

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ КАЗАНСКИЙ ИНСТИТУТ БИОХИМИИ И
БИОФИЗИКИ КАЗАНСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

ДАМИНОВА АМИНА ГАЛЕЕВНА

**ФОРМИРОВАНИЕ РАСТИТЕЛЬНО-МИКРОБНОЙ ПАТОСИСТЕМЫ
NICOTIANA TABACUM – *PESTOBACTERIUM ATROSEPTICUM*
SCRI1043: УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЙ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ
АСПЕКТЫ**

03.01.05 - физиология и биохимия растений

03.02.03 - микробиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:

доктор биологических наук Ю.В. Гоголев

кандидат биологических наук В.Ю. Горшков

Казань 2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	7
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1. Общее представление о растительно-микробных патосистемах	14
1.2. Морфофизиологическая гетерогенность микробных популяций	21
1.3. Роль систем гормональной регуляции растений в формировании растительно-микробных патосистем	34
1.4. Растительно-микробные патосистемы, включающие представителей рода <i>Pectobacterium</i>	57
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	67
2.1. Объект исследования	67
2.2. Культивирование <i>P. atrosepticum</i> SCRI1043	67
2.3. Культивирование растений табака и их инфицирование клетками <i>P. atrosepticum</i> SCRI1043	69
2.4. Оценка титра культивируемых клеток <i>P. atrosepticum</i> SCRI1043 в инфицированных растениях	70
2.5. «Оживление» покоящихся клеток <i>P. atrosepticum</i> SCRI1043	71
2.6. Приготовление образцов для световой и электронной микроскопии	72
2.7. Выделение РНК и синтез кДНК при помощи реакции обратной транскрипции	74
2.8. Электрофорез нуклеиновых кислот в агарозном геле	74
2.9. Амплификация участков ДНК (кДНК) с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР РВ)	75
2.10. Анализ уровня экспрессии салицилат- и жасмонат-индуцируемых генов у растений табака	78

2.11. Оценка титра геномных копий <i>P. atrosepticum</i> SCRI1043 в инфицированных растениях табака	78
2.12. Выделение различных фракций полисахаридов и их анализ	80
2.13. Проведение иммуноцитохимической реакции с антителами LM19 и INRA-RU	82
2.14. Анализ фенольных соединений с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)	84
2.15. Детекция активных форм кислорода на срезах растений с помощью витального красителя 2',7'-дихлорофлуоресцин диацетата	85
2.16. Статистическая обработка данных	86
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	87
3.1. Динамика титра клеток <i>Pectobacterium atrosepticum</i> SCRI1043 в растении-хозяине (<i>Nicotiana tabacum</i>)	87
3.2. Фенотипическая разнородность клеток <i>P. atrosepticum</i> SCRI1043: влияние условий культивирования на ультраструктуру бактерий	92
3.3. Изменения в ультраструктуре клеток табака и <i>P. atrosepticum</i> SCRI1043 при взаимодействии двух организмов	102
3.3.1. Ранние стадии взаимодействия <i>P. atrosepticum</i> SCRI1043 и табака	102
3.3.2. Острая стадия инфекции, вызываемой <i>P. atrosepticum</i> SCRI1043, у табака. Формирование бактериальных эмболов	105
3.3.3. Миграция клеток <i>P. atrosepticum</i> SCRI1043 в растениях табака	111
3.3.4. Изменения в ультраструктуре клеток <i>P. atrosepticum</i> SCRI1043 после гибели растения-хозяина	115

3.3.5. Ультраструктура клеток <i>P. atrosepticum</i> SCRI1043 и табака при бессимптомной инфекции	118
3.4. Экспрессия жасмонат- и салицилат-индуцируемых маркерных генов в растениях табака при различных типах ответных реакций на инфицирование <i>P. atrosepticum</i> SCRI1043	121
3.5. Роль полисахаридов растительной клеточной стенки в формировании бактериальных эмболов клетками <i>P.</i> <i>atrosepticum</i> SCRI1043 в сосудах ксилемы табака	128
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	142
ВЫВОДЫ	146
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	148

