

Регуляция экспрессии генов капусты *Brassica oleracea* TAL-эффекторами при заражении бактерией *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

К.К. Серёгина^{1*}, Ю.А. Антакова^{1,2}, А.Д. Антипов¹, О.Л. Ражина¹, М.В. Лебедева¹, В.В. Таранов¹

¹ ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия

² ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет», Москва, Россия

* k.k.seregina@gmail.com

Цель: Капуста *Brassica oleracea* часто подвергается такому заболеванию, как сосудистый бактериоз, вызываемый бактерией *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, что приводит к большим потерям урожая. Известно, что эффекторы, подобные активаторам транскрипции (TALE), *X. campestris* попадают внутрь клеток растений и скорее всего способствуют увеличению восприимчивости патогена, усиливая транскрипцию определенных генов хозяина. На данный момент знания о генах, отвечающих за восприимчивость капусты *X. campestris*, носят фрагментарный характер, поэтому изучение регуляции экспрессии генов-мишеней TAL-эффекторов в геноме капусты *B. oleracea*, а также их редактирование путем внесения нокаутных мутаций может привести к повышению ее устойчивости к сосудистому бактериозу.

Материалы и методы: Изоляты бактерий *X. campestris* pv. *campestris*, собранные с растений капусты с признаками сосудистого бактериоза, были любезно предоставлены А.Н. Игнатовым и Ф.С. Джалиловым. Далее из полученных культур была выделена ДНК. С помощью ПЦР с использованием праймеров, специфичных к консервативным участкам нуклеотидных последовательностей генов TAL-эффекторов из базы NCBI, было подтверждено наличие у изолятов XY1-1, XY1-2, XY2-1, XY2-2, B-32, 277NZ, DB-3, генов TAL-эффекторов, а также проведено секвенирование геномов таких бактерий. Аннотирование генов TAL-эффекторов в геномах избранных изолятов осуществлялось с помощью программы AnnoTALE. Поиск генов-мишеней TAL-эффекторов проводили с помощью алгоритмов PrediTALE, входящих в программу AnnoTALE, в геноме дигиплоидной линии TO1000 *B. oleracea* var. *oleracea* (NCBI RefSeq assembly: GCF_000695525.1). Изменения экспрессии генов-мишеней *B. oleracea* TAL-эффекторами при заражении *X. campestris* pv. *campestris* детектировались с использованием метода ПЦР с обратной транскрипцией. Изначально проводилась инокуляция листьев четырех различных генотипов капусты (TO1000, Dh, Парус, Подарок) с изолятами бактерий *X. campestris* pv. *campestris*, содержащими гены TAL-эффекторов. В качестве контроля использовались растения, зараженные изолятами, не имеющими TAL-эффекторов в геноме. Спустя сутки, двое суток и трое суток из листьев выделялась РНК, и далее проводились измерения экспрессии генов-мишеней при помощи ОТ-ПЦР.

Результаты: Среди избранных изолятов было найдено и полностью отсекуено 13 генов TAL-эффекторов. Наиболее распространенным оказался TAL-эффектор TalEN6, встречающийся в 5 исследованных изолятах (XY1-1, XY1-2, XY2-1, XY2-2, происходящих из Украины, и DB-3 собранного в Московской области). Все они содержат ген с одинаковым числом повторов и одинаковыми RVD, отличающиеся только однонуклеотидными заменами. Более того, такое сочетание RVD описывалось в литературе и ранее. Зная последовательности переменных остатков в положениях 12, 13 (RVD) в данных повторах, можно предсказать последовательность нуклеотидов, с которыми свяжется конкретный TAL-эффектор и таким образом выявить гены-мишени. Для TAL-эффектора TalEN6 было предсказано 122470 вероятных сайтов узнавания в геноме *B. oleracea*, среди них было отобрано 9 мишеней с высоким уровнем значимости и местоположением, близким к предполагаемой точке старта транскрипции в 5'-направлении от кодирующей области. Для TAL-эффектора TalAJ3 было предсказано 100210 вероятных сайтов узнавания, из них 5 мишеней находились поблизости от предполагаемой точки старта транскрипции и имели высокий уровень значимости. Для остальных TAL-эффекторов не было найдено значимых сайтов узнавания. Измерение уровня экспрессии избранных генов-мишеней показало, что для генов *WEB*, *dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase*, *ERF121* наблюдается индукция экспрессии в десятки раз при заражении изолятом XY1-1, содержащим гены TAL-эффекторов, по сравнению с контролем.

Выводы: В данном исследовании было оценено изменение экспрессии избранных генов-мишеней после инокуляции изолятами бактерии *X. campestris* pv. *campestris*. Изолят XY1-1 содержал два TAL-эффектора TalEN6 и TalAJ3, контрольные изоляты не содержали генов TAL-эффекторов.

Финансирование: Исследование поддержано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации, проект № 075-15-2023-582.