The receptor-like kinase RLK4 from *Solanaceae* family plants contributes to immune response

Shrub K.V., Kolubako A.V., Nikolaichik Y.A.

Belarusian State University, Minsk, Belarus

Email: shrubkaterina@gmail.com

Key message. The gene of receptor-like kinase *sbRLK4* of *Solanum bulbocastanum* was characterised. We show that silencing of *RLK4* leads to intensification of plant immune response.

Keywords: receptor-like kinase *RLK4*, *Solanaceae*, *Pectobacterium carotovorum*, virus-induced gene silencing

Pectobacterium carotovorum causes "blackleg" of stems and soft rot of potato tubers, which can result in severe yield loss. Plant cultivars resistant to *P. carotovorum* do not exist, and the plant's immune response to contact with this pathogen is poorly understood.

Aim. To establish the role of receptor-like kinase *RLK4* in plant immune response.

Methods. Molecular cloning, sequencing, virus-induced silencing. To induce gene silencing in *Nicotiana benthamiana* plants, we used *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 with TRV-based virus constructs. To study defence responses, plants were infiltrated with cell suspensions of wild-type *P. carotovorum* strain and strains with mutations in the *dspE* effector gene and its secretion regulator gene *hrpL*. Defence-related gene expression levels were estimated via qPCR.

We have previously found a group of related receptor protein kinases that interact with *DspE*, the main effector protein of *P. carotovorum*. In this work, a gene *sbRLK4* of *Solanum bulbocastanum* encoding another protein from this receptor group was cloned and characterized. Alignment of the *sbRLK4* sequence with the reference genome of *S. tuberosum* showed the presence of 26 differing nucleotides, 9 of them lead to amino acid substitutions. *N. benthamiana* plants with silenced *sbRLK4* ortholog give a stronger hypersensitive reaction in response to infiltration with *P. carotovorum* suspensions, regardless of strain. Moreover, a hypersensitive reaction also developed in response to the infiltration with a control 10 mM $MgSO_4$ solution, which was not observed in plants without silencing. Since *P. carotovorum* is a necrotroph, such reaction of the host plant leads to an increase in susceptibility to the pathogen and successful colonisation of plants. We are currently comparing expression levels of defence-related genes in plants with and without *RLK4* silencing to determine the reason behind stronger response. We also plan to study the effects of *RLK4* overexpression, in the hope to increase pathogen resistance.

Роль рецепторподобной киназы *RLK4* растений семейства *Solanaceae* в иммунном ответе на внедрение *Pectobacterium carotovorum*

Шруб Е.В., Колубако А.В., Николайчик Е.А.

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

Аннотация. В ходе исследования впервые охарактеризован ген рецепторподобной киназы *sbRLK4* растений *Solanum bulbocastanum*. Показано, что снижение экспрессии *RLK4* в растениях ведет к интенсификации защитного ответа хозяина.

Ключевые слова: рецепторподобная киназа *RLK4*, *Solanaceae*, *Pectobacterium carotovorum*, вирус-индуцированный сайленсинг генов

Патоген *Pectobacterium carotovorum* вызывает «черную ножку» стеблей и мягкую гниль клубней картофеля, что является причиной снижения урожайности. Устойчивых к *P. carotovorum* сортов растений не существует, а иммунный ответ растений на контакт с этим патогеном малоизучен.

Цель. Установить роль рецепторподобной киназы *RLK4* в иммунном ответе растений сем. Пасленовых на заражение *P. carotovorum*.

Молекулярное клонирование, секвенирование, вирус-индуцированный сайленсинг. Для индукции сайленсинга генов в растениях *Nicotiana benthamiana* использован штамм *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 с конструкциями на основе вируса TRV. Для воссоздания патосистемы Пасленовые – пектобактерии, растения были инфильтрованы суспензиями клеток штаммов *P. carotovorum* дикого типа и мутантов по генам эффектора *dspE* и регулятора его секреции *hrpL*.

Ранее у растений разных видов сем. Пасленовые мы выявили группу родственных рецепторных протеинкиназ, взаимодействующих с *DspE* – основным эффекторным белком *P. carotovorum*. В этой работе клонирован и охарактеризован ген *sbRLK4* дикого вида картофеля *Solanum bulbocastanum*, кодирующий еще один белок из этой группы рецепторов. Выравнивание последовательности *sbRLK4* относительно референсного генома *S. tuberosum* показало наличие 26 отличающихся нуклеотидов, 9 из которых приводят к аминокислотным заменам. Заражение модельных растений *N. benthamiana* с сайленсингом ортолога *sbRLK4* и сравнение их с контрольными растениями показало увеличение интенсивности реакции гиперчувствительности в ответ на инфильтрацию суспензиями *P. carotovorum* вне зависимости от штамма. Более того, реакция гиперчувствительности также развивалась в ответ на инфильтрацию контрольного 10 mM раствора $MgSO_4$, чего не наблюдалось у растений без сайленсинга. Поскольку *P. carotovorum* является некротрофом, такая реакция растения-хозяина приводит к увеличению восприимчивости к патогену и успешной колонизации растений. В настоящий момент производится измерение уровней экспрессии защитных генов в растениях с сайленсингом *RLK4* в ответ на развитие пектобактериоза, результаты будут представлены в докладе. В дальнейшем планируется исследовать эффекты увеличения уровня экспрессии *RLK4*, что может повысить устойчивость растений к *P. carotovorum*.