

МЕТАГЕНОМНЫЕ И ТРАНСКРИПТОМНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ РАСТИТЕЛЬНО-МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ НА ПРИМЕРЕ СНЕЖНОЙ ПЛЕСЕНИ ЗЛАКОВ И «ЧЕРНОЙ НОЖКИ» ПАСЛЕНОВЫХ

Ю.В. Гоголев¹, М.А. Сайганова², М.Д. Бойцова², А.С. Балкин³, В.Ю. Горшков¹

¹ Казанский научный центр Российской академии наук, Казань, Россия

² Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия

³ Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза, УрО РАН, Оренбург, Россия

Инфекционные заболевания растений приводят к большим потерям урожая в РФ и во всем мире. К числу основных причин этого относятся следующие: 1) слабая характеристика патоккомплексов, вызывающих многие инфекционные заболевания растений; 2) недостаток знаний о генетических основах устойчивости растений; 3) снижение эффективности фитопротекторных препаратов вследствие появления пестицид-резистентных штаммов патогенов; 4) недостаточная изученность для многих фитопатогенов механизмов патогенеза, что, в частности, затрудняет создание препаратов, специфичных к «мишеням» патогена.

Разработка современных геномных технологий открывает новые возможности для решения многих задач фитопатологии. Для внедрения и отработки данных технологий нами были взяты в качестве объекта «снежные плесени» озимых зерновых культур и «черная ножка» картофеля. Изучение снежных плесеней становится все более актуально по следующим причинам: 1) в последние годы значительно увеличилось как вредоносность грибов-возбудителей этих заболеваний, так и спектр поражаемых ими культур; 2) ключевые этапы патогенеза при поражении снежной плесенью в основном проходят до схода снега, что делает многие фунгицидные препараты не эффективными; 3) возбудители снежной плесени, несмотря на огромную вредоносность, относятся к наименее исследованным фитопатогенам; 4) сотрудниками ФИЦ КазНЦ РАН создана уникальная экспериментальная площадка – инфекционный питомник, который в течение 20 лет ежегодно экзогенно обогащается патоккомплексами, содержащими разные возбудители снежной плесени, для оценки селекционного материала и генетических ресурсов злаковых культур.

Первостепенной задачей данного исследования явилась характеристика патоккомплекса возбудителей и выявление его мажорных детерминант. Для этого был использован метод метагеномного баркодинга растений ржи, пораженной снежной плесенью в полевых условиях на экспериментальных площадках ФИЦ.

Анализ филогенетического положения грибов представителей микробиома образцов проводили по результатам секвенирования участков межгенного спейсера рибосомального оперона ITS2. Целевой фрагмент нарабатывали с помощью полимеразной цепной реакции с праймерами ITS3_KYO2 (5'-GAT GAA GAA CGY AGY RAA-3') и ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') с добавлением служебных последовательностей по протоколу «Illumina, Inc.» (США), содержащих линкеры и баркоды. Для определения таксономического состава сообщества бактерий были использованы праймеры Bakt_341F (5'-CCT ACG GGN GGC WGC AG-3') и Bakt_805R (5'-GAC TAC HVG GGT ATC TAA TCC-3') фланкирующие V3-V4 вариабельные регионы гена бактериальной 16S рРНК. ПЦР проводили с использованием Q5 Hot Start High-Fidelity 2× Master Mix (BioLabs, США). Высокопроизводительное секвенирование выполняли на платформе Illumina с использованием набора MiSeq v2ReagentKit (Illumina).

Проведенный анализ позволил нам выделить изоляты грибов, являющихся кандидатами основных возбудителей снежной плесени злаков в исследуемом регионе. Большинство выделенных изолятов, предварительно отнесенных к роду *Microdochium* (на основании морфологических и цитологических характеристик, а также ПЦР-анализа со специфичными праймерами), было вторично проанализировано с помощью метабаркодинга области межгенного спейсера рибосомального оперона. Для этого из изолятов выделяли индивидуальные препараты ДНК, используемой для амплификации ITS2 и последующего секвенирования ампликонов.

В результате проведенного анализа было показано, что 18 изолятов относились к трем генетическим группам, две из которых (7 изолятов), соответствовали *Microdochium nivale*, и одна группа (представленная 11 изолятами) соответствовала *Microdochium majus*. Эти два вида являются филогенетически близкими, однако ранее с развитием снежной плесени связывали только *M. nivale* (Hasegawa, 1985). Для представителей этих групп проведено полногеномное секвенирование с использованием платформ Illumina HiSeq 2500 и Oxford Nanopore MinION. Анализ полученных последовательностей позволит получить информацию о фитопатогенном потенциале данных микроорганизмов.

