRKY71		3	ATTTGACTATT	0,000 029
<i>MYC2</i>	ERF13		1	TAATCGTCGGCTGCG	0,000 050
<i>NCED3</i>	MYC2		1	AACACGTGGT	0,000 056
<i>AAO3</i>	AP2.1		1	CCCCGCCGCC	0,000 030
<i>CYP707a1</i>	MYC2		1	TACACGTGCC	0,000 0079
<i>ERF13</i>	—	—	0	—	—
<i>PR10a</i>	—	—	0	—	—

Два из пяти проверенных *PR*-генов – *PR1b* и *PR10a* – при заражении бактериями *P. versatile* показали разнонаправленные изменения экспрессии в исследованных органах растений картофеля: индукцию в листьях, но репрессию в клубнях. Такой эффект может быть связан с особенностями гормональной регуляции в этих органах, поэтому интерес представляют выявленные изменения уровня экспрессии маркерных генов гормональной сигнализации. Все четыре гена транскрипционных факторов, являющихся конечными звеньями гормонзависимых сигнальных путей, демонстрируют отличия экспрессии в листьях и клубнях, однако два из них – *ERF13* и *WRKY71* – имеют противоположный характер экспрессии. Ген *ERF13* репрессируется в листьях, но индуцируется в клубнях, тогда как ген *WRKY71*, наоборот, индуцируется в листьях (только при заражении штаммом дикого типа) и репрессируется в клубнях. Из-за несовпадения DspE-зависимых паттернов экспрессии генов *ERF13* и *PR1b* связать их между собой нельзя, однако характеры экспрессии генов *WRKY71* и *PR10a* довольно хорошо совпадают, что позволяет рассматривать предположение о возможности регуляции экспрессии гена *PR10a* с помощью транскрипционного фактора WRKY71. Снижение экспрессии гена *WRKY71* в клубнях картофеля ранее было отмечено при заражении другим некротрофным патогеном из семейства *Pectobacteriaceae* – *D. solani* [27]. Ортолог этого гена у *A. thaliana* индуцируется перекисью водорода, АБК и гиперосмотическим стрессом [30; 31].

Заключение

В листьях и клубнях растений картофеля при заражении бактериями *P. versatile* отмечено снижение уровня экспрессии генов, контролирующих синтез АБК, и одновременно повышение уровня экспрессии

генов, контролирующих ее инактивацию, что позволяет говорить о высокой вероятности уменьшения концентрации активной формы АБК при инфицировании этим патогеном как надземных, так и подземных частей растения. Также повсеместно зарегистрировано подавление жасмонатной сигнализации.

Кроме того, при инфицировании тканей картофеля значительно изменяется уровень экспрессии этилензависимых транскрипционных факторов. Как и транскрипционные факторы с доменом AP2, транскрипционный фактор WRKY71 по-разному регулирует иммунный ответ в надземной и подземной частях растений картофеля.

Интересно, что ранее опубликованные данные об экспрессии маркерных генов у других растений семейства пасленовых отличаются от результатов, полученных в настоящей работе при внедрении бактерий *P. versatile* в растение картофеля. Так, у томата сорта Микро-Том при заражении этим патогеном наблюдается DspE-зависимая репрессия генов *NCED3* и *CYP707a1*, а экспрессия гена *AAO3* возрастает при инфицировании любым из штаммов. Экспрессия генов *PR2* и *PR5* при внедрении патогена не меняется [32]. В то же время для томата сорта Доходный и ортологов генов *PR1b*, *PR2* и *PR5* табака *N. benthamiana* наблюдается увеличение экспрессии вне зависимости от штамма [3]. Однако стоит отметить, что в клубнях дикого картофеля *S. bulbocastanum* паттерн экспрессии генов совпадает с тем, который наблюдается в настоящем исследовании, и почти подобен ему в надземной части растения, за исключением двух генов – *NCED3* и *AP2.1* [5].

Таким образом, каждая патосистема является уникальной и должна рассматриваться отдельно, а гормональная регуляция имеет особенности для каждого вида и обобщению не подлежит. Понимание таких сложных систем может стать ключом к эффективной борьбе с патогеном.