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АБК – абсцизовая кислота

АГЛ – ацилгомосерин лактон

АИ-2 – аутоиндукторы второго типа

АОБ – алкилоксибензол

АФК – активные формы кислорода

АЦК – аминокicloпропанкарбоновая кислота

БСА – бычий сывороточный альбумин

БЭ – бактериальный эмбол

В – вакуоль

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

Г – аппарат Гольджи

ГК – геномные копии

ЖК – жасмоновая кислота

ИУК – индолил-3-уксусная кислота

КДГ – 2-кетог-3-дезоксиглюконат

кДНК – комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота

КОЕ – колониеобразующая единица

КП – клетка паренхимы

КС – растительная клеточная стенка

М – митохондрия

МК – межклетник

НКС – нормальная козья сыворотка

ОГ – осмиофильные глобулы

ПЛ – плазмалемма

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени

РСЧ – реакция свехчувствительности

СК – салициловая кислота

СК – сосуд ксилемы

ССТТ – система секреции третьего типа

Т – тонопласт

ТФУ – трифторуксусная кислота

ФАЛ – фенилаланин-аммиак-лиаза

ХК – хоризмовая кислота

ХЛ – хлоропласт

ЦПК – цистоподобные покоящиеся клетки

ЭПР – эндоплазматический ретикулум

ЭПС – экзополисахариды

CUL3 – убиквитин-лигазный комплекс

DCF-DA – краситель 2',7'- дихлорофлуоресцин диацетат (2',7'-Dichlorofluorescein diacetate)

FITC – флуоресцеин изотиоцианат

hrp – hypersensitive response and pathogenicity

IM – среда Induction Medium

LB – среда Luria–Bertani

MS – среда Murashige–Skoog

Pba – *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043

Rpf – resuscitation-promoting factor

SDS – додецилсульфат натрия

ВВЕДЕНИЕ

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, а также механизмов для тонкой регуляции их экспрессии (Agrios, 2005, Дьяков и др., 2012). Однако развитие патологической системы – 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, а зачастую и на протяжении нескольких поколений (Чикин, 2001; 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 бактериальных 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 и т.д. Совокупность внешних факторов приводит к доминированию одного или нескольких специализированных фенотипов, наиболее адаптированных к конкретным условиям, что обеспечивает эффективное выживание всей популяции (Gefen, Balaban, 2009). Для фитопатогенных бактерий образование нескольких фенотипов может способствовать более успешной колонизации различных «компарментов» своего хозяина. Однако явление физиологической гетерогенности микроорганизмов в организме растения-хозяина охарактеризовано крайне слабо.

Процессы адаптации у растений, в том числе связанные с формированием патосистем, 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-Seilanianantz *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 (soft-rot *Enterobacteriaceae*), в том числе пектобактерий.

Возбудители «мягких гнилей» всегда считались типичными некротрофами, взаимодействующими со своим хозяином за счет «грубой силы» («brute-force pathogens»), а именно массовой продукции экстраклеточных ферментов, разрушающих клеточную стенку растений (Charkowski *et al.*, 2012). Вероятно, вследствие этого, исследования фитопатогенных энтеробактерий сосредоточены на расшифровке механизмов регуляции продукции факторов вирулентности. 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 (Grimault *et al.*, 1994; Perombelon, 2002; Bell *et al.*, 2004; Swanson *et al.*, 2005; Charkowski *et al.*, 2012).

Целью настоящей работы является 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*).

В рамках указанной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Определение динамики численности популяций *P. atrosepticum* SCRI1043 в растениях табака (*N. tabacum*), инфицированных этим патогеном.
2. Описание изменений в ультраструктуре клеток *P. atrosepticum* SCRI1043 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 *P. atrosepticum* SCRI1043.
4. Оценка возможности формирования различных фенотипов *P. atrosepticum* SCRI1043 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 *P. atrosepticum* SCRI1043.

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 *P. atrosepticum* SCRI1043 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*: набухание клеточных органелл и компартментов (хлоропласты, ЭПР), инвагинация и везикуляризация плазмалеммы, модификация структуры клеточной стенки, образование осмиофильных глобул в вакуолях.

Впервые показано, что при типичных и при бессимптомных инфекциях, вызванных *P. atrosepticum* SCRI1043, активируются разные защитные системы растения-хозяина. При типичных инфекциях, сопряженных с развитием симптомов заболевания, активируется жасмонат-зависимый ответ, но не салицилат-зависимый, в то время как при бессимптомных инфекциях, наоборот, жасмонат-зависимый ответ не активируется, а экспрессия салицилат-индуцируемого маркерного гена PR-1 возрастает.

Научно-практическая значимость. Полученные данные вносят существенный вклад в понимание процессов взаимодействия растений с фитопатогенными бактериями и развития инфекционных заболеваний. Результаты работы могут служить основой для создания новых способов контроля бактериозов растений.

Показано, что *P. atrosepticum* SCRI1043 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. Выявленные особенности данного микроорганизма могут быть использованы при экологическом мониторинге и фитокарантинных мероприятиях.

Разработаны методы детекции *P. atrosepticum* SCRI1043 и диагностики бактериозов растений, вызываемых данным возбудителем. Предложены тестовые системы для оценки экспрессии патоген-индуцируемых генов растений табака.

Экспериментальные данные и методические приемы, изложенные в работе, могут быть использованы в сельскохозяйственных, медицинских, биологических и биотехнологических учреждениях, занимающихся разработкой способов выявления и лечения персистентных инфекций, а также в учебном процессе при чтении курсов лекций по микробиологии, физиологии растений и фитопатологии в ВУЗах.

