

На правах рукописи

Даминова Амина Галеевна

**ФОРМИРОВАНИЕ РАСТИТЕЛЬНО-МИКРОБНОЙ ПАТОСИСТЕМЫ  
*NICOTIANA TABACUM* – *PESTOBACTERIUM ATROSEPTICUM* SCR11043:  
УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЙ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ АСПЕКТЫ**

03.01.05 - физиология и биохимия растений

03.02.03 - микробиология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Казань – 2014

Работа выполнена в лаборатории молекулярной биологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Казанского института биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН

Научные руководители: доктор биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной биологии КИББ КазНЦ РАН, г. Казань,  
Гоголев Юрий Викторович

кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии КИББ КазНЦ РАН, г. Казань,  
Горшков Владимир Юрьевич

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярных основ внутриклеточной регуляции Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва,  
Новикова Галина Викторовна

доктор биологических наук, заведующий лабораторией ризосферной микрофлоры ГНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии, г. Санкт-Петербург,  
Белимов Андрей Алексеевич

Ведущая организация: Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, г. Москва

Защита состоится **23 декабря 2014 года в 11<sup>00</sup> часов** на заседании диссертационного совета Д 002.005.01 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Казанского института биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН по адресу: 420111, г. Казань, ул. Лобачевского, д. 2/31, а/я № 30, тел/факс (843)2927347.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке Казанского научного центра РАН и на официальном сайте КИББ КазНЦ РАН <http://www.kibb.knc.ru>

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2014 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

А.А. Пономарева

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Постановка проблемы и ее актуальность.** Растительно-микробные патологические системы формируются в результате сложного процесса, приводящего к физиологической интеграции двух организмов. Этот процесс, в первую очередь, определяется «совместимостью» генотипов патогена и хозяина, а именно наличием или отсутствием генов вирулентности/авирулентности у бактерий и генов устойчивости у растений (Agrios, 2005). Однако развитие патосистемы – это не только противостояние двух стратегий – атаки и защиты, но и тонкая взаимная координация физиологических процессов, обеспечивающая длительное сосуществование двух организмов в рамках онтогенетического развития (Дьяков и др., 2012). Запуск определенных физиологических процессов у макро- и у микроорганизмов при развитии патосистемы приводит к коадаптации партнеров.

Адаптивный потенциал микроорганизмов во многом связан с физиологической гетерогенностью популяций, что сопряжено с формированием нескольких клеточных фенотипов (Balaban *et al.*, 2004). Разные фенотипы могут различаться по резистентности к различным стрессорам, по вирулентности, по компетентности к внешним сигналам. Для фитопатогенных бактерий образование нескольких фенотипов может способствовать более успешной колонизации различных компартментов хозяина. Однако явление физиологической гетерогенности микроорганизмов в организме растения-хозяина охарактеризовано крайне слабо.

Процессы адаптации у растений контролируются системами гормональной регуляции (Медведев, Шарова, 2011). Активация либо репрессия некоторых систем может быть направлена на угнетение патогенов внутри растения и, таким образом, способствовать устойчивости макроорганизма (Bari, Jones, 2009). В то же время, микроорганизмы могут использовать системы гормональной регуляции в качестве мишени для манипулирования «поведением» хозяина, определяя его восприимчивость (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2007). Это явление, убедительно продемонстрированное на микроорганизмах, продуцирующих фитогормоны либо их аналоги, в широком смысле остается малоизученным. В особенности это касается группы энтеробактерий, вызывающих «мягкие гнили» растений, в том числе пектобактерий.

Возбудители «мягких гнилей» всегда считались типичными некротрофами, взаимодействующими с хозяином за счет «грубой силы», а именно массивной продукции экстраклеточных ферментов, разрушающих клеточную стенку растений (Charkowski *et al.*, 2012). В то же время, наличие в геномах этих бактерий генов, характерных для биотрофных патогенов, широкая распространенность латентных инфекций, вызываемых пектобактериями, и ряд других фактов свидетельствуют о значительно более тонкой стратегии их взаимодействия с растениями (Bell *et al.*, 2004; Charkowski *et al.*, 2012).

**Цель и задачи исследования.** Характеристика морфологических и физиологических параметров клеток бактерий и растений в процессе формирования растительно-микробной патологической системы, включающей табак (*Nicotiana tabacum*) и фитопатогенную энтеробактерию *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 (*Pba*).

Для достижения указанной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Определение динамики численности популяций *Pba* в растениях табака (*N. tabacum*), инфицированных этим патогеном.
2. Описание изменений в ультраструктуре клеток *Pba* в зависимости от условий культивирования и определение способности этого микроорганизма к фенотипической диссоциации.
3. Анализ изменений в ультраструктуре клеток и тканей табака при развитии инфекционного процесса, вызванного *Pba*.
4. Оценка возможности формирования различных фенотипов *Pba* в растениях табака и выяснение приуроченности их образования к определенному этапу взаимодействия и типу ткани организма хозяина.
5. Анализ экспрессии маркерных генов, индуцируемых жасмоновой и салициловой кислотами, в растениях табака при различных типах ответных реакций на инфицирование *Pba*.

**Научная новизна.** Впервые описан процесс диссоциации популяции фитопатогенных бактерий в организме растения-хозяина; выявлены фенотипы бактерий, образование которых происходит тканеспецифично и/или на определенной стадии патогенеза. Показано, что популяционный цикл *Pba* в организме растения завершается переходом бактерий в покоящиеся формы, которые могут быть отнесены к «жизнеспособным, но некультивируемым клеткам».

Впервые в инфицированных растениях выявлены и охарактеризованы бактериальные эмболы, представляющие собой новый тип «многоклеточных» структур, формируемых микробными клетками. Бактериальные эмболы, образующиеся в сосудах ксилемы и приводящие к их закупорке, состоят из плотно расположенных, пространственно ориентированных клеток бактерий, имеющих области межклеточных контактов. Формирование бактериальных эмболов связано с желированием ксилемного сока за счет специфической модификации полисахаридов растительных клеточных стенок.

Впервые описаны изменения в ультраструктуре клеток и тканей растений табака при развитии заболевания, вызванного бактериями рода *Pectobacterium*.

Впервые показано, что при типичных и при бессимптомных инфекциях, вызванных *Pba*, активируются разные защитные системы растения-хозяина, опосредуемые жасмоновой и салициловой кислотами, соответственно.

**Научно-практическая значимость.** Полученные данные вносят существенный вклад в понимание процессов взаимодействия растений с фитопатогенными

бактериями и развития инфекционных заболеваний. Показано, что *Pba* может персистировать в растительных остатках в виде некультивируемых форм. Охарактеризованы принципы формирования бактериальных эмболов – структур, впервые описанных в настоящей работе, которые вызывают закупорку сосудистой системы растений. Результаты работы могут служить основой для создания новых способов контроля бактериозов растений.

**Связь работы с научными программами и личный вклад автора в исследования.** Работа проводилась с 2008 по 2014 гг. в соответствии с планом научных исследований КИББ КазНЦ РАН по теме «Роль сигнальных молекул бактерий и растительных метаболитов в формировании специфичных и неспецифичных взаимоотношений бактерий и растений при бактериозах» (гос. регистрационный номер 01200901964). Исследования автора, как исполнителя данной тематики, поддержаны грантами ФЦП № 14.740.11.1190 «Динамика микробных популяций при развитии бактериозов растений», РФФИ № 12-04-31059 «Структурно-функциональная дифференцировка клеток бактерий при взаимодействии с растением-хозяином», а также грантом ведущей научной школы академика А.Н. Гречкина «Клеточная сигнализация и перепрограммирование генома и протеома растений» (НШ № 825.2012.4). Научные положения диссертации и выводы базируются на результатах собственных исследований автора, либо полученных при его непосредственном участии совместно с сотрудниками КИББ КазНЦ РАН Агеевой М.В., Сальниковым В.В., Микшиной П.В.

#### **Положения, выносимые на защиту.**

1. В разных компартментах растения-хозяина (*N. tabacum*), а также в различных условиях *in vitro* популяции *P. atrosepticum* SCRI1043 диссоциируют с образованием разнородных субпопуляций, представленных специализированными клеточными фенотипами.
2. При колонизации сосудов ксилемы растений клетки *P. atrosepticum* образуют бактериальные эмболы – «многоклеточные» структуры, которые состоят из плотно расположенных, пространственно ориентированных бактериальных клеток, имеющих области межклеточных контактов, и характеризуются особым способом формирования, связанным с модификацией полисахаридов растительных клеточных стенок.
3. В ходе инфекционного процесса, вызванного *P. atrosepticum*, происходят изменения в ультраструктуре клеток растений (*N. tabacum*).
4. Формирование растительно-микробной системы *N. tabacum* – *P. atrosepticum* может происходить как с развитием симптомов заболевания у хозяина, так и бессимптомно; разные типы инфекционного процесса различаются особенностями локализации патогена в тканях растений и характером ответных реакций макроорганизма, координируемых жасмоновой и салициловой кислотами.

**Апробация работы.** Результаты диссертационной работы доложены на V Всероссийской конференции молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой» (Саратов, 2010); III Международном симпозиуме «Клеточная сигнализация растений» (Казань, 2011); 4-ом международном конгрессе FEMS (Женева, 2011); I Всероссийской конференции «Фундаментальная гликобиология» (Казань, 2012); международном конгрессе FESPB (Фрайбург, 2012); I Международном симпозиуме «Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений» (Казань, 2013), I Международном Мультидисциплинарном конгрессе по микроскопии INTERM 2013 (Анталья, 2013), XVI Международном конгрессе «Molecular Plant-Microbe Interactions» (Родос, 2014).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 17 работ, из которых 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 199 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, изложения и обсуждения результатов, заключения, выводов, списка литературы. В работе представлено 19 рисунков и 1 таблица. Список литературы включает 419 источника; из них 385 иностранных.

