

Ингибирование поли(АДФ)-рибозилирования у патогенов растений как способ защиты картофеля от фитофтороза

Н.А. Спеченкова^{1*}, Н.О. Калинина^{1,2}, С.А. Якунина¹, М.Э. Тальянский¹

¹ Государственный научный центр Российской Федерации Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ГНЦ ИБХ РАН), Москва, Россия

² НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

* solanum@ibch.ru

Цель: Показать функциональную роль поли(АДФ)-рибозилирования (ПАРилирования) в процессе роста мицелия оомицета *Phytophthora infestans* с использованием подходов, основанных на механизме РНК-интерференции (посттранскрипционном умолчании гена) и подавлении активности фермента поли(АДФ)-рибоза полимеразы (PARP) фармакологическим ингибитором 3-аминобензамидом (ЗАВ).

Материалы и методы: Сборка генома российского штамма *P. infestans* VZR ViR21a была проведена на основании данных секвенирования ДНК по технологии PacBio (SeGaT GmbH). Гомологию аминокислотных последовательностей между белками PARP *P. infestans* VZR ViR21a, *P. infestans* T30-4, *Homo sapiens* и *Arabidopsis thaliana* оценивали филогенетическим анализом (модель Уилана и Голдмана в ПО MEGA11, 1000 bootstrap replicates). Для дизайна конструкций дцРНК, для специфического подавления экспрессии генов *PARP P. infestans* VZR ViR21a, выбраны консервативные фрагменты гена *PiPARP1* длиной 662 пн., гена *PiPARP2* длиной 813 пн. и гена *PiPARG* длиной 698 пн. из полной последовательности генома VZR ViR21a. В качестве отрицательного контроля была использована дцРНК против Y вируса картофеля (PVY). ПЦР-продукты выбранных фрагментов использовали в качестве матриц для транскрипции РНК *in vitro* с использованием набора Biolabmix mRNA-20. Для формирования дуплексов РНК комплементарные одноцепочечные РНК смешивали, инкубировали при 95 °C с последующим постепенным охлаждением до комнатной температуры. Инокулят *P. infestans* готовили из 7-дневных культур, выращенных на ржаной среде в темноте при 18 °C. Часть культуры помещали в центр новой чашки Петри с каплей раствора дцРНК (150 нг/мл) либо 1 мМ раствора ЗАВ. Чашки инкубировали при 18 °C в течение 10 дней, отбирали образцы мицелия, выделяли РНК. Экспрессию соответствующих генов определяли методом ОТ-ПЦР в сравнении с контрольной группой. Для оценки накопления поли(АДФ)-рибозы (ПАР) методом ИФА, выделяли тотальный белок из мицелия методом осаждения и денатурации трихлоруксусной кислотой в присутствии 2-меркаптоэтанола в холодном ацетоне. Тест на листьях проводили на картофеле сорта Гала. Листья помещались абаксальной стороной вверх в пластиковые лотки, выстланные влажной бумагой, и были инокулированы суспензией зооспор *P. infestans*, с добавлением ЗАВ или без него. Площадь поражения была измерена с помощью программного обеспечения ImageJ на 4-й и 7-й день. Статистический анализ был выполнен на десяти либо четырех независимых биологических повторах методами Tukey's HSD post hoc и ANOVA.

Результаты: Уровни экспрессии мРНК обработанной дцРНК культуры против генов *PiPARP1*, *PiPAR2* и *PiPARG* были снижены примерно в 10–15 раз по сравнению с контролем (без обработки дцРНК). Однако ингибирование роста колоний после обработки дцРНК наблюдалось только в варианте с дцРНК против *PiPARP2*. Также подавление роста мицелия *P. infestans* было отмечено в культуре, обработанной ЗАВ (ингибитором PARP). В совокупности эти данные предполагают, что эффект действия дцРНК против *PiPAR2* и ингибитора ЗАВ может быть связан со скоростью ПАРилирования. Как подтверждение этой гипотезы, мы обнаружили значительное снижение уровня ПАР в мицелии *P. infestans*, обработанном дцРНК против *PiPARP2* или ЗАВ. Возможность прямого перекрестного взаимодействия между ростом мицелия и скоростью ПАРилирования подтверждается данными, которые показывают корреляцию между уровнями накопления ПАР и ростом мицелия. В результате проверки вирулентности культуры *P. infestans* с дефицитом содержания ПАР на 4 день после заражения листья, обработанные ЗАВ, не проявляли никаких характерных симптомов заражения, по сравнению с контролем, тогда как листья, инфицированные *P. infestans* в отсутствие ЗАВ, демонстрировали до 60% поврежденной листовой поверхности. На 7-й день только начальные симптомы фитофтороза наблюдались на краях листьев, обработанных ЗАВ, тогда как в отсутствие ЗАВ 100% листьев проявляли симптомы фитофтороза.

Выводы: Мы обнаружили, что процесс ПАРилирования играет важную функциональную роль в жизненном цикле фитопатогенного оомицета *P. infestans*, являясь существенным фактором для роста мицелия и, возможно, может играть роль в регуляции других стадий его развития и способности проникать в растения-хозяева. На практическом уровне наши данные свидетельствуют о том, что нацеливание на систему поли(АДФ)-рибозилирования может представлять собой новый подход к защите растений от фитофтороза.

Финансирование: Исследование поддержано грантом РНФ № 23-74-30003, <https://rscf.ru/project/23-74-30003/>.