Связь работы с научными программами и собственный 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. atrorepticum* SCRI1043 диссоциируют с образованием разнородных субпопуляций, представленных специализированными клеточными фенотипами.

2. При колонизации сосудов ксилемы растений клетки *P. atrorepticum* 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 12-ой и 13-ой международных Пущинских школах-конференциях молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2008, 2009); 2-ом всероссийском, с международным участием, конгрессе студентов и аспирантов – биологов «Симбиоз Россия 2009» (Пермь, 2009); 13-ом ежегодном симпозиуме студентов и аспирантов биологов «SymBioSE 2009, Biology: Expansion of Borders» (Казань, 2009); V Всероссийской конференции молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой» (Саратов, 2010); I Всероссийской школе-конференции молодых ученых «Современные проблемы микробиологии, иммунологии и биотехнологии» (Пермь, 2011); 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); 5-ом хорватском конгрессе с международным участием (Примоштен, 2012); I Международном симпозиуме «Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений» (Казань, 2013), I Международном Мультидисциплинарном конгрессе по микроскопии INTERM 2013 (Анталия, 2013), XVI Международном конгрессе «Molecular Plant-Microbe Interactions»

(Родос, 2014), а также на итоговых конференциях Казанского института биохимии и биофизики КазНЦ РАН (2011, 2012, 2013 гг.).

Глава 1.ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Общее представление о растительно-микробных патосистемах

Растения, произрастающие в естественных экосистемах, вступают в тесные взаимоотношения с микроорганизмами. Представители фитоассоциированной микрофлоры влияют на протекание большинства физиологических процессов макроорганизма. Это во многом определяет особенности развития растений как на организменном, так и на популяционном уровнях. Считается, что стерильные растения не смогли бы существовать в естественных условиях (Partida-Martínez, Neil, 2011). Поэтому растения, населенные микроорганизмами, должны рассматриваться как правило, а не исключение. Безусловно, наибольшее видовое разнообразие фитоассоциированных бактерий характерно для ризосферы и ризопланы, однако для многих микроорганизмов основной экологической нишей является внутренняя среда организма хозяина.

При колонизации бактериями организма хозяина формируются растительно-микробные системы, которые условно принято разделять на патологические и симбиотические. В действительности, границы между патологическими и симбиотическими системами достаточно размыты. Это, в частности, связано с тем, что даже самые злостные патогены при определенных условиях не приводят к серьезным патологическим процессам и/или гибели растений, а наоборот, приносят пользу своему хозяину. Например, вирусные инфекции у растений могут быть сопряжены с индукцией синтеза летучих соединений, отпугивающих насекомых фитофагов (Ozawa *et al.*, 2000; Wu, Baldwin, 2010). Многие фитопатогенные бактерии индуцируют системную устойчивость у хозяина, защищающую макроорганизм от последующих инфекций, вызываемых более вредоносными паразитами. Вследствие этого был предложен термин «условно выгодные патогены» «*conditionally beneficial pathogens*» (Partida-Martínez, Neil, 2011).

Даже те патогены, которые вызывают типичные инфекции и приводят к гибели растения, могут оказаться полезными для популяции растений в

целом, выступая в качестве фактора естественного отбора. Кроме того, летальные патогены могут регулировать численность популяции хозяина, препятствуя значительному доминированию одного или нескольких видов, обеспечивая, таким образом, биоразнообразие экосистем (Чикин, 2001).

В то же время, типичные симбионты могут наносить вред своим хозяевам. Например, клубеньковые бактерии, фиксирующие азот, могут привлекать личинок долгоносиков, поражающих корневую систему растений, что негативно сказывается на росте и развитии растений (Johnson *et al.*, 2005). Ризобии также влияют на структуру и состав сообщества фитофагов и хищных насекомых, что может сказываться (как позитивно, так и негативно) на растениях (Katayama *et al.*, 2011). Есть и «промежуточная группа» микроорганизмов, которых можно отнести как к патогенам, так и к симбионтам растений. Диазотрофные бактерии родов *Herbaspirillum* и *Azoarcus* обеспечивают хозяина азотным питанием, но в то же время являются причиной пестро-полосной болезни (*mottled-stripe disease*) злаковых (Hurek *et al.*, 1994; James *et al.*, 1997).