## 1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объекта исследования в работе использована патосистема, включающая растения табака (*Nicotiana tabacum* сорт «Havana») и фитопатогенную бактерию *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 (*Pba*). Штамм *Pba* (*Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* SCRI1043) любезно предоставлен доц. Е.А. Николайчиком (Белорусский гос. университет). Растения выращивали в стерильных условиях на среде MS (Murashige, Skoog, 1962); семена стерилизовали 2% гипохлоридом натрия с 0,5% SDS. Для инфицирования растений 10 мкл суспензии бактериальных клеток ( $(1-3) \times 10^5$  КОЕ) наносили на поверхность растения (в пазуху листа в середине стебля) без механических повреждений при помощи дозатора.

Структуру клеток и тканей оценивали с помощью конфокальной флуоресцентной, а так же электронной микроскопии на приборах LSM 510 Meta (Carl Zeiss, Германия) и JEM-1200EX (Япония), соответственно. Пробоподготовку осуществляли согласно стандартным протоколам (Reynolds, 1963; Gorshkov *et al.*, 2014).

ПЦР проводили с помощью термоциклера с оптическим модулем CFX96 (Bio-Rad, США). Определение титра геномных копий *Pba* в растениях табака проводили согласно описанному протоколу (Gorshkov *et al.*, 2014). Праймеры для амплификации участков ДНК *Pba*, а также кДНК, соответствующих транскриптам различных генов растений табака, и флуоресцентные зонды TaqMan конструировали с использованием пакета программ Vector NTI версия 9 и синтезировали в НПО «Синтол» (Москва).

Выделение тотальной РНК из растений табака проводили при помощи

коммерческого набора «RNeasy Plant Mini Kit» (Qiagen, США). Оценку уровня экспрессии целевых генов проводили относительно двух референсных генов (кодирующих фактор элонгации трансляции и  $\beta$ -субъединицу АТФазного комплекса), для которых была экспериментально подтверждена стабильность экспрессии в рамках использованных модельных систем.

Выделение фракций полисахаридов из стеблей контрольных и инфицированных *Pba* растений, а также из клеток *Pba*, выращенных *in vitro*, осуществляли на основе ранее описанного протокола (Talmadge *et al.*, 1973). Полученные фракции полисахаридов хроматографировали на колонке с сефарозой CL-4В (Pharmacia, Швеция) (12×400 мм). Количество углеводов в каждой фракции определяли фенольным методом (Dubois *et al.*, 1956). Моносахаридный состав образцов определяли (после гидролиза 2 М ТФУ 120 °С, 1 ч) при помощи высокоэффективной анионообменной хроматографии (система DX-500, Dionex, США) на колонке CarboPac PA-1 (4×250 мм, Dionex, США).

Иммуноцитохимическую реакцию с моноклональными антителами INRA-RU1 (Ralet *et al.*, 2010) и LM19 (Verhertbruggen *et al.*, 2009), специфичными к эпитопам рамногалактуронана I и незтерифицированного гомогалактуронана, соответственно, проводили на полутонких или ультратонких срезах стеблей контрольного и инфицированного растений табака.

Анализ фенольных соединений проводили с помощью хроматографической системы BioLogic DuoFlow Pathfinder (Bio-Rad, США) на колонке SYNERGI 4u Polar-RP (Phenomenex Inc, США). Детекцию активных форм кислорода проводили с помощью конфокальной микроскопии с использованием красителя DCF-DA (2',7'-Dichlorofluorescein diacetate, Sigma, США).

Статистический анализ данных проводили с применением стандартных математических методов (расчет среднеквадратичного отклонения, сравнение средних по критерию Стьюдента). Критерий вероятности  $P < 0,05$  принимали достаточным для достоверной разницы опытной и контрольной групп данных.

## 2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 2.1. Динамика титра клеток *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 (*Pba*) в растении-хозяине (*Nicotiana tabacum*)

У 70 % растений через 1–2 суток после инфицирования *Pba* в области инокуляции морфологически выявлялась зона, в которой происходила мацерация тканей и некроз клеток (рис. 1Б). Размер этой зоны со временем увеличивался, и через 4–5 суток растения погибали (рис. 1В).

В первые трое суток после инокуляции титр колониеобразующих единиц (КОЕ), так же как и титр геномных копий (ГК) *Pba* в растениях возрастал на четыре порядка величин. Далее до девярых суток количество клеток бактерий не изменялось (рис. 2). В период от 20-х до 60-х суток титр КОЕ *Pba* в остатках инфицированных

растений снижался до недетектируемых значений; при этом титр ГК сохранялся на высоком уровне (рис.2).

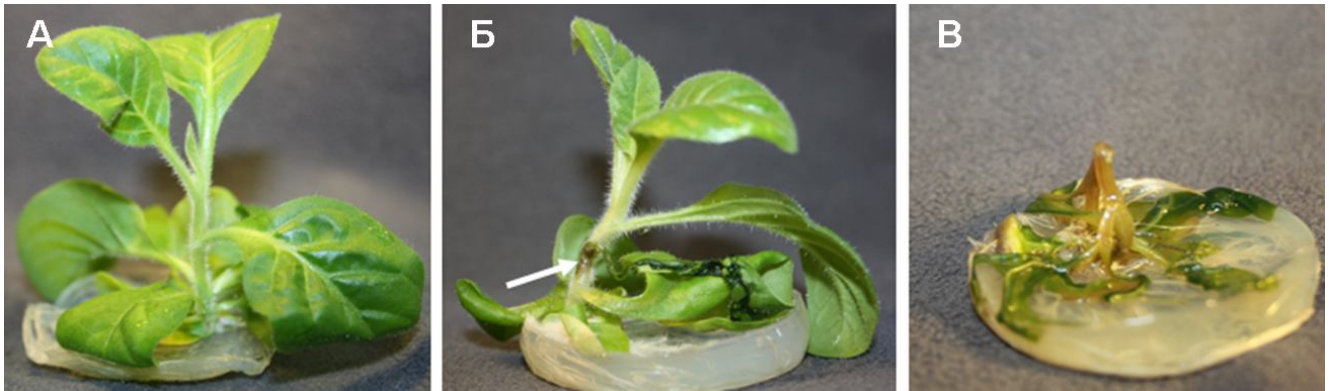


Рис. 1. Внешний вид растений табака, инфицированных *Pba*. А – неинфицированное растение. Б, В – через двое и пять суток после инфицирования.

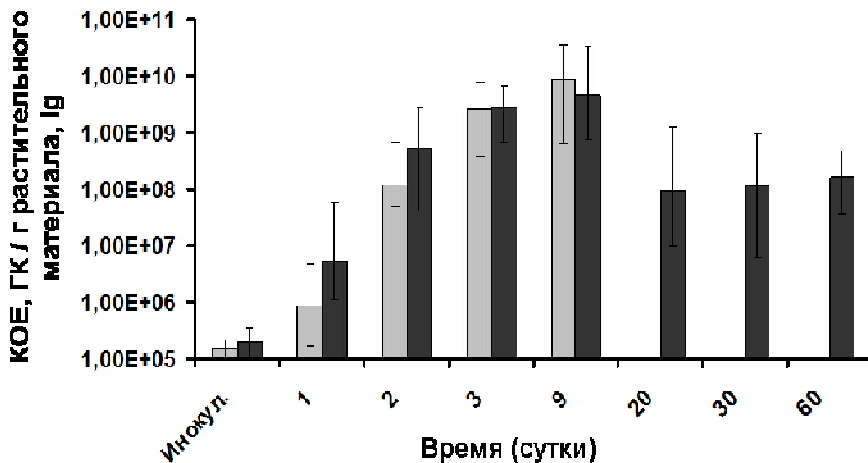


Рис. 2. Динамика титров КОЕ (серый) и ГК (черный) *Pba* в растениях. Инокул – количество клеток в инокуляте. На графике представлены медианы  $\pm$  0,025 и 0,975 перцентили, рассчитанные по четырем экспериментам.

В связи с сохранением высоких значений титра ГК при нулевом титре КОЕ мы проверили возможность перехода клеток *Pba* в покоящееся жизнеспособное, но некультивируемое состояние после гибели хозяина. Для этого был смоделирован ряд процедур «оживления», т.е. выведения клеток из состояния покоя. Наибольшая эффективность «оживления» достигалась после цикла замораживания/оттаивания остатков растений. При этом в 10-ти из 30-ти проанализированных образцов титр КОЕ восстанавливался с нулевых значений до  $5,3 \times 10^3 - 1,7 \times 10^6$  КОЕ/грамм. Принадлежность колоний, сформировавшихся после процедуры «оживления», к *Pba* подтверждали при помощи ПЦР со специфичными праймерами (Gorshkov *et al.*, 2014). Инфицирование растений культурами «оживленных» клеток, пассируемых на питательной среде, приводило к развитию типичных симптомов заболевания у растений, что свидетельствует о сохранении вирулентности *Pba* после обратимого перехода в покоящееся состояние. Таким образом, нами продемонстрировано, что завершение популяционного цикла *Pba* в организме растения сопряжено с переходом бактериальных клеток в жизнеспособное, но некультивируемое состояние.



## 2.2. Изменения в ультраструктуре клеток табака и *Pba* при взаимодействии двух организмов

### 2.2.1. Ранние стадии взаимодействия *Pba* и табака

На ранних стадиях взаимодействия (18 ч) клетки *Pba*, морфологически сходные с вегетативными, выявляли в сосудах ксилемы (рис. 3А) и в паренхиме (рис. 3Б-Е). Несмотря на то, что *Pba* считается внеклеточным патогеном, бактерии были обнаружены, помимо апопласта (рис. 3Б), также внутри паренхимных клеток (рис. 3В-Е). В некоторых паренхимных клетках инвазия патогена не была сопряжена с существенными изменениями в их ультраструктуре за исключением формирования осмиофильных глобул в вакуолях (рис. 3В). В других клетках изменялась структура цитоплазмы и органелл, нарушалась целостность тонопласта (рис. 3Г, Д). В ряде паренхимных клеток цитоплазма и органоиды полностью разрушались, происходил разрыв плазмалеммы и образование мембранных структур, в которых располагались бактериальные клетки (рис. 3Е).