Бактериозы относятся к наиболее вредоносным заболеваниям растений. По данным продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН они вызывают до 50 % потери урожая. Особую опасность представляют мягкие гнили плодовых и «черная ножка» картофеля. Основным фактором патогенности вызывающих заболевание пектолитических бактерий (пектобактерий) служат гидролитические ферменты, разрушающие клеточную стенку растений, что приводит к некрозу тканей.

Пектобактерии обычно рассматриваются как патогены грубой силы, которые разрушают клетки и ткани растений, что приводит к симптомам «мягкой гнили». Тем не менее, во время взаимодействия с хозяином эти фитопатогены могут применять сложные долговременные стратегии благодаря тому, что геномы пектобактерий содержат гены, которые кодируют системы секреции III-го и VI-го типа, эффекторный белки, а также фитотоксины – оружие биотрофных «стелс» – патогенов. Эти инструменты используются для манипулирования макроорганизмом и провокации специфических ответов, повышающих его чувствительность и благоприятных для микробной колонизации. Однако, подобные ответы растений на пектобактерии, связанные с восприимчивостью к этим патогенам, остаются плохо изученными. Используя технологию высокопроизводительного секвенирования (RNA-Seq) нами были детально проанализированы транскриптомы бактериального и растительного компонентов патосистемы при различных сценариях инфицирования. Это позволило нам описать общую картину физиологии паразита и хозяина в ходе развития мягкой гнили.

В результате транскриптомного анализа было выявлено более восьми тысяч дифференциально экспрессированных генов (DEG) у зараженных и контрольных растений. Чтобы интерпретировать большое количество транскриптомных данных с точки зрения общей физиологии, кДНК выявленных DEG были функционально классифицированы в соответствии с различными общими (UniProt, KEGG, GenBank, Gene Ontology) и специфичными для растений базами данных (TAIR, SolGenomics, PlantPAN, PlantProm) с использованием BLASTX. Для классификации DEG по функциональным категориям и оценки повышающих и понижающих регуляторов были написаны пользовательские сценарии на языке программирования R. Эти скрипты в настоящее время находятся в свободном доступе на сайте GitHub (<https://github.com/RimGubaev>). Поскольку автоматическая классификация имеет множество погрешностей, она была проверена вручную и дополнена согласно литературным данным, чтобы избежать потери информации. Для представления сложной транскриптомной информации были выполнены общепринятые схемы и графики, для чего использовалось программное обеспечение KEGG Mapper, MapMan, BioСус, а также пользовательские сценарии на языке R.

Применение различных баз данных и вычислительных подходов позволило нам выполнить достаточно подробное описание транскриптома инфицированного растения. Было выявлено, что экспрессия генов, относящихся к категориям, связанным с такими гормональными системами, как жасмонат-зависимая (JA) и этилен-опосредованная, а также отвечающим за модификацию клеточной стенки, вторичный метаболизм, дыхание, деградацию белка и крахмала были значительно повышены во время инфекции. В свою очередь, процессы, которые контролируют клеточный цикл, развитие растений, ауксин- и гиббереллин-опосредованные ответы, а также фотосинтез были подавлены после инвазии патогена.

Имеются основания полагать, что изменения экспрессии генов нескольких функциональных категорий имеют отношение к модуляции восприимчивости растений. Например, индукция генов, связанных с жасмонатной системой, представляет собой восприимчивый ответ.

Салициловая (SA) и жасмоновая (JA) кислоты являются ключевыми регуляторами защитных реакций растений на инвазию патогенов. Однако, есть примеры, указывающие на то, что индукция этих систем приводит к восприимчивости растений. Принято полагать, что SA- и JA-индуцированные пути являются взаимоисключающими.