Фактически, тип растительно-микробной системы (патологическая или симбиотическая) определяется широким набором биотических и абиотических факторов. Независимо от того, является ли микроорганизм патогеном, или типичным симбионтом, его существование в растении сопряжено с потреблением ресурсов хозяина. Это является той «платой», которую растение вносит за формирование растительно-микробной системы. В результате этого растение может получать (либо не получать) «прямую выгоду», связанную, например, с усилением азотного питания, и/или «экологическую выгоду», которая, например, выражается в повышении устойчивости к фитофагам. Альтернативой экологической выгоде могут выступать «экологические затраты», связанные с возможным повышением восприимчивости растений к биотическим и абиотическим стрессорам вследствие колонизации микроорганизмами. Поэтому, тип взаимодействия определяется разностью между суммой прямой и экологической выгод и

суммой прямой и экологической затрат («*direct benefits + ecological benefits – direct costs – ecological costs = Outcome*») (Partida-Martínez, Heil, 2011).

Наглядным примером этого служит бобово-ризобийный симбиоз. В рамках этой классической симбиотической системы микроорганизмы, потребляя продукты фотосинтеза, фиксируют атмосферный азот, обеспечивая хозяина дополнительным питанием. Однако в случае, когда содержание азота в почве достаточно для роста и развития растений, отток ассимилятов к клубеньку прекращается, либо формирования симбиотической системы вовсе не происходит (Partida-Martínez, Heil, 2011).

Несмотря на отсутствие строгих критериев, однозначно разделяющих симбиотические и патологические системы, все же эти два понятия обычно дифференцируют. В терминах инфекционной патологии, патологическая система – это функциональная совокупность реакций отдельных клеток, тканей, органов, систем или организма в целом, возникающая в результате воздействия на организм патогенного фактора, характеризующаяся длительной самоподдерживающейся активностью и депрессией саногенетических механизмов, имеющая в своей основе нарушение информационного процесса и ведущая (в случае длительного существования и прогрессирования) к углублению нарушения равновесия больного организма с окружающей средой (Фролов и др., 1999). Однако это общее определение не учитывает некоторых аспектов, характерных для патосистем, состоящих более чем из одного организма, в том числе и растительно-микробных. Во-первых, в растительно-микробных патосистемах в качестве патогенного фактора выступают только биотические факторы. Во-вторых, возможность формирования растительно-микробной патосистемы является результатом длительной коэволюции ее элементов (патогена и хозяина), приведшей к их генетической совместимости. В-третьих, важную роль при взаимодействии микробов и растений играет их физиологическая совместимость, которая необходима для интеграции элементов патосистемы и возможна только при наличии у партнеров механизмов для тонкой

подстройки метаболических процессов друг друга. В результате этого компоненты патосистемы в силу самого своего объединения приобретают новые свойства. Поэтому, растение в составе патосистемы это уже «другое» растение, а микроорганизмы – «другие» микроорганизмы.

С точки зрения фитопатологии, растительно-микробные патосистемы понимаются как интегрированные системы, в рамках которых происходит развитие двух организмов – растения и патогена – как единого целого. Они представляют собой устойчивые комплексы, формирующиеся в ходе коэволюции и коадаптации растения-хозяина и паразита, и являются важными компонентами экосистем, определяющими их баланс (Дьяков и др., 2001; Чикин, 2001).

Большинство растительно-микробных патосистем, существующих в природных биоценозах, достаточно стабильны. С эволюционной точки зрения длительное существование «сверхагрессивных» популяций паразитов маловероятно, поскольку быстрая гибель хозяина лишает их экологической ниши. Следовательно, у паразитов гены «сверхагрессивности» либо исчезают, либо вырабатываются механизмы для строгой регуляции их экспрессии. В то же время, в соответствии с законами естественного отбора, чрезмерно чувствительные к паразитам хозяева гибнут, не успевая дать потомства. Следовательно, из популяции хозяев исчезают гены летальной чувствительности к паразиту. В результате этого, естественные патосистемы стабилизируются на умеренном уровне (Чикин, 2001).

Формирование растительно-микробных патосистем зачастую сопряжено с развитием инфекционного процесса – комплекса реакций, возникающих в макроорганизме в результате внедрения и размножения в нем патогенных микроорганизмов и направленных на обеспечение гомеостаза и равновесия с окружающей средой (Бородулин, Тополянский, 2007). В зависимости от возбудителя, а также широкого набора внешних факторов могут развиваться разные варианты инфекционного процесса.

С точки зрения эпидемиологии, инфекции разделяют на манифестные и бессимптомные. Манифестные инфекции могут протекать типично, атипично, или хронически. Развитие типичной инфекции связано с индукцией характерных патологических процессов, вызываемых конкретным паразитом. При атипичной инфекции возбудитель может размножаться в организме хозяина, но при этом не вызывает типичных симптомов заболевания. Хроническая инфекция, обычно менее выраженная, чем типичная, как правило, бывает связана с персистенцией бактерий в организме хозяина. Состояние персистенции обусловлено индифферентностью микроорганизмов к внешним факторам, в результате чего увеличивается их резистентность, в том числе к защитным ответам хозяина. Хронические инфекции зачастую сопряжены с рецидивами, приводящими к интенсивному развитию типичных патологических процессов (Поздеев, 2002).