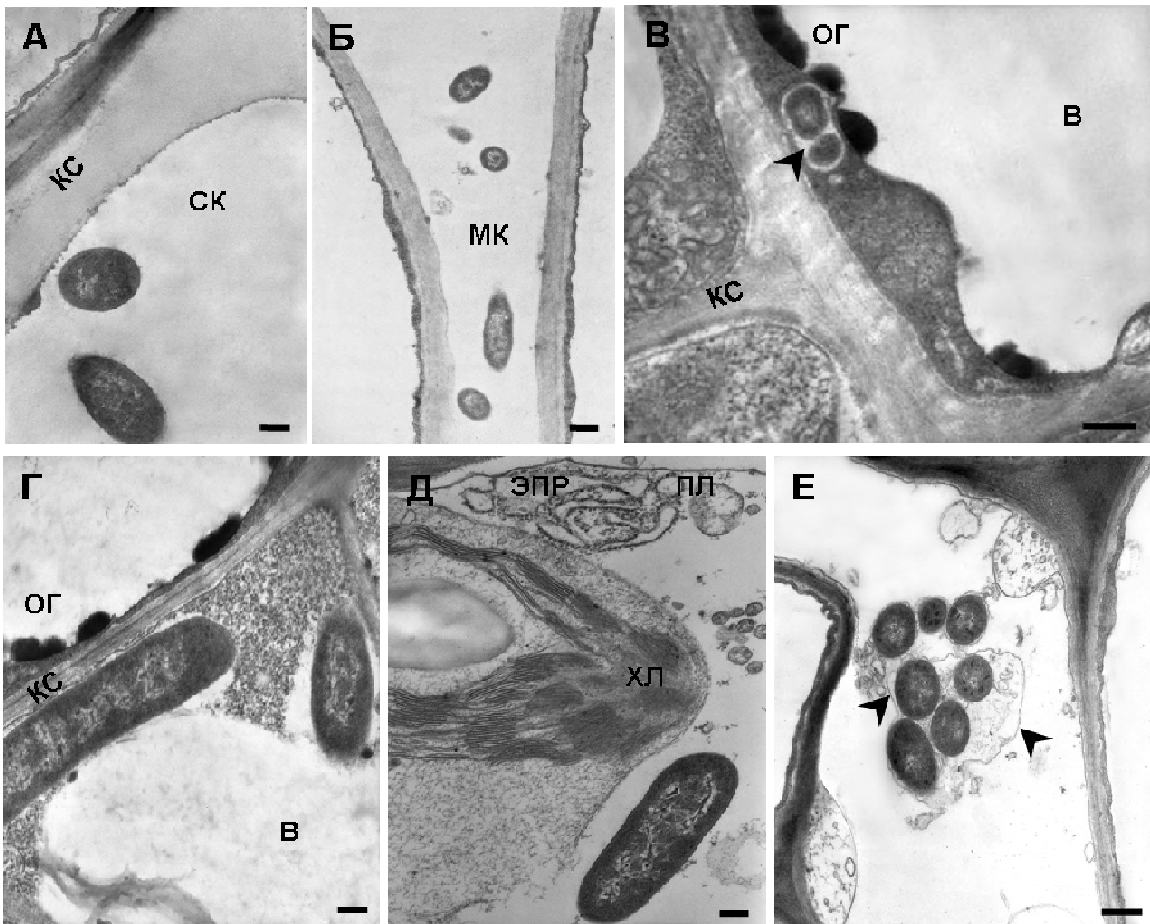


Рис. 3. Микрофотографии клеток *Pba* в растениях *N. tabacum* (ранняя стадия инфекции). А – *Pba* в ксилемном сосуде. Б – *Pba* в межклетнике паренхимы. В-Е – *Pba* в паренхимных клетках. В – формирование осмиофильных глобул (ОГ); стрелкой обозначена клетка *Pba*. Г – разрушение тонопласта. Д – повреждение клеточных органеллов. Е – клетки *Pba* в мембранных структурах. КС – клеточная стенка; СК – сосуд ксилемы; МК – межклетник; ОГ – осмиофильные глобулы; В – вакуоль; ХЛ – хлоропласт. Масштабные линейки – 0,2 мкм для А, В-Д; 0,5 мкм для Е.

Формирование обнаруженных мембранных структур (рис. 3Е), по всей вероятности, представляет собой защитную реакцию макроорганизма, обеспечивающую «изоляция» клеток патогена. Образование в вакуолях осмиофильных глобул (рис. 3В), ранее описанных как патоген-индуцируемый защитный ответ (Cherif *et al.*, 1992; Daayf *et al.*, 1997), также может быть нацелено на сдерживание патогенного организма.

В отличие от клеток паренхимы, в сосудах ксилемы в этот период существенных изменений в их ультраструктуре отмечено не было. Поскольку сосуды являются мертвыми клетками, диапазон протекающих в них защитных реакций, значительно уже, чем в паренхиме. Это, вероятно, является причиной того, что колонизация клетками *Pba* сосудов ксилемы проходила быстрее, чем паренхимы.

### 2.2.2. Острая стадия инфекции, вызываемой *Pba*, у табака.

#### Формирование бактериальных эмболов

На острой стадии инфекции (2-3 суток) на растениях появлялась выраженная зона некроза (рис. 1Б). Эта область была интенсивно колонизирована клетками *Pba*. В коровой паренхиме клетки патогена, сходные по ультраструктуре с вегетативными, преимущественно населяли межклетники (рис. 4А, Б).

В сосудах ксилемы на острой стадии инфекции клетки *Pba* формировали особые структуры, которые были названы нами «бактериальные эмболы» (рис. 4В). Эти структуры представляли собой скопления плотно прилегающих друг к другу бактериальных клеток, полностью перекрывающие полость ксилемного сосуда. Структура клеток *Pba*, входящих в состав бактериальных эмболов, отличалась от вегетативных: их цитоплазма была дифференцирована на электроноплотную периферийную зону и менее электроноплотную центральную зону с конденсированным нуклеоидом (рис. 4Г). Были также выражены зоны контактов между соседними клетками, что не было характерно для субпопуляции, колонизировавшей паренхиму.

Для бактериальных эмболов характерен особый способ формирования, отличающий их от микробных биопленок. На начальном этапе колонизации сосудов, когда в люмене присутствовали лишь единичные клетки *Pba*, на внутренней поверхности растительной клеточной стенки накапливалась гранулярная субстанция (рис. 5А). Наряду с увеличением количества бактерий в сосуде, происходило «разрыхление» этой субстанции (рис. 5Б), что в итоге приводило к образованию гелеподобного матрикса (рис. 5В), в котором располагались бактерии. Затем происходило «ориентирование» бактериальных клеток вдоль продольной оси ксилемного сосуда (рис. 5Г). Целостность формирующегося бактериального эмбола обеспечивалась, помимо матрикса, пилеподобными структурами, образующимися на поверхности бактериальных клеток (рис. 5Д). Дальнейшее «уплотнение» клеток в

ксилемном сосуде, вызывающее даже деформацию отдельных бактерий (рис. 5Е), приводило к полной закупорке люмена сосуда (рис. 5Ж).

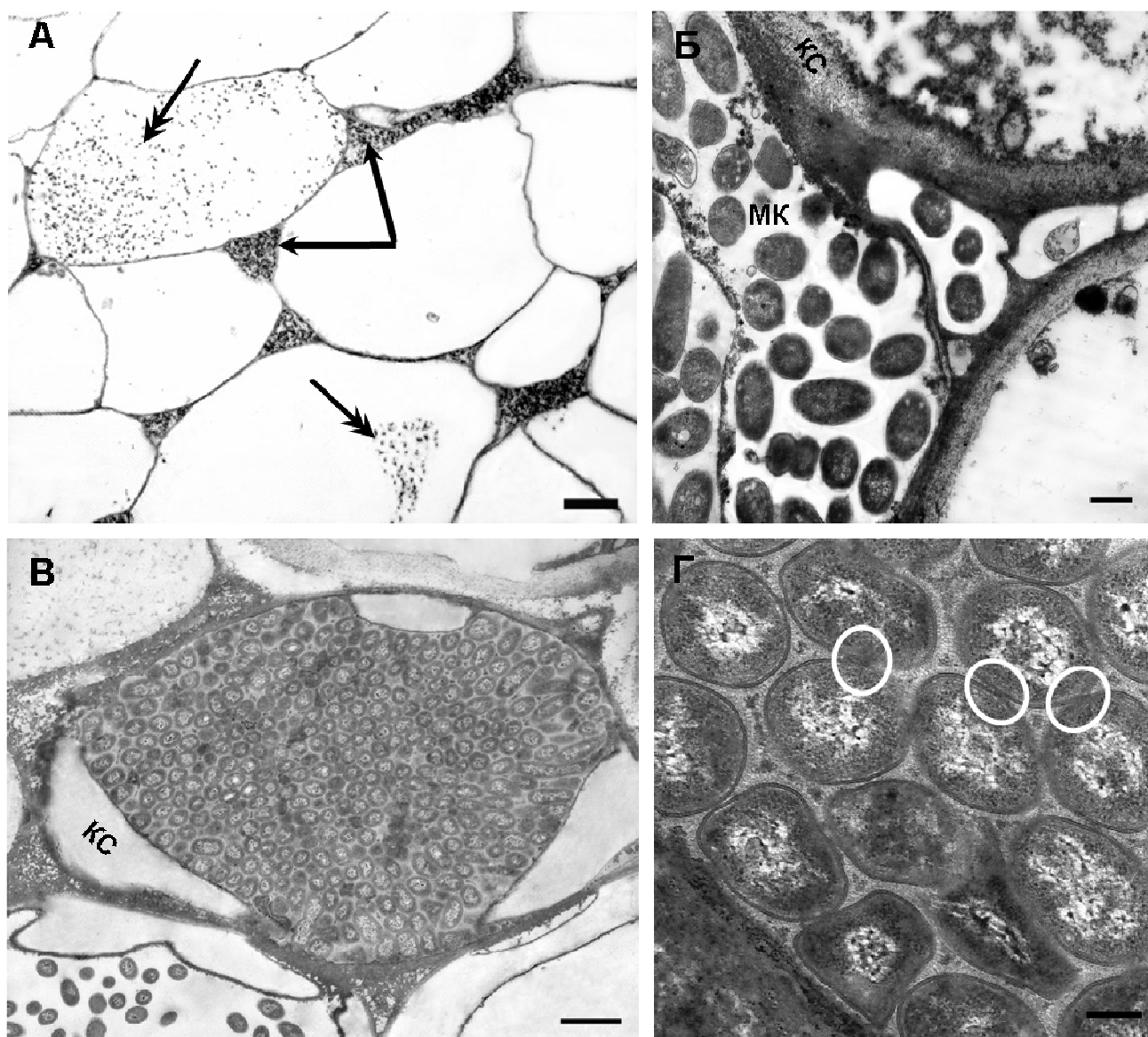


Рис. 4. Микрофотографии клеток *Pba* в растениях *N. glauca* (острая стадия инфекции, зона проявления симптомов заболевания). А – *Pba* в клетках (двойная стрелка) и межклетниках (стрелка) паренхимы. Б – *Pba* в межклетнике паренхимы. В – бактериальный эмбол в сосуде ксилемы. Г – клетки *Pba*, образующие эмбол; белый овал – зона контакта клеток. КС – клеточная стенка; МК – межклетник. Масштабные линейки – 20, 0,5, 2, 0,2 мкм для А-Г, соответственно.