В свою очередь, патогены обладают различной степенью чувствительности к SA- и JA-индуцированным ответам растений и могут активировать тот тип ответа, который в меньшей степени влияет на их жизнеспособность. Например, биотрофные псевдомонады продуцируют фитотоксин коронатин, который активирует JA-зависимые реакции растений и подавляет SA-зависимые. В некротрофическом *Pectobacterium atrosepticum* (*Pba*) был обнаружен кластер генов, которые кодируют ферменты для биосинтеза коронафуциновой кислоты (*cfa*) – структурного компонента коронатаина. Несмотря на то, что *Pba* обычно рассматривается как возбудитель “грубой силы”, вызывающий мягкие гнили, он может обитать в хозяине без видимых повреждений в качестве биотрофного патогена. Ранее нами было высказано предположение, что различные типы взаимодействия могут быть связаны с изменениями баланса JA / SA у инфицированных растений.

Прежде всего, нами был проведен анализ активности JA- и SA-зависимых гормональных систем во время латентной и типичной инфекции у растений картофеля и табака путем анализа уровней экспрессии маркерных генов. Мы также оценили влияние предварительной обработки JA и SA на устойчивость растений к пектобактериям. Экспрессия генов JA-маркера активировалась во время типичной инфекции у растений табака и картофеля. Во время латентной инфекции экспрессия генов JA-маркера либо не отличалась от таковой у интактных растений, либо была значительно ниже, чем при острой инфекции. Типичная инфекция не была связана с активацией экспрессии SA-регулируемого гена PR1, однако во время скрытой инфекции содержание транскрипта этого гена увеличивалось. Таким образом, развитие заболевания с типичными симптомами связано с активацией JA-зависимой системы, которая не угнетает развитие патогенного организма в растении. Напротив, скрытая инфекция связана с индукцией SA-зависимой системы и снижением размножения патогена. Для подтверждения различного влияния JA- и SA-зависимых систем на развитие заболевания нами была проведена прединфекционная обработка растений экзогенным метилжасмонатом (MeJA) и SA. Было показано, что предварительная обработка SA ингибировала развитие симптомов заболевания, в то время как обработка MeJA не вызывала значительного эффекта.

Среди дифференциально активируемых генов бактерий в состоянии вирулентности ожидаемо были выявлены такие факторы вирулентности, как ферменты деградации клеточной стенки растений (PCWDE) и эффекторы систем внутриклеточной секреции.

Большинство генов, связанных с разрушением гомоалактуронана (12 из 17), были активированы в растениях по сравнению с условиями *in vitro*. В свою очередь, 5 из 8 генов, связанных с деградацией рамногалактуронана, были подавлены при бессимптомной инфекции.

Одним из выявленных феноменов было то, что гены бактериального локуса *cfa*, отвечающие за продукцию коронатаина, показали активацию в условиях, предшествующих мацерации растительных тканей. В связи с этим, нами была предпринята попытка определения роли *cfa* при взаимодействии растений с пектобактериями. Были сравнены стратегии колонизации растений диким типом *Pba* и *cfa*-мутантом. Было показано, что как *cfa*-мутантные бактерии, так и бактерии дикого типа способны размножаться внутри хозяина с той же эффективностью, формировать бактериальную эмболию и колонизировать первичные сосуды ксилемы. Однако, мутант не был способен колонизировать паренхиму и не вызывал мацерацию ткани. Это согласуется с данными о меньшей вирулентности *cfa*-мутанта для растений картофеля (Bell *et al.*, 2004).

Чтобы проверить, может ли коронатин активировать JA-ответы, мы сравнили экспрессию уровня гена JA-маркера (LOX) в инфицированных растениях. Уровень экспрессии гена LOX в растениях, зараженных *cfa*-мутантом, был выше по сравнению с интактными растениями, но значительно ниже по сравнению с растениями, зараженными пектобактериями дикого типа.

Благодаря применению новых подходов в транскриптомных исследованиях (Ettwiller *et al.*, 2016) нам удалось провести анализ дифференциальной экспрессии некодирующих РНК бактерий в инфицированных растениях. Было выявлено не менее 37 малых РНК, из которых 4 показывали дифференциальную транскрипционную активность в растениях по отношению к бактериальным культурам. Два транскрипта, *frnS* и *ASpks* заслуживают особого внимания. Первый из них кодируется антисмысловой цепью в непосредственной близости от промотора гена цинкового транспортера *zntB*.

Известно, что транспорт ионов железа, марганца, цинка и магния является критичным фактором для патогенеза бактерий. Транскрипт *ASpks* аннотирован по гомологии с малой РНК *Mycobacterium tuberculosis*, которая у микобактерий транскрибируется навстречу гену *pks12*, кодирующему поликетидсинтазу, необходимую для биосинтеза сложных липидов, вовлеченных в патогенез (Arnvig and Young, 2012). Картирование *ASpks* на геном *P. atrosepticum* показало, что эта РНК транскрибируется навстречу помотору гена *cfa7*. Активность его в клетках бактерий, инфицирующих растения, возрастает более чем в 30 раз.