Среди бессимптомных инфекций различают abortивную, латентную, дремлющую инфекции и микробоносительство. В подавляющем большинстве случаев патогенные микроорганизмы, попадая в организм потенциального хозяина, распознаются его защитными системами и элиминируются. Такие процессы могут возникать при генетической несовместимости патогена и хозяина. При этом развивается abortивная инфекция, в результате которой развитие патогена быстро подавляется.

При латентных инфекциях патоген не только бессимптомно размножается внутри хозяина, но и переносится на здоровый организм, вызывая новый инфекционный цикл. Подобные состояния также известны как инаппарантные инфекции. Дремлющие инфекции обычно возникают как следствие типичных инфекций, завершающим этапом которых является установление «баланса» между патогенными организмами и защитными системами организма хозяина (Поздеев, 2002).

После перенесенного заболевания в организме хозяина возбудитель может сохраняться, но более не проявлять вирулентность до смены хозяина. Такое состояние представляет собой микробоносительство, которое может

быть острым (до 3 месяцев), затяжным (до 6 месяцев) и хроническим (более 6 месяцев).

Заболевания растений, вызываемые бактериями (бактериозы), в зависимости от локализации патогена и характера патогенеза принято разделять на четыре основные группы: паренхиматозные, сосудистые, сосудисто-паренхиматозные (генерализованные) и гиперпластические. Некроз паренхимных тканей – характерный симптом многих «бактериальных ожогов» и «мокрых гнилей». Поражение сосудистой системы может являться причиной увяданий и нарушения транспорта ассимилятов (Тарр, 1974). При генерализованных болезнях поражаются как паренхимные, так и сосудистые ткани (Дьяков и др., 2001). Гиперпластические заболевания сопряжены с нарушениями морфогенеза растений, вследствие чего возникают различные новообразования: галлы, опухоли, ведьмины метлы, бородатые корни и т.д. (Cornelis *et al.*, 2001; Escobar, Dandekar, 2003).

Особенности локализации патогена в тканях растений могут зависеть от стратегии его взаимодействия с хозяином и/или служить маркером той или иной стадии инфекции. Так, *Ralstonia solanaceum*, которая является фитопатогеном широкого круга растений (более 200 видов разных семейств), колонизирует разные органы и ткани макроорганизма в зависимости от видовой принадлежности хозяина. Кроме того, локализация этого патогена в тканях может изменяться в процессе инфекции. В томатах *R. solanaceum* после проникновения в организм хозяина через корневую систему размножается в апопласте паренхимных клеток первичной коры. При достижении определенной плотности популяции патоген приобретает способность гидролизовать субериновые отложения в клетках эндодермы (пояски Каспари) и проникать в клетки центрального цилиндра (Vasse *et al.*, 1995; Vailleau *et al.*, 2006; Alvarez *et al.*, 2008).

Формирование растительно-микробной патосистемы происходит только в случае генетической и физиологической совместимости партнеров (паразита и хозяина) (Деверолл, 1980). Генетическая совместимость определяется

наличием/отсутствием большого набора определенных генов у бактерий и растений. Этими генами, во-первых, являются бактериальные гены, кодирующие факторы вирулентности, которые необходимы для взаимодействия с хозяином. К ним относятся ферменты, разрушающие полимеры растительных клеточных стенок, фитотоксины, эффекторные белки секреторной системы третьего типа, обычно выполняющие сигнальную функцию, экстраклеточные полисахариды и ряд других. Во-вторых, к этим генам принадлежат растительные гены, кодирующие защитные белки (дефензины, тионины, ферменты биосинтеза фитоалексинов и «защитных полимеров», таких как каллоза и лигнин). В-третьих, на совместимость патогена и хозяина влияют гены, кодирующие компоненты и бактериальных, и растительных сигнальных каскадов, участвующих в распознавании партнера и координирующих ответные реакции. В-четвертых, одними из важнейших компонентов растительно-микробного взаимодействия следует назвать гены авирулентности у бактерий и соответствующие им гены устойчивости у растений. Согласно теории Флора «ген на ген», к несовместимости партнеров приводит наличие гена авирулентности (Avr) у микроорганизма и гена устойчивости, кодирующего рецептор продукта гена авирулентности, у растения. В случае, когда или Avr-, или R-компонент отсутствуют, либо нарушено их функционирование вследствие, например, блокировки сайтов распознавания, патоген способен развиваться в тканях хозяина. В противном случае, происходит активация защитных систем хозяина и элиминация патогена (Дьяков и др., 2012).