Таким образом, нами впервые описаны бактериальные эмболы – «многоклеточные» структуры, образующиеся в сосудах ксилемы и приводящие к их закупорке. Бактериальные эмболы состоят из плотно расположенных клеток, имеющих области межклеточных контактов.

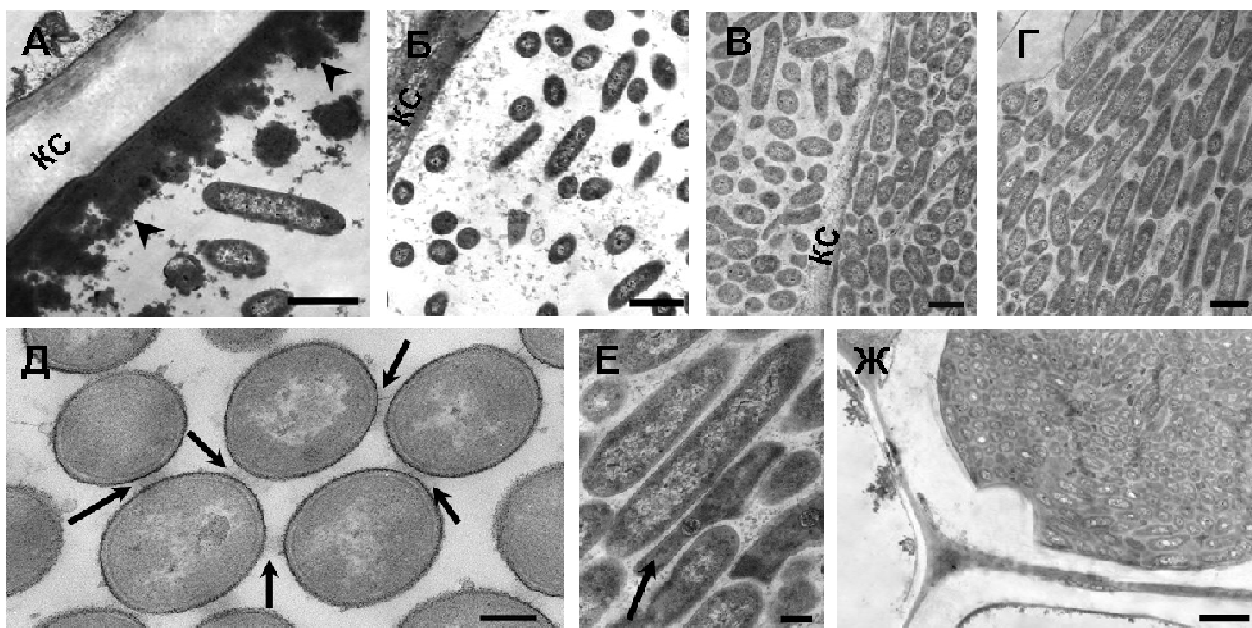


Рис. 5. Стадии колонизации сосудов ксилемы *N. tabacum* клетками *Pba*. А – накопление гранулярной субстанции (стрелка) на поверхности стенок сосудов, колонизированных *Pba*. Б – «разрыхление» гранулярной субстанции. В – формирование гелеподобного матрикса. Г – «ориентирование» клеток *Pba* по продольной оси сосуда. Д – формирование пилеподобных структур (стрелка) на поверхности клеток *Pba*; образец окрашен по методу Тьеры (Thiergy, 1967). Е – деформация отдельных клеток *Pba* (стрелка) при формировании бактериального эмбола. Ж – бактериальный эмбол в ксилемном сосуде. КС – клеточная стенка. Масштабные линейки – А–Г – 1 мкм, Д, Е – 0,2 мкм, Ж – 2 мкм.

### 2.2.3. Миграция клеток *Pba* в растениях табака

Закупорка сосудов ксилемы бактериальными эмболами, по нашему мнению, могла обеспечить условия для нисходящей миграции бактерий к подземным органам растения. Для проверки этого предположения мы проанализировали отдельные секции инфицированных растений на разном расстоянии от зоны некроза. Хотя в зоне некроза паренхима была активно колонизирована бактериями (рис. 4А, Б), на расстоянии 3–5 мм ниже этой зоны в паренхиме мы обнаруживали лишь единичные клетки *Pba*. В вакуолях паренхимных клеток ниже зоны некроза формировалось большое количество осмиофильных глобул (рис. 6А). Таким образом, зона активной колонизации паренхимы клетками *Pba* совпадает с областью проявления симптомов заболевания.

В то же время, сосуды ксилемы были интенсивно колонизированы клетками *Pba* даже на расстоянии ниже 10 мм от зоны некроза (рис. 6Б). В некоторых сосудах в этой области были обнаружены бактериальные эмболы. Это указывает на то, что скорость нисходящей миграции клеток *Pba* по сосудам значительно превышает скорость их перемещения по паренхиме. С этим согласуются данные высева клеток *Pba* из корневой системы инфицированных растений: на вторые сутки после

инфицирования растений, когда симптомы заболевания проявлялись лишь локально в области инфицирования, расположенной на 1–2 см выше основания стебля, корневая система всех проанализированных растений была интенсивно колонизирована (средний титр  $1,5 \times 10^7$  КОЕ/грамм). Через 2–3 суток после инфицирования часть популяции *Pba* перемещалась в ризосферу, формируя на корневой системе упорядоченные воронковидные скопления (рис. 6В).

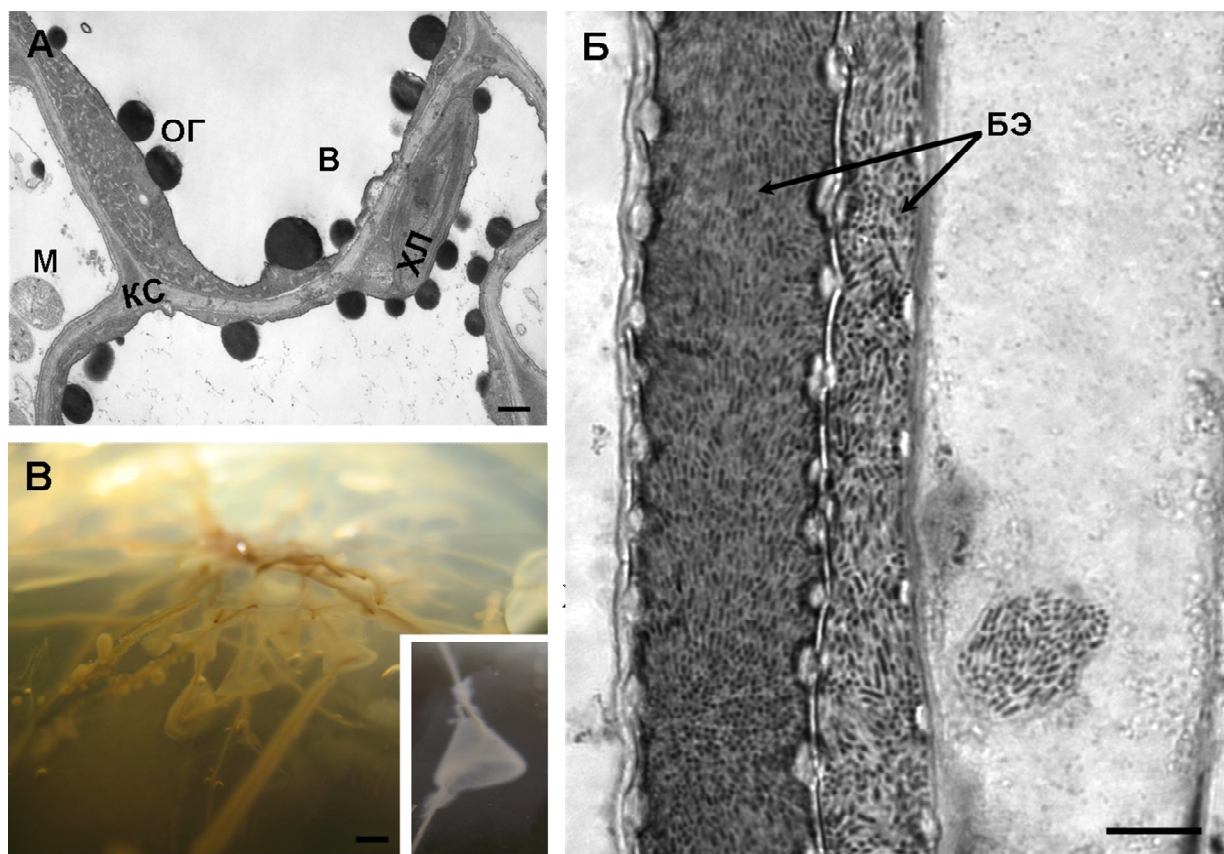


Рис. 6. Нисходящая миграция клеток *Pba* по сосудам ксилемы табака. Срезы стеблей инфицированных растений в бессимптомной области (А, Б) и общий вид корневой системы инфицированного растения (В). А – формирование осмиофильных глобул в вакуолях паренхимных клеток. Б – бактериальные эмболы в сосудах ксилемы. В – воронковидные скопления бактериальных клеток в ризосфере инфицированных растений. КС – растительная клеточная стенка; В – вакуоль; ОГ – осмиофильные глобулы; ХЛ – хлоропласт; М – митохондрия; БЭ – бактериальный эмбол. Масштабные линейки – 0,5 мкм, 10 мкм, 2 мм для А-В, соответственно.