Активация некодирующей РНК в локусе оперона *cfa* подтверждает его функциональную значимость в патогенезе и указывает на участие процесса РНК-интерференции в регуляторно-сигнальном каскаде, отвечающем за контроль синтеза коронатина. Многоступенчатая иерархическая регуляция активности генов свидетельствует об их ключевой роли в важнейших физиологических процессах.

Работа по аннотации некодирующих РНК *P. atrosepticum* начата сравнительно недавно (Kwenda et al., 2016) и в этом направлении еще многое предстоит сделать. В частности, в базе данных не представлена обнаруженная нами малая некодирующая РНК, транскрибируемая дивергентно гену регулятора кворум-сенсинга *expR*. Результаты показали высокую транскрипционную активность антисмысловой цепи в области *expR*-промотора. Ранее участие в регуляции кворум-сенсинга аналогичной РНК *yenS* было показано для *Yersinia enterocolitica* (Tsai, Winans, 2011). Была также показана дивергентная транскрипция малой РНК *esaS* с промотора гена кворум-регулятора *esaR* у *Pantoea stewartii* (Schu et al., 2009).

Таким образом, в проведенном исследовании были выявлены гены табака и *P. atrosepticum* SCRI1043, экспрессия которых различается у интактных растений и растений, инфицированных возбудителем мягкой гнили, при латентной инфекции и развитии симптомов заболевания. В результате проведенных исследований высказанное ранее предположение, что развитие симптомов заболевания, вызванного *Pba*, связано с балансом JA- и SA-зависимых ответов было подтверждено на уровне транскриптомного анализа инфицированных растений. Показано, что SA ингибирует размножение пектобактерий и определяет развитие бессимптомного взаимодействия патогена с хозяином. Развитие типичной инфекции связано с индукцией JA-опосредованных реакций, которые определяются продукцией коронатина клетками бактериального фитопатогена. Многоступенчатая иерархическая регуляция активности генов вирулентности *Pba* включает использование процесса РНК-интерференции, в том числе, с участием антисмысловой цис-транскрибируемой РНК. Полученные данные предоставляют новую информацию о маркерах вирулентности возбудителей мягкой гнили растений и возможных способах контроля данного вредоносного заболевания.

Биоинформатическая часть работы поддержана грантом РФФ 19-14-00194, работы по секвенированию грантом РФФ 17-14-01363, полевые исследования грантом РФФИ №20-34-70043.

ЛИТЕРАТУРА

- Arnvig K, Young D. Non-coding RNA and its potential role in *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. RNA Biol. 2012; 9(4):427–36.
- Bell, K.S., Sebaihia, M., Pritchard, L., Holden, M.T.G., Hyman, L.J., Holvea, M.C., et al. (2004). Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and characterization of virulence factors. Proceedings of the national Academy of Sciences of the United States of America, 101(30), 11105–11110.
- Ettwiller L., Buswell J7, Yigit E., Schildkraut I. A novel enrichment strategy reveals unprecedented number of novel transcription start sites at single base resolution in a model prokaryote and the gut microbiome. BMC Genomics. 2016; 17:199.
- Hasegawa M., Kishino H., and Yano T. (1985). Dating the human-ape split by a molecular clock of mitochondrial DNA. Journal of Molecular Evolution 22:160–174.
- Kwenda S., Gorshkov V., Ramesh A., Naidoo S., Rubagotti E., Birch P., Moleleki L. Discovery and profiling of small RNAs responsive to stress conditions in the plant pathogen *Pectobacterium atrosepticum*. BMC Genomics. 2016; 17:47.
- Schu D., Carlier A., Jamison K., Bodman S., Stevens A. Structure/Function Analysis of the *Pantoea stewartii* Quorum-Sensing Regulator *EsaR* as an Activator of Transcription. J Bacteriol. 2009; 191(24):7402–7409.
- Tsai C., Winans S. The quorum-hindered transcription factor *YenR* of *Yersinia enterocolitica* inhibits pheromone production and promotes motility via a small non-coding RNA. Mol Microbiol. 2011; 80(2):556–571.