Поскольку большинство процессов, определяющих особенности взаимодействия бактерий и растений, регулируется множеством факторов, существенное значение, помимо генетической (потенциальной) совместимости, имеет физиологическая совместимость патогена и хозяина. Она определяет «готовность» обоих партнеров к взаимодействию, то есть к реализации имеющегося генетического потенциала, позволяющего сформировать двухкомпонентную интегрированную систему. Например,

инокуляция растений авирулентным штаммом бактерий может приводить к подавлению процесса формирования патосистемы с совместимым патогеном. Это во многом связано с индукцией системной устойчивости у организма хозяина. И, наоборот, растения, предварительно инфицированные вирулентным патогеном, становятся более восприимчивыми к слабовирулентным патогенам или непатогенным организмам. Такое явление получило название индуцированной или приобретенной восприимчивости (Великанов и др., 1985).

Таким образом, растительно-микробные патосистемы являются неотъемлемыми компонентами естественных экосистем и одной из движущих сил, поддерживающих видовое разнообразие фитоценозов, а так же способных регулировать численность вида и протекание разных физиологических процессов у растений. Формирование патосистем происходит вследствие эволюционно выработанных механизмов, приводящих к физиологической интеграции двух организмов. Процесс формирования и развития патосистем достаточно вариабельный и может определяться множеством факторов, что обеспечивает разнообразие стратегий взаимодействия растений и фитопатогенов.

1.2. Морфофизиологическая гетерогенность микробных популяций

Большинство физиологических процессов, протекающих в высших организмах, связано с координированной работой дифференцированных клеток, составляющих различные ткани, специализирующиеся на выполнении определенных функций. Микроорганизмы так же обладают способностью к формированию различных морфофизиологических вариантов клеток. Наиболее изученным и общепризнанным примером этого является образование спор (Setlow, 2006). Однако существует большая группа неспорообразующих бактерий, которые долгое время считались неспособными к формированию специализированных клеточных форм. Тем не менее, даже в изогенных популяциях неспорообразующих бактерий

отдельные клетки различаются по скорости роста, респираторной активности, стрессоустойчивости, компетентности к различным сигналам (Lidstrom, Конопка, 2010). В природных популяциях, морфофизиологическое разнообразие микроорганизмов существенно богаче, чем в лабораторных культурах *in vitro*. Это позволяет рассматривать популяцию микробов как совокупность разнородных субпопуляций, объединенных друг с другом физиологически и функционально (Baulina, 2008).

При относительно стабильных внешних условиях основные свойства популяции определяются доминирующей субпопуляцией (доминирующими субпопуляциями). Минорные при этом не вносят существенного вклада в физиологические показатели популяции в целом. Однако изменение внешних условий может привести к доминированию исходно минорной субпопуляции (субпопуляций), если она оказывается наиболее приспособленной к новым условиям (Booth, 2002; Aertsen, Michiels, 2005; Kussell, Leibler, 2005; den Besten *et al.*, 2007; Ingham *et al.*, 2008). Такая мобильность морфофизиологической структуры популяции позволяет бактериям при необходимости менять стратегию «поведения» и гибко адаптироваться к меняющимся условиям окружающей среды (Balaban *et al.*, 2004; Strovas *et al.*, 2007). При этом эффективность освоения бактериями различных экологических ниш значительно повышается. В стрессовых условиях адаптивный резерв, скрытый в минорных субпопуляциях, увеличивает вероятность выживания некоторой части популяции до прекращения действия неблагоприятного фактора.

Считается, что потенциал бактерий, связанный со способностью формирования альтернативных клеточных фенотипов, в наибольшей степени реализуется при неблагоприятных для роста условиях. Поэтому, это явление обычно исследуется с применением модельных систем, включающих те или иные стрессовые воздействия. Одним из аспектов ответа клеток на стрессовые факторы является изменение их морфологии, которое может затрагивать модификацию ультраструктуры как цитоплазмы, так и клеточной оболочки

(Marden *et al.*, 1985; Booth, 2002; Brauer *et al.*, 2006). Клеточная оболочка при этом может уплотняться, утолщаться, в ее структуре может возникать слоистость, а объем периплазматического пространства может существенно увеличиваться. Между наружной и цитоплазматической мембранами могут возникать зоны адгезии мембран, необходимые для экспорта различных метаболитов и активного взаимодействия протопласта с окружающей средой (Lopez, Webster, 1985; Joseleau-Petit *et al.*, 1994; Lee, Schneewind, 2001; Petrova *et al.*, 2014). Кроме того, в некоторых случаях клеточная оболочка может полностью или частично деградировать (Novitsky, Morita, 1976; Reeve *et al.*, 1984; Raivio, 2005; Jordan *et al.*, 2008; Asad, Opal, 2008).