Таким образом, колонизация растения *Pba* связана с нисходящей миграцией бактерий по сосудам ксилемы, что вероятно, обеспечивается закупоркой сосудов бактериальными эмболами и способствует расселению микроорганизмов в почве.

#### 2.2.4. Ультраструктура клеток *Pba* и табака при бессимптомной инфекции

Примерно 30 % растений после инфицирования клетками *Pba* не проявляло симптомов заболевания. У части растений этой «бессимптомной» группы через 5–20

суток после инфицирования в корневой системе формировались воронкообразные скопления бактериальных клеток (описанные в разделе 3.2.3). Это, по всей видимости, свидетельствовало в пользу того, что микробные клетки активно размножались *in planta*, несмотря на отсутствие морфологических признаков заболевания, и мигрировали по растению из надземной части в корневую систему.

Через девять суток после инфицирования у половины «бессимптомных» растений титр клеток *Pba* либо понижался, либо существенно не изменялся по сравнению с количеством инокулированных клеток (около  $10^5$  КОЕ). У второй половины растений плотность популяции бактерий увеличивалась и составляла от  $5 \times 10^5$  до  $2 \times 10^8$  КОЕ/грамм сырой массы. Через 20 суток после инфицирования в половине проанализированных бессимптомных растений титр клеток патогена увеличивался и составлял от  $2 \times 10^6$  до  $10^8$  КОЕ/грамм. Это указывает на то, что отсутствие симптомов заболевания у растения-хозяина не обязательно связано с элиминацией клеток патогена; зачастую титр клеток *Pba* при бессимптомной инфекции может увеличиваться на несколько порядков величин.

При бессимптомной инфекции в структуре клеток и тканей растений не было выявлено явных повреждений. В паренхиме иногда обнаруживали лишь единичные клетки *Pba*. Клетки паренхимы содержали в вакуолях большое количество осмиофильных глобул. В то же время, некоторые ксилемные сосуды были интенсивно колонизированы бактериями; в ряде из них были обнаружены бактериальные эмболы. Таким образом, при бессимптомном взаимодействии с растением пектобактерии заселяют сосуды ксилемы, но не коровую паренхиму.

### **2.3. Экспрессия жасмонат- и салицилат-индуцируемых маркерных генов в растениях табака при различных типах ответных реакций на *Pba***

Для выявления физиологических параметров, отличающих разные типы инфекционного процесса (типичный и бессимптомный), мы оценили особенности функционирования защитных систем, опосредуемых салициловой и жасмоновой кислотами, у растений табака при различных по характеру взаимодействиях с *Pba*, а также в рамках локального и системного ответов макроорганизма на инвазию патогена. При этом оценивали уровень транскриптов маркерных генов, характер экспрессии которых соответствует изменениям в работе указанных гормональных систем. Маркерами жасмонат-зависимого пути были выбраны гены, кодирующие алленоксидциклазу NtAOC, липоксигеназу NtLOX2 и регуляторный белок NtJAZ3 (Han *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2014), а салицилат-зависимого – ген, кодирующий белок NtPR-1 (Vidal *et al.*, 1997; Po-Wen *et al.*, 2013).

При типичной инфекции уровень экспрессии жасмонат-индуцируемых генов возрастал по сравнению с таковым для интактных растений, как при локальном (Л), так и при системном (С) ответах (рис. 7). При бессимптомной инфекции (Б) уровень транскриптов жасмонат-индуцируемых генов не отличался от контроля (рис. 7).

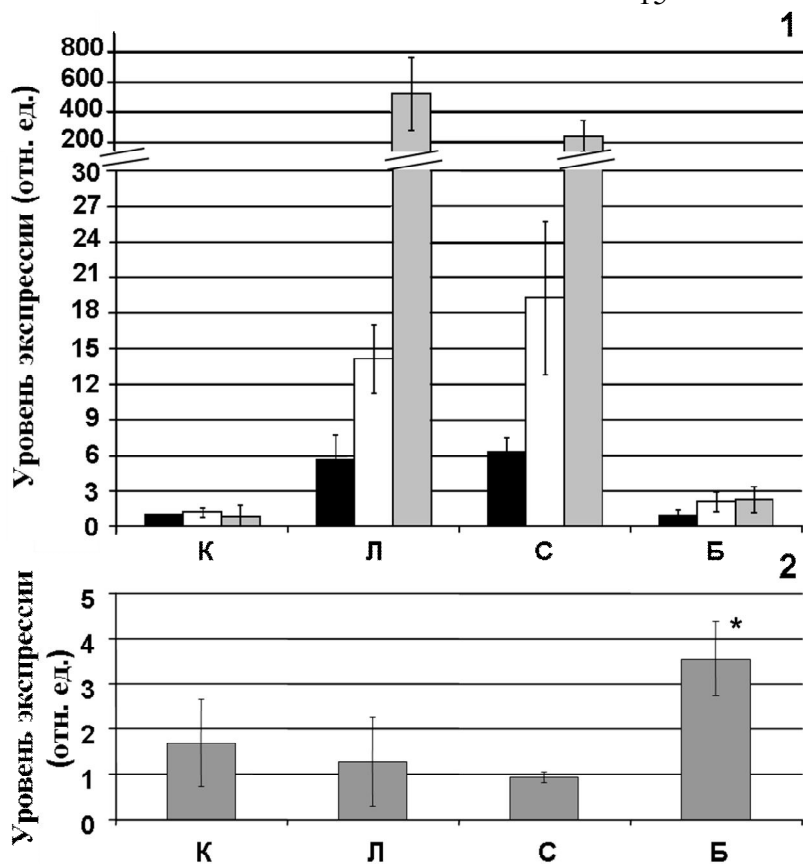


Рис. 7. Экспрессия (1) жасмонат-индуцируемых генов, кодирующих JAZ3 (черные), алленоксидциклазу (белые), липоксигеназу (серые) и (2) салицилат-индуцируемого гена PR-1 в контрольных (К) и инфицированных *Pba* (Л, С, Б) растениях табака. Л – листья, на которые наносили клетки патогена (локальный ответ), взятые с растений, проявивших симптомы заболевания (24 часа после инфицирования); С – листья, располагавшиеся под листьями, инокулированными

патогеном (системный ответ), взятые с растений, проявивших симптомы заболевания (24 часа после инфицирования); Б – листья, на которые наносили клетки патогена, взятые с инфицированных растений, не проявивших симптомы заболевания (бессимптомная инфекция, 9 суток после инфицирования). На графике представлены средние значения  $\pm$  стандартное отклонение, рассчитанные по четырем биологическим повторностям. \* – достоверно при  $p \leq 0,05$ .

Уровень экспрессии салицилат-индуцируемого гена PR-1 при типичной инфекции, вызванной *Pba*, не менялся ни при локальном, ни при системном ответах на инвазию патогена по сравнению с контролем (рис. 7), но при бессимптомной инфекции возрастал. Таким образом, при взаимодействии табака и *Pba*, сопряженном с развитием симптомов заболеваний у растения-хозяина, происходит индукция жасмонат-зависимого ответа, а салицилат-зависимый путь не активируется. При бессимптомной инфекции, наоборот, индуцируется салицилат-зависимый ответ, а индукции жасмонат-зависимого не происходит.

#### 2.4. Роль полисахаридов растительной клеточной стенки в формировании бактериальных эмболов

Бактериальные эмболы, образуемые клетками *Pba* в сосудах ксилемы растения, были описаны в нашем исследовании впервые, поэтому принципы формирования таких структур не были известны. Начальной стадией образования бактериальных эмболов было накопление гранулярной субстанции на растительных клеточных

стенках и формирование из нее гелеподобного матрикса (раздел 3.2.2.). В связи с этим, мы предположили, что сборка бактериальных эмболов связана с модификацией полисахаридов растительной клеточной стенки, которые, попадая в люмен сосудов (и теряя, таким образом, прочную связь с клеточной стенкой), приводят к желированию ксилемного сока. Для проверки этого предположения было проведено сравнение слабосвязанных (либо не связанных) с клеточной стенкой полисахаридов, вымываемых в буфер при гомогенизации тканей (буфер-экстрагируемая фракция), контрольных и инфицированных *Pba* растений табака.

На профиле элюции соединений этой фракции, выделенной из инфицированных растений, присутствовали два пика (100 и <50 кДа) (рис. 8). На хроматограммах фракции, полученной аналогичным способом из контрольных растений, выраженные пики отсутствовали, а общее содержание углеводов было в 4 раза меньше, чем в буфер-экстрагируемой фракции инфицированных растений.

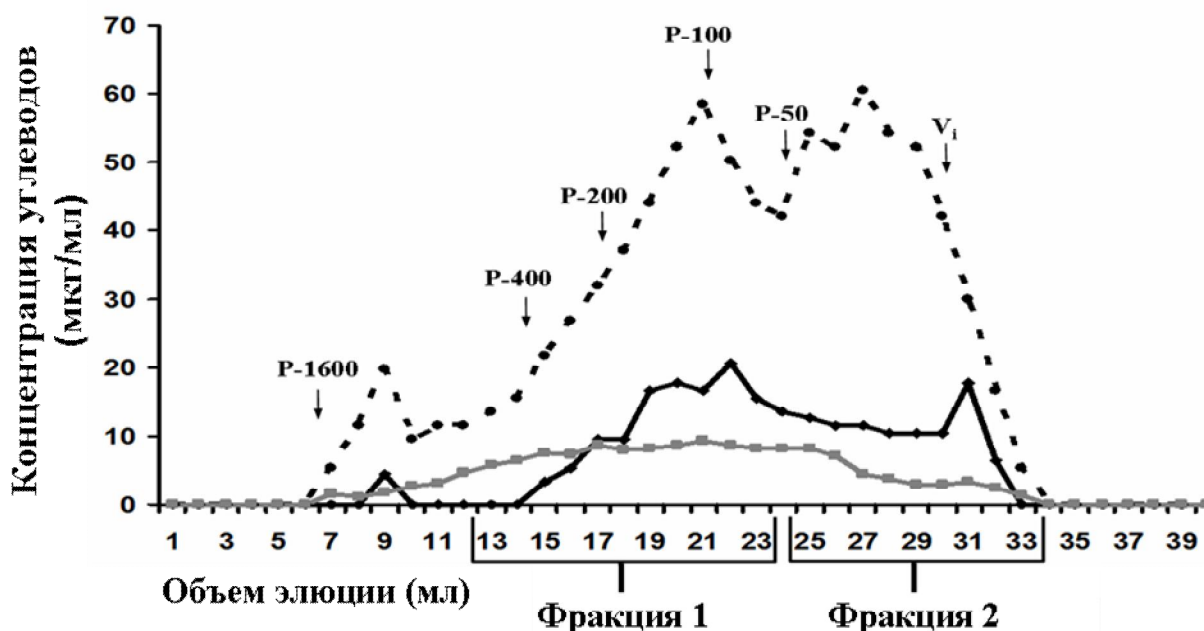


Рис. 8. Профили элюции полисахаридов буфер-экстрагируемой фракции контрольных (сплошная линия) и инфицированных *Pba* (прерывистая линия) растений табака, а также бактерий, выращенных *in vitro* (серая линия). Разделение проводили на колонке с сефарозой CL-4В. Фракции 1 и 2 отбирали для анализа моносахаридов. Образцы контрольных и инфицированных растений выровнены по сырой массе исходного материала.