Библиографические ссылки

1. Бабицкая ЕВ, Песнякевич АГ, Николайчик ЕА. Характеристика мутантов бактерий *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* 3-2 с нарушенной секрецией пектатлиазы. *Прикладная биохимия и микробиология*. 1995;31(4):447–452. EDN: OSSJID.
2. Hogan CS, Mole BM, Grant SR, Willis DK, Charkowski AO. The type III secreted effector DspE is required early in *Solanum tuberosum* leaf infection by *Pectobacterium carotovorum* to cause cell death, and requires Wx_(3–6)D/E motifs. *PLoS One*. 2013;8(6):e65534. DOI: 10.1371/journal.pone.0065534.
3. Бадалян ОА, Николайчик ЕА. Рецепторподобные киназы RLC2 и RLC5 *Nicotiana benthamiana* участвуют в регуляции экспрессии генов ключевых компонентов иммунной системы растения при контакте с *Pectobacterium carotovorum*. *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия биологических наук*. 2014;4:75–80. EDN: TRPIQT.
4. Бадалян ОА, Николайчик ЕА. Участие MAP-киназ WIPK и SIPK растений *Nicotiana benthamiana* в детекции фитопатогена *Pectobacterium carotovorum*. *Доклады Национальной академии наук Беларуси*. 2013;57(6):75–81. EDN: WIQWTH.
5. Колубако АВ, Николайчик ЕА. Транскрипционный фактор WRKY65 участвует в регуляции иммунного ответа растений картофеля на *Pectobacterium versatile*. *Молекулярная и прикладная генетика*. 2021;31:83–92. DOI: 10.47612/1999-9127-2021-31-83-92.
6. Coleman WK, King RR. Changes in endogenous abscisic acid, soluble sugars and proline levels during tuber dormancy in *Solanum tuberosum* L. *American Potato Journal*. 1984;61(8):437–449. DOI: 10.1007/BF02852813.
7. Wang Z, Ma R, Zhao M, Wang F, Zhang N, Si H. NO and ABA interaction regulates tuber dormancy and sprouting in potato. *Frontiers in Plant Science*. 2020;11:311. DOI: 10.3389/fpls.2020.00311.
8. Tosetti R, Waters A, Chope GA, Cools K, Alamar MC, McWilliam S, et al. New insights into the effects of ethylene on ABA catabolism, sweetening and dormancy in stored potato tubers. *Postharvest Biology and Technology*. 2021;173:111420. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2020.111420.
9. Han Xiaozhen, Shao Shuai, Han Xiaocui, Zhang Yurong. Preparation and characterization of methyl jasmonate microcapsules and their preserving effects on postharvest potato tuber. *Molecules*. 2022;27(15):4728. DOI: 10.3390/molecules27154728.
10. Kolachevskaya OO, Lomin SN, Arkhipov DV, Romanov GA. Auxins in potato: molecular aspects and emerging roles in tuber formation and stress resistance. *Plant Cell Reports*. 2019;38(6):681–698. DOI: 10.1007/s00299-019-02395-0.
11. Engelbrecht L, Bielińska-Czarnecka M. Increase of cytokinin activity in potato tubers near the end of dormancy. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*. 1972;163(5):499–504. DOI: 10.1016/S0015-3796(17)31276-3.
12. Alexopoulos AA, Aivalakis G, Akoumianakis KA, Passam HC. Effect of gibberellic acid on the duration of dormancy of potato tubers produced by plants derived from true potato seed. *Postharvest Biology and Technology*. 2008;49(3):424–430. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2008.02.009.
13. Weirauch MT, Yang A, Albu M, Cote AG, Alejandro Montenegro-Montero A, Drewe P, et al. Determination and inference of eukaryotic transcription factor sequence specificity. *Cell*. 2014;158(6):1431–1443. DOI: 10.1016/j.cell.2014.08.009.
14. Bailey TL, Gribskov M. Combining evidence using *p*-values: application to sequence homology searches. *Bioinformatics*. 1998;14(1):48–54. DOI: 10.1093/bioinformatics/14.1.48.
15. Hoegen E, Strömberg A, Pihlgren U, Kombrink E. Primary structure and tissue-specific expression of the pathogenesis-related protein PR-1b in potato. *Molecular Plant Pathology*. 2002;3(5):329–345. DOI: 10.1046/j.1364-3703.2002.00126.x.
16. Lincoln JE, Sanchez JP, Zumstein K, Gilchrist DG. Plant and animal PR1 family members inhibit programmed cell death and suppress bacterial pathogens in plant tissues. *Molecular Plant Pathology*. 2018;19(9):2111–2123. DOI: 10.1111/mpp.12685.
17. Reichardt S, Reppe D, Tuzhikov AI, Galiullina RA, Planas-Marquès M, Chichkova NV, et al. The tomato subtilase family includes several cell death-related proteinases with caspase specificity. *Scientific Reports*. 2018;8:10531. DOI: 10.1038/s41598-018-28769-0.
18. Hotson A, Chosed R, Shu H, Orth K, Mudgett MB. *Xanthomonas* type III effector XopD targets SUMO-conjugated proteins in planta. *Molecular Microbiology*. 2003;50(2):377–389. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03730.x.