Цитоплазма при изменении морфологии клеток может приобретать гетерогенную или комковатую текстуру вследствие агрегации цитоплазматических белков. Расположение цитоплазмы может быть поляризовано в клеточном объеме. Зачастую происходит компактизация нуклеоида и деградация рибосом (Manas, Mackey, 2004); появляются различные включения, среди которых могут быть полифосфаты (Seufferheld *et al.*, 2008), полиэфиры (Sudesh *et al.*, 2000), глобулы, обеспечивающие стабильность клеток при замораживании-оттаивании (Soina *et al.*, 2004).

Некоторые морфофизиологические формы бактериальных клеток были систематизированы и получили определенное название, исходя из своих характеристик. К ним относятся, например, жизнеспособные, но некультивируемые формы, цистоподобные покоящиеся клетки, персистеры, L-формы. Кроме того, в бактериальных популяциях могут формироваться структурированные образования, напоминающие ткани высших организмов, названные биопленками (Stoodley, Stoodley, 2009).

Жизнеспособные, но некультивируемые формы

Одним из распространенных способов переживания микроорганизмами неблагоприятных для роста условий является запуск особой физиологической программы, приводящей к временной потере пролиферативной активности. При этом клетки не формируют колоний при высеве на стандартные

питательные среды, однако сохраняют жизнеспособность (Головлев, 1998; Oliver, 2000). Поскольку классические микробиологические приемы не позволяют детектировать такие клеточные формы, это состояние было названо «жизнеспособное, но некультивируемое».

Считается, что некультивируемые формы бактерий могут составлять резерв популяций патогенов в различных экосистемах (вода, почва, воздух) (Leo *et al.*, 2007; Su *et al.*, 2013). В таком состоянии клетки способны сохраняться достаточно долго: находясь в некультивируемом состоянии, клетки *Pseudomonas fluorescens* оставались жизнеспособными в почве в течение года (Bunker *et al.*, 2004), а клетки *Vibrio fluvialis* – в морской воде более 6 лет (Amel *et al.*, 2008).

Факторы, индуцирующие переход в некультивируемое состояние, очень разнообразны. Они включают отсутствие ростового субстрата (голодание), воздействие неоптимальных температур, повышенную или пониженную осмотичность среды, действие токсичных соединений (тяжелых металлов) (Oliver, 2010). У родококков и микобактерий некультивируемые формы образуются в стационарной фазе роста (Shleeva *et al.*, 2002). Переход патогенных микроорганизмов в некультивируемое состояние может также определяться стадией инфекционного процесса. Так, до 99% клеток фитопатогенной бактерии *Ralstonia solanacearum* становятся некультивируемыми после того, как на инфицированных растениях развиваются обширные некрозы (Grey, Steck, 2001).

Некультивируемые клетки имеют низкий уровень метаболизма (синтез макромолекул и дыхание), однако сохраняют значительный уровень АТФ, а также мембранный потенциал (Oliver, 2010). Кроме того, в некультивируемых клетках синтезируются мРНК, в том числе, соответствующие генам вирулентности (Vora *et al.*, 2005). Снижение метаболической активности, по всей вероятности, обеспечивает повышение резистентности клеток к неблагоприятным воздействиям. По сравнению с растущими клетками, некультивируемые формы более устойчивы к высокой температуре,

повышенной/пониженной осмотичности, низкому pH, холодовому и окислительному стрессу, воздействию ультразвука, этанола и различных антибиотиков (Weichart, Kjelleberg, 1996; Wong, Wang, 2004; Lleo *et al.*, 2007; Anuchin *et al.*, 2009; Nowakowska, Oliver, 2013).

Трансформация клеток в некультивируемые формы может сопровождаться изменением их ультраструктуры. Клетки в некультивируемом состоянии имеют редуцированный размер и округлую форму (Шлеева и др., 2003; Oliver, 2010; Zeng *et al.*, 2013). Существенные изменения при переходе клеток в некультивируемое состояние претерпевают клеточная стенка и плазматическая мембрана. У покоящихся форм *M. luteus* обнаружены изменения в фосфолипидном спектре, а также уменьшение общего количества липидов и белков в составе мембран по сравнению с вегетативными клетками, что, по-видимому, снижает барьер проницаемости цитоплазматической мембраны (Linder, Oliver, 1989; Mukamolova *et al.*, 1995; Day, Oliver, 2004). Изменение структуры клеточной стенки при переходе клеток в некультивируемое состояние связано с ее утолщением, а так же уплотнением пептидогликанового слоя (Kondo *et al.*, 1994; Signoretto *et al.*, 2002).