Полимеры, соответствовавшие двум пикам на хроматограммах буфер-экстрагируемой фракции полисахаридов инфицированных растений, имели разный моносахаридный состав. В состав полимеров более высокомолекулярного пика (от 50 до 400 кДа) входили галактуроновая кислота (35,6 %), а также нейтральные моносахариды – галактоза (26,9 %), арабиноза (14,2 %) и рамноза (13,7 %), что



свидетельствует о наличии в составе этой фракции фрагментов рамногалактуронана I. Соединения более низкомолекулярного пика (<50 кДа) на 80 % состояли из галактуроновой кислоты.

Эти результаты были подтверждены иммуноцитохимическим способом. Эпитопы рамногалактуронана I и гомогалактуронана были выявлены в полости сосудов инфицированных растений с использованием антител RUI и LM19 (рис.9). Характер распределения метки при этом соответствовал расположению гранулярных субстанций, появляющихся на внутренней поверхности растительной клеточной стенки при колонизации патогеном сосудов ксилемы (раздел 3.2.2).

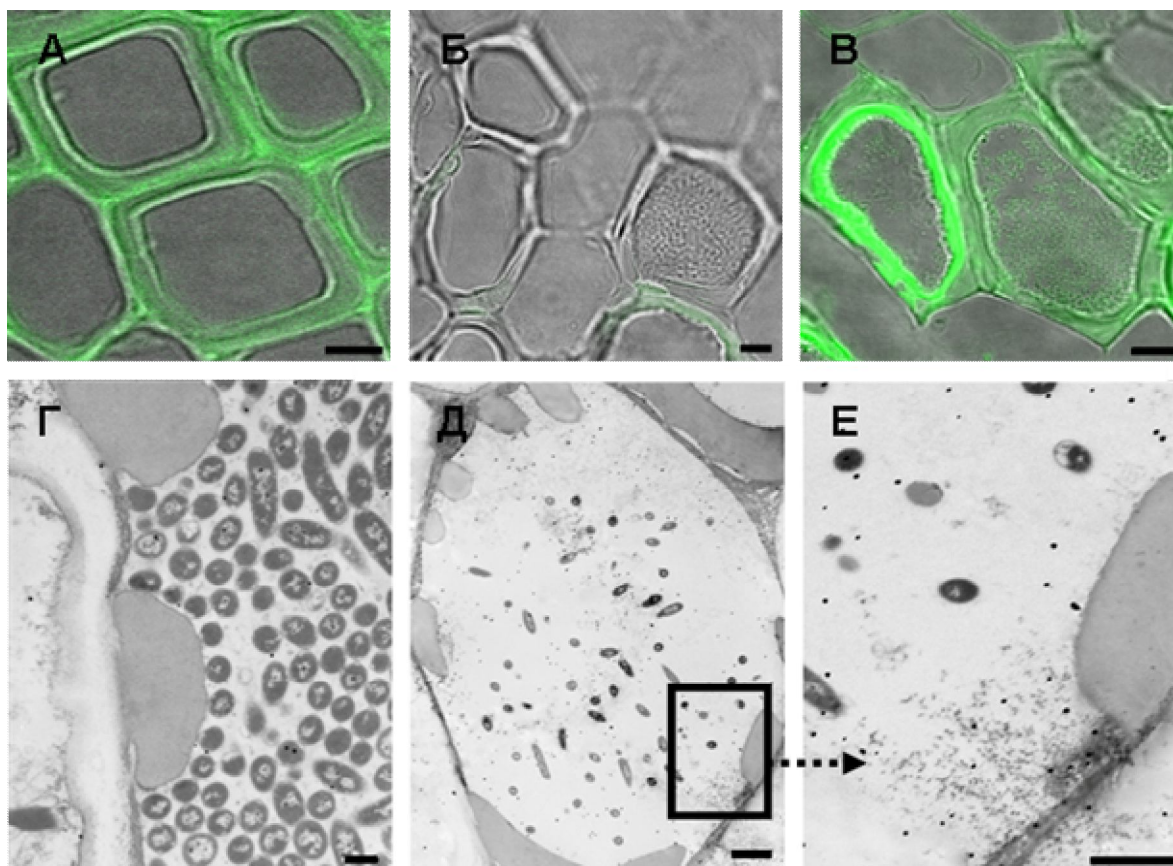


Рис. 9. Иммуноцитохимическая реакция с антителом INRA-RUI на остов рамногалактуронана I в полости сосудов ксилемы стебля неинфицированного растения табака (А), и растений через двое суток после инфицирования *Pba* (Б-Е). А-В – конфокальная микроскопия; Г-Е – электронная микроскопия. Б, Г – срезы, обработанные только вторичными антителами (контроль); А, В, Д, Е – антителом INRA-RUI; Е – увеличенный фрагмент, выделенный на рисунке Д. Масштабные линейки – 5 мкм для А-В; 500 нм, 2 мкм, 1 мкм, для Г-Е, соответственно.

Мы предположили, что фрагменты рамногалактуронана I, появляющиеся в полости сосудов ксилемы при формировании бактериальных эмболов, содержат в своем составе фенольные соединения, с помощью которых цепи полисахаридов «сшиваются», образуя сеть из высокомолекулярных продуктов распада пектиновых веществ. Для проверки этого предположения мы оценили наличие фенольных

соединений, связанных с полисахаридами буфер-экстрагируемой фракции, в контрольных и инфицированных *Pba* растениях. Полисахариды, входящие в состав буфер-экстрагируемой фракции контрольных и инфицированных *Pba* растений, подвергали щелочному, а затем кислотному гидролизу. Это обеспечивало разрыв эфирных связей между углеводными цепочками и фенольными соединениями; последние экстрагировали метанолом и хроматографировали (рис. 10).

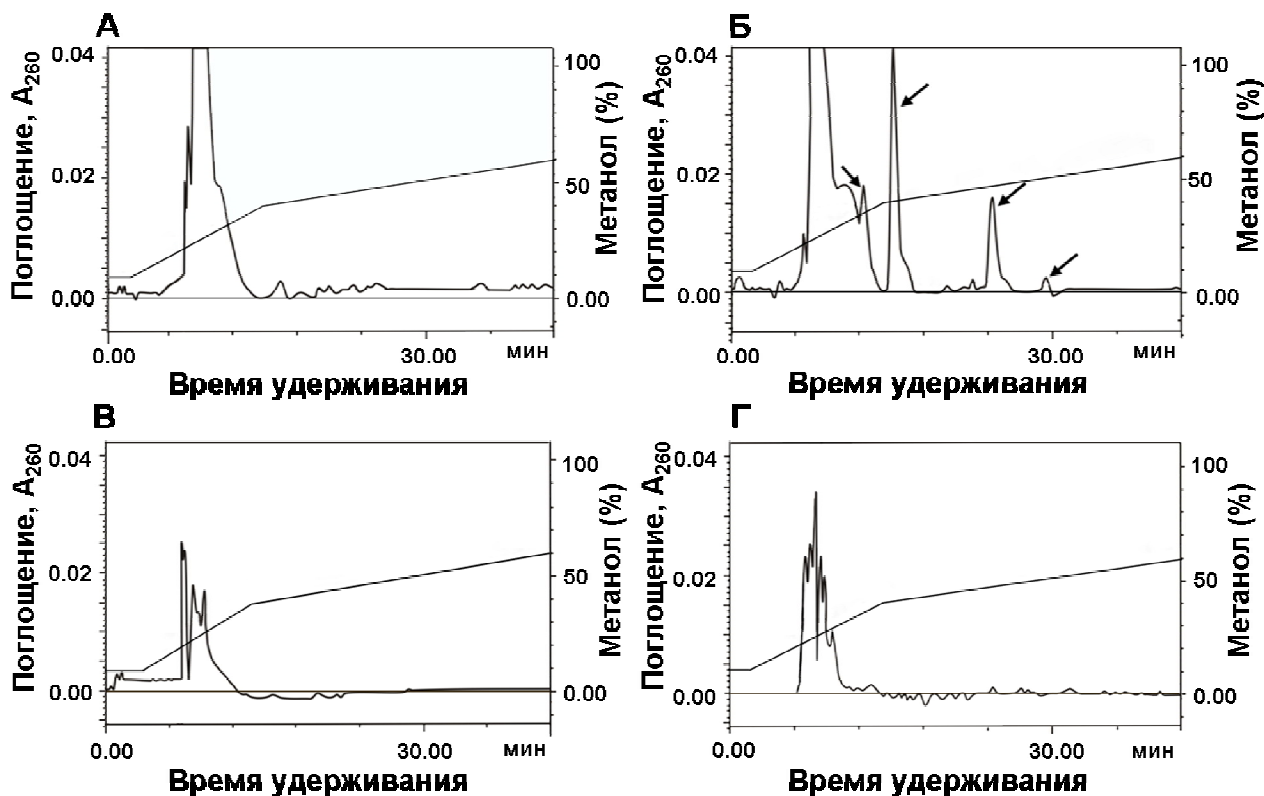


Рис. 10. Профили элюции соединений, экстрагируемых метанолом из буфер-экстрагируемой фракции полисахаридов растений табака и клеток *Pba* после проведения щелочного и кислотного гидролиза (А-В) или без этапа гидролиза (Г): контрольные растения (А); инфицированные *Pba* растения (Б, Г); бактерии *Pba*, выращенные *in vitro* (В). Разделение проводили на колонке SINERGI 4u Polar-RP 80A в градиенте метанола (10-60%). Образцы контрольных и инфицированных растений выровнены по сырой массе исходного материала.