19. Vidya CSS, Manoharan M, Sita GL. Cloning and characterization of salicylic acid-induced, intracellular pathogenesis-related gene from tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Journal of Biosciences*. 1999;24(3):287–293. DOI: 10.1007/BF02941242.
20. Tian Z-D, Liu J, Xie C-H, Song B-T. Cloning of potato *POTHR-1* gene and its expression in response to infection by *Phytophthora infestans* and other abiotic stimuli. *Acta Botanica Sinica*. 2003;45(8):959–965.
21. Chen Q, Tian Z, Jiang R, Zheng X, Xie C, Liu J. *StPOTHR1*, a NDR1/HIN1-like gene in *Solanum tuberosum*, enhances resistance against *Phytophthora infestans*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2018;496(4):1155–1161. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.01.162.
22. Rezzonico E, Flury N, Meins F Jr, Beffa R. Transcriptional down-regulation by abscisic acid of pathogenesis-related β -1,3-glucanase genes in tobacco cell cultures. *Plant Physiology*. 1998;117(2):585–592. DOI: 10.1104/pp.117.2.585.
23. Oide S, Bejai S, Staal J, Guan N, Kaliff M, Dixelius C. A novel role of PR2 in abscisic acid (ABA) mediated, pathogen-induced callose deposition in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*. 2013;200(4):1187–1199. DOI: 10.1111/nph.12436.
24. Deb A, Kundu S. Deciphering cis-regulatory element mediated combinatorial regulation in rice under blast infected condition. *PLoS One*. 2015;10(9):e0137295. DOI: 10.1371/journal.pone.0137295.
25. Zuluaga AP, Solé M, Lu H, Góngora-Castillo E, Vaillancourt B, Coll N, et al. Transcriptome responses to *Ralstonia solanacearum* infection in the roots of the wild potato *Solanum commersonii*. *BMC Genomics*. 2015;16(1):246. DOI: 10.1186/s12864-015-1460-1.
26. Zhou J, Zhang H, Yang Y, Zhang Z, Zhang H, Hu X, et al. Abscisic 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/ern353.
27. Hadizadeh I, Peivastegan B, Wang J, Sipari N, Nielsen KL, Pirhonen M. Gene expression and phytohormone levels in the asymptomatic and symptomatic phases of infection in potato tubers inoculated with *Dickeya solani*. *PLoS One*. 2022;17(8):e0273481. DOI: 10.1371/journal.pone.0273481.
28. Zhao Y-Q, Sun C, Hu K-D, Yu Y, Liu Z, Song Y-C, et al. A transcription factor SIWRKY71 activated the H₂S generating enzyme *SIDCD1* enhancing the response to *Pseudomonas syringae* pv. DC3000 in tomato leaves. *New Phytologist*. 2025;246(1):262–279. DOI: 10.1111/nph.20431.
29. Major IT, Yoshida Y, Campos ML, Kapali G, Xin X-F, Sugimoto K, et al. Regulation of growth – defense balance by the jasmonate ZIM-domain (JAZ)-MYC transcriptional module. *New Phytologist*. 2017;215(4):1533–1547. DOI: 10.1111/nph.14638.
30. Yu Y, Wang L, Chen J, Liu Z, Park C-M, Xiang F. WRKY71 acts antagonistically against salt-delayed flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant & Cell Physiology*. 2018;59(2):414–422. DOI: 10.1093/pcp/pcx201.
31. 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.
32. Николайчик ЕА. Системная индукция PR-генов растений *Solanum lycopersicum* при контакте с бактериями *Pectobacterium carotovorum*: роль гена *dspE*. *Труды Белорусского государственного университета. Серия: Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем*. 2009;4(2):215–220. EDN: KBBFCF.

Получена 03.04.2025 / исправлена 27.09.2025 / принята 04.10.2025.
Received 03.04.2025 / revised 27.09.2025 / accepted 04.10.2025.