При сравнении хроматограмм образцов контрольных и инфицированных растений (рис. 10А и Б) в последних было выявлено появление гидрофобных соединений (при 35, 41, 47 и 52 % метанола). Без проведения этапа щелочного и кислотного гидролиза при подготовке образцов эти соединения в метанольном экстракте отсутствовали (рис. 10Г). Их не было обнаружено и в метанольном экстракте гомогената выращенных *in vitro* бактериальных клеток, подвергнутого щелочному и кислотному гидролизу (рис. 10В). Полученные данные свидетельствуют, что обнаруженные фенольные соединения имеют растительное происхождение и появляются в буфер-экстрагируемой фракции только после

инфицирования растений клетками *Pba*. Отсутствие фенольных соединений в метанольных экстрактах без предварительного этапа щелочного и кислотного гидролиза означает, что эти соединения связаны с полисахаридами и, вероятно, способствуют взаимодействию молекул полимеров друг с другом.

Образование сшивок между полисахаридами через «мостики» из фенольных соединений происходят в случае окисления последних. Это может быть следствием накопления активных форм кислорода (АФК), содержание которых может увеличиваться при инфекции (Luhova *et al.*, 2006). Мы оценили возможность накопления АФК в сосудах ксилемы инфицированных растений табака при формировании в них бактериальных эмболов с помощью 2',7'-дихлорофлуоресцеин диацетата (DCF-DA) (Рис. 11).

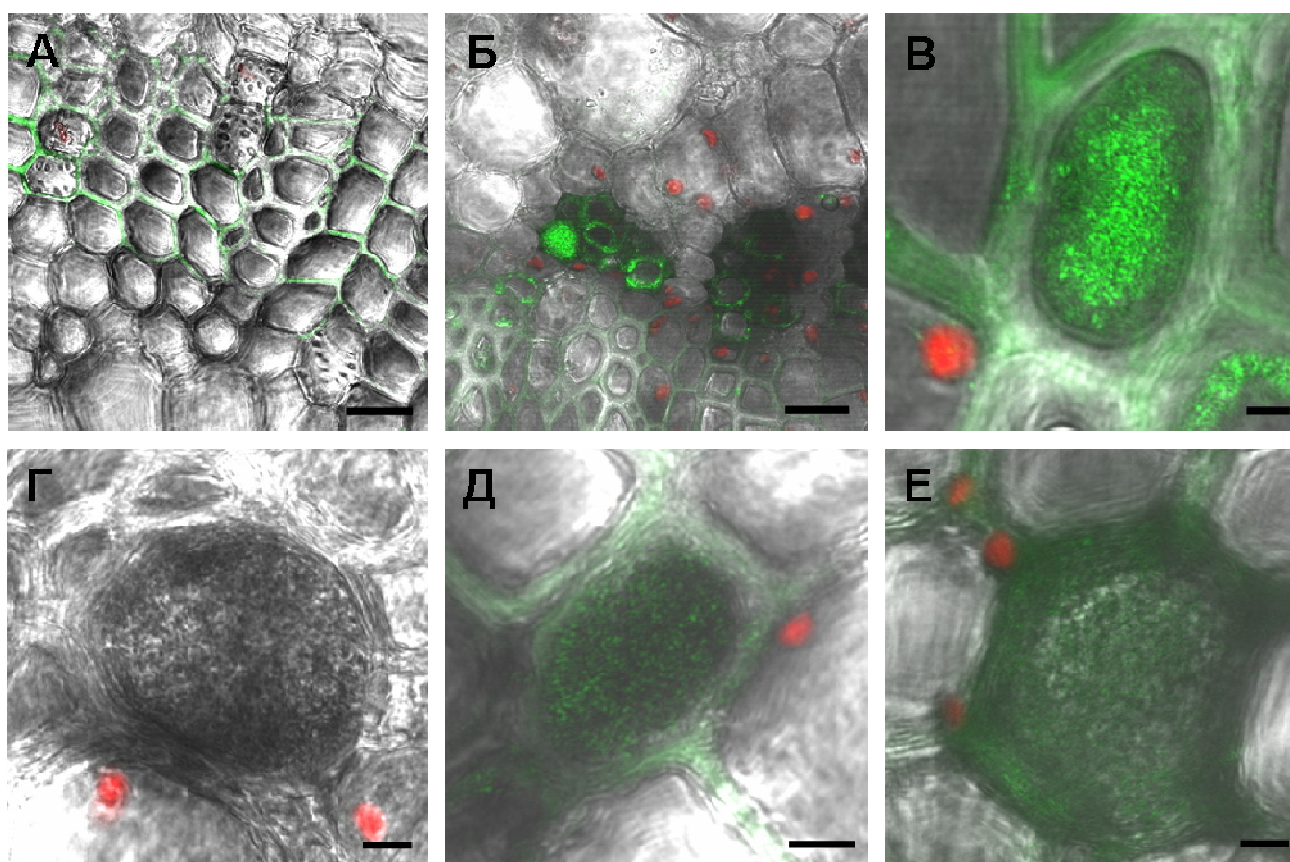


Рис. 11. Детекция активных форм кислорода в растениях табака с помощью красителя DCF-DA: срезы неинфицированных (А) и инфицированных клетками *Pba* (Б-Е) растений. Вариант (Г) не окрашен DCF-DA. Д, Е – срезы до окрашивания DCF-DA обработаны супероксиддисмутазой (0,67 мг/мл) или каталазой (0,038 мг/мкл), соответственно. Масштабные линейки – 20, 20, 2, 5, 5, 5 мкм для А-Е, соответственно.

В контрольных растениях уровень флуоресценции DCF-DA был чуть выше фонового; при этом наибольшая интенсивность была отмечена в клеточных стенках сосудов вторичной ксилемы; в первичной ксилеме свечения не наблюдали (рис. 11А). В инфицированных растениях интенсивность флуоресценции DCF-DA в клеточных стенках сосудов первичной ксилемы была высокой (рис. 11Б). Причем, свечение было

отмечено на внутренней поверхности клеточных стенок, а также в люмене сосудов (рис 11Б, В). В случае предварительной обработки срезов антиоксидантами интенсивность флуоресценции была низкой (рис. 11 Д, Е).

Таким образом, в процессе инфекции в растениях, в том числе в люмене сосудов ксилемы, появляются высокомолекулярные продукты распада пектиновых веществ, имеющие модифицирующие группы из фенольных соединений. Накопление АФК создает условия для окисления этих фенольных соединений, их взаимодействия и сшивки фрагментов пектиновых веществ. Описанные события способны сказаться на физико-химических параметрах среды в сосудах ксилемы, в частности, изменить реологические свойства ксилемного сока. По всей вероятности, это является одним из важных аспектов формирования бактериальных эмболов в сосудах ксилемы.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Стратегии взаимодействия фитопатогенных бактерий с растениями принято делить на два основных типа: 1) «*brute force*» – колонизация растения за счет «грубой силы» и 2) «*stealth*» – использование «деликатного поведения» и «хитрости» (Liu *et al.*, 2008). Считается, что пектобактерии используют стратегию первого типа. Однако в нашем исследовании показано, что способы взаимодействия этих бактерий с растениями связаны не только с «грубой силой», но и с «рациональными тактическими действиями», указывающими на интеграцию физиологических процессов патогена и хозяина.

Различные клетки и ткани растения, а также протекающие в них физиологические процессы формируют микрониши для отдельных субпопуляций патогена. В результате этого различные компартменты растения оказываются колонизированными разными по ультраструктуре и физиологии клетками патогена. Так, например, описанные в нашей работе бактериальные эмболы формируются только в сосудах ксилемы в ходе детерминированной последовательности происходящих в них биохимических и физиологических процессов. Субпопуляциям патогена, формирующимся в растении-хозяине ткане- и/или стадия-специфично, свойственна функциональная специализация. Одни обеспечивают закупорку сосудов ксилемы, другие – мацерацию тканей, третьи – колонизацию ризосферы, четвертые – эффективное сохранение резерва популяции после гибели растения-хозяина.

Формирование патосистемы *N. tabacum* – *P. atrosepaticum* может происходить, как минимум, по двум сценариям (рис. 12). При взаимодействии с растением пектобактерии колонизируют либо коровую паренхиму и сосуды ксилемы (типичная инфекция), либо только сосуды ксилемы (бессимптомная инфекция). При этом происходит активация либо жасмонат-, либо салицилат-зависимого ответа, соответственно. И в том, и в другом случае в растениях формируются бактериальные эмболы, закупоривающие полость сосудов ксилемы, создавая условия для нисходящей миграции бактерий. В результате этого микроорганизмы колонизируют

корневую систему растений и ризосферу. Таким образом, агрессивное «поведение» пектобактерий, приводящее к развитию симптомов заболевания и гибели растения-хозяина, не является обязательным условием формирования патологической системы *N. tabacum* – *P. atrosepticum*, а популяционный цикл пектобактерий *in planta* может проходить бессимптомно.

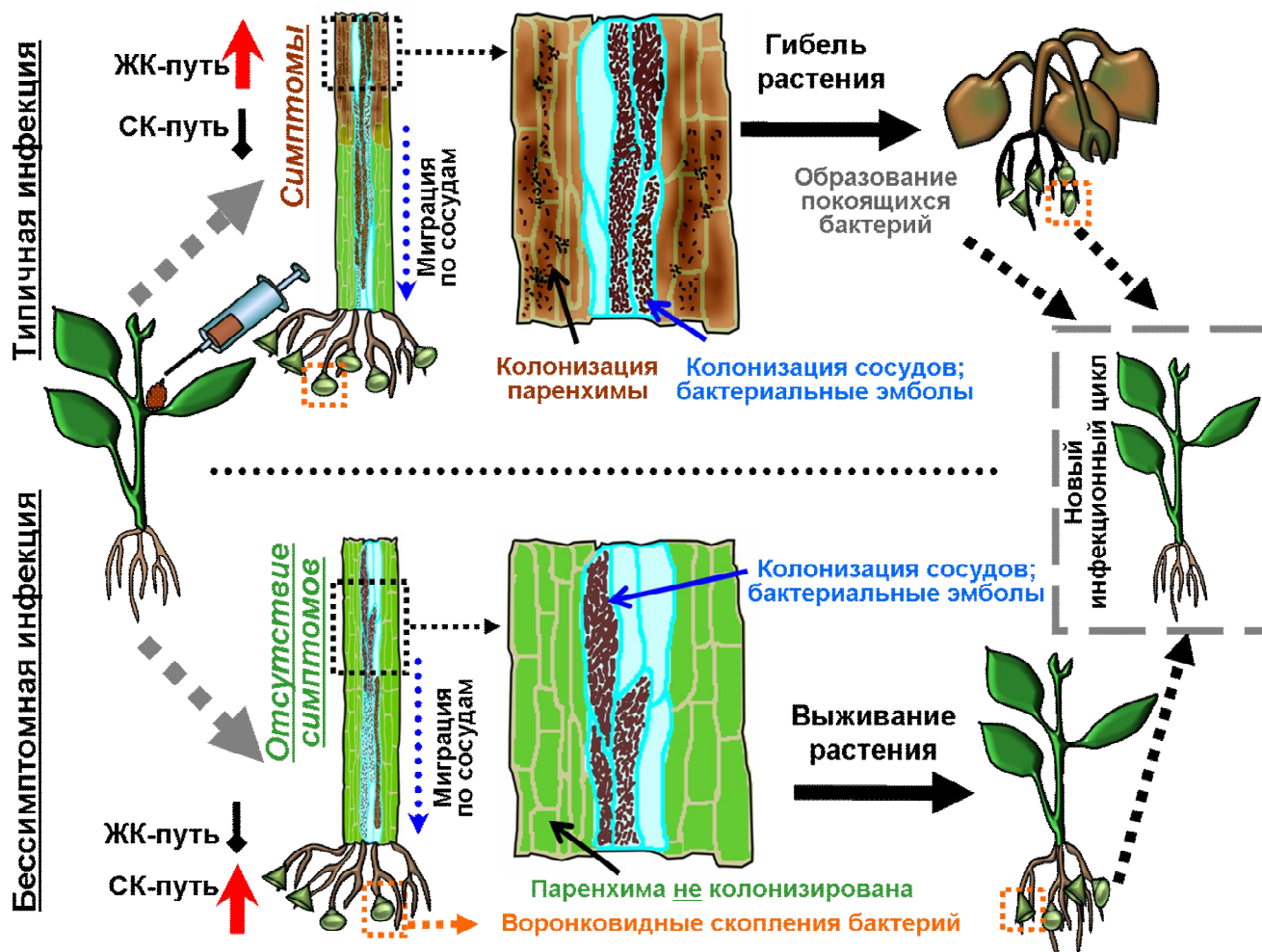


Рис. 12. Схема формирования растительно-микробной патосистемы *N. tabacum* – *Pba*. ЖК-, СК- путь – жасмонат-, салицилат-зависимые ответные реакции.

Причины, определяющие выбор одного из альтернативных путей развития растительно-микробной патосистемы, не известны. Вероятно, что на характер взаимодействия макро- и микроорганизма могут влиять исходный иммунный статус растения, неоднородность патоген-индуцируемых реакций хозяина, альтернативные стратегии патогенов, используемые при колонизации хозяина. Полученные в настоящей работе результаты могут послужить основой для выявления закономерностей, определяющих непатогенный путь развития растительно-микробных систем. Это, в свою очередь, может стать предпосылкой для разработок новых способов контроля бактериозов растений, основанных не на уничтожении патогена, а на координировании физиологических процессов двух организмов с целью формирования устойчивой и умеренной растительно-микробной системы.

## ВЫВОДЫ

1. В зависимости от внешних условий в популяциях *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 формируются разные фенотипы клеток, различающиеся по структуре клеточной оболочки, цитоплазмы и нуклеоида; при этом может происходить диссоциация микробной популяции с образованием нескольких клеточных фенотипов.

2. В организме растения-хозяина (*Nicotiana tabacum*) при характеристике динамики популяции *P. atrosepticum* SCRI1043 выявлены различные бактериальные фенотипы, образующиеся ткане- и/или стадия-специфично.

3. В сосудах ксилемы растений табака в ходе их колонизации клетками *P. atrosepticum* SCRI1043 образуются бактериальные эмболы – впервые описанные в настоящем исследовании «многоклеточные» структуры, которые состоят из плотно расположенных, пространственно ориентированных бактериальных клеток, имеющих области межклеточных контактов.

4. Бактериальные эмболы имеют особый способ формирования, связанный с желированием ксилемного сока за счет специфической модификации полисахаридов растительной клеточной стенки; при этом в люмене сосудов ксилемы появляются высокомолекулярные продукты расщепления рамногалактуронана I, а также накапливаются активные формы кислорода.

5. Популяционный цикл *P. atrosepticum* SCRI1043 в организме растения-хозяина (*N. tabacum*) может завершаться обратимым переходом клеток бактерий в жизнеспособное, но некультивируемое состояние.

6. У растений табака, инфицированных *P. atrosepticum* SCRI1043, в ходе инфекции возникают изменения в ультраструктуре клеток коровой паренхимы, связанные с набуханием клеточных органелл и компартментов, инвагинацией и везикуляризацией плазмалеммы, модификацией структуры клеточной стенки, образованием осмиофильных глобул в вакуолях.

7. Размножение клеток *P. atrosepticum* SCRI1043 в растениях табака может проходить в отсутствие симптомов заболевания у хозяина; при бессимптомной инфекции бактериальные клетки преимущественно колонизируют сосуды ксилемы, но не коровую паренхиму, как при взаимодействии, сопряженном с развитием симптомов заболевания.

8. У растений табака, инфицированных *P. atrosepticum* SCRI1043, при типичной и бессимптомной инфекциях активируются разные защитные системы: при взаимодействии, сопряженном с развитием симптомов заболевания, происходит активация жасмонат-индуцируемого ответа; при бессимптомной инфекции увеличивается содержание транскриптов салицилат-индуцируемого маркерного гена, а активации жасмонат-индуцируемого ответа не происходит.

## СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи, опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК

1. Горшков, В.Ю. Система межклеточной коммуникации энтеробактерии *Erwinia carotovora* при формировании адаптивного ответа к условиям неблагоприятным для роста / В.Ю. Горшков, О.Е. Петрова, **А.Г. Даминова**, Ю.В. Гоголев // Доклады Академии наук. – 2010. – Т. 430, №2. – С. 268–272.
2. Gorshkov, V. Dissociation of a population of *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 in tobacco plants: formation of bacterial emboli and dormant cells / V. Gorshkov, **A. Daminova**, M. Ageeva, O. Petrova, N. Gogoleva, N. Tarasova, Y. Gogolev // Protoplasma. – 2014. – Vol. 251. – N. 3. – P. 499–510.
3. Petrova, O. Stress response in *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 under starvation conditions: adaptive reactions at a low population density / O. Petrova, V. Gorshkov, **A. Daminova**, M. Ageeva, L.N. Moleleki, Y. Gogolev // Research in Microbiology. – 2014. – Vol. 165. – N.2. – P. 119–127.

### Работы, опубликованные в материалах научных мероприятий

1. **Даминова, А.Г.** Образование различных морфотипов бактерии *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* SCRI 1043 при развитии эрвиниоза табака / **А.Г. Даминова**, В.Ю. Горшков, М.В. Агеева, О.Е. Петрова, Ю.В. Гоголев // Третий Международный симпозиум «Клеточная сигнализация у растений»: тезисы докладов. – Казань, 2011. – С. 47.
2. Горшков, В.Ю. Использование пектиновых веществ фитопатогенными бактериями при колонизации растения-хозяина / В.Ю. Горшков, **А.Г. Даминова**, О.Е. Петрова, П.В. Микшина, М.В. Агеева, Н.Б. Тарасова, Н.Е. Гоголева, Ю.В. Гоголев // Первая Всероссийская конференция «Фундаментальная гликобиология». Казань, 2012.–С. 27.
3. **Daminova, A.G.** Potato signal molecules that activate virulence in phytopathogenic *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 / **A.G. Daminova**, N.B. Tarasova, Y.V. Gogolev // 4<sup>th</sup> FEMS Congress: Book of abstracts. – Geneve, Switzerland, 2011. – P. 802.
4. **Daminova, A.** Dissociation of bacterial population: strategy of effective plant colonization / **A. Daminova**, V. Gorshkov, M. Ageeva, O. Petrova, P. Mikshina, Y. Gogolev // Plant Biology Congress: Book of abstracts. – Freiburg, Germany, 2012. – P. 691.
5. **Даминова, А.Г.** Роль редокс-метаболизма в колонизации растений фитопатогеном *Pectobacterium atrosepticum* SCRI 1043 / **А.Г. Даминова**, В.Ю. Горшков, О.Е. Петрова, М.В. Агеева, П.В. Микшина, Н.Б. Тарасова, Е.П. Ветчинкина, Ю.В. Гоголев // Первый Международный симпозиум «Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений»: тезисы докладов. – Казань, 2013. – С. 74.
6. **Daminova, A.** Bacterial emboli: novel structures formed during the colonization of the plants / **A.G. Daminova**, V.Y. Gorshkov, M.V. Ageeva, O.E. Petrova, P.V. Mikshina, N.B. Tarasova, V.V. Salnikov, R.F. Gubaev, G.L. Burygin, Y.V. Gogolev // 16<sup>th</sup> International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions. – Rhodes, Greece, 2014. – P. 40.