Структура и молекулярный состав цитоплазмы так же сильно отличаются у некультивируемых форм и вегетативных клеток (Trevors *et al.*, 2012). У некультивируемых форм бактерий объем цитоплазмы обычно уменьшается. Это связывают с тем, что для процессов поддержания жизнеспособности клетке необходимо меньшее число белков и других компонентов цитоплазмы, чем требуется при активном росте. Поэтому уменьшение функционального объема цитоплазмы представляется закономерной адаптивной стратегией (Trevors *et al.*, 2012). Состояние покоя связано с терминацией процесса репликации и со снижением уровня транскрипции генов, что сопряжено с «консервированием» генетической информации, которое выражается в конденсации нуклеоида (Warner, Oliver 1998; Зигангирова и др., 2003). Этот процесс во многом обеспечивается ДНК-

связывающими белками, которые приводят к суперспирализации ДНК, что затрудняет присоединение полимераз и защищает ДНК от повреждений, вызываемых окислительным стрессом (Lomovskaya *et al.*, 1994; Watson *et al.*, 1998).

Важнейшим свойством некультивируемого состояния является его обратимость. Восстановление пролиферативной активности, называемое в литературе «оживлением», может быть вызвано различными факторами в зависимости от таксономической принадлежности микроорганизма (Zeng *et al.*, 2013). Оживление может происходить в присутствии метаболитов высших организмов (Steinert *et al.*, 1997; Grey, Steck, 2001; Garcia *et al.*, 2007), при отмывке клеток в безуглеродной среде (Горшков и др., 2009), при изменении температуры (Oliver, 2010), при добавлении антиоксидантов (каталаза) (Mizunoe *et al.*, 2000) или детергентов (Tween 20) (Sun *et al.*, 2008). У микобактерий был выявлен и охарактеризован белок Rpf (resuscitation-promoting factor), индуцирующий оживление некультивируемых форм. Белок Rpf представляет собой пептидогликан гидролазу, модифицирующую бактериальную клеточную стенку, способствуя, таким образом, клеточному делению (Mukamolova *et al.*, 1998, 2002, 2006; Shleeva *et al.*, 2004).

Классические экспериментальные модели перехода бактерий в некультивируемое состояние и последующего оживления покоящихся клеток были разработаны и описаны группой Д. Оливера на примере микроорганизмов рода *Vibrio* (Nilsson *et al.*, 1991; Oliver, Bockian, 1995; Whitesides, Oliver, 1997; Warner, Oliver, 1998). При инкубации клеток в искусственной морской воде при пониженной температуре (+4°C), клетки утрачивали колониеобразующую способность и не выявлялись при высеве на питательные среды. Однако если некультивируемые клетки перед высевом выдерживали в течение нескольких часов при оптимальной температуре, то происходило их «оживление».

Обратимый переход в некультивируемое состояние был описан и у ряда фитопатогенных бактерий (Grey, Steck, 2001; Ordax *et al.*, 2009; Горшков и

др., 2009; Santander *et al.*, 2012). Влияние тяжелых металлов индуцирует переход бактерии родов *Erwinia* и *Xanthomonas* в некультивируемое состояние. При этом реверсия клеток в вегетативные формы происходит под действием хелатирующих агентов, а также гомогенатов растительных тканей (Ghezzi, Steck, 1999; Ordax *et al.*, 2006). Оживление некультивируемых клеток *Ralstonia solanacearum*, которые образуются на поздней стадии инфекционного процесса у томатов, происходит под действием корневых экссудатов растений (Grey, Steck, 2001).

Относительно вирулентности некультивируемых клеток на сегодняшний день универсальной точки зрения не сформировано. Описаны случаи, когда некультивируемые формы не вызывали развития симптомов заболевания у хозяев (Maalej *et al.*, 2004; Du *et al.*, 2007). В то же время, у некоторых видов бактерий некультивируемые клетки сохраняли вирулентность (Rahman *et al.*, 1994; Baffone *et al.*, 2003, 2006; Vora *et al.*, 2005).

Несмотря на то, что в большинстве случаев переход бактерий в некультивируемое состояние расценивается как адаптивная стратегия, существуют и другие точки зрения. Есть мнение, что некультивируемость является стадией дегенеративных изменений, предшествующих гибели микробных клеток, а процесс оживления – это всего лишь снятие фактора, лимитирующего рост (Bogosian *et al.*, 2000, 2001). Однако благоприятные для роста условия далеко не всегда являются достаточными для возобновления пролиферации некультивируемых клеток. Так, клетки *V. cholerae* оживают только после теплового шока (McDougald *et al.*, 1998). Некультивируемые клетки *Ralstonia solanacearum*, восстанавливают пролиферативную активность под влиянием метаболитов растения-хозяина (Grey, Steck, 2001). Оживление клеток *Mycobacterium* и *M. luteus*, происходит в 1000 – 100 000 раз эффективнее, если в среду культивирования добавляли супернатанты активно пролиферирующих культур (Mukamolova *et al.*, 2002; Шлеева и др., 2003).

Существует также точка зрения, что оживление какой-то части бактериальной популяции представляет собой стратегию «отправки в разведку» с целью тестирования пригодности окружающей среды для роста основной части популяции (Epstein, 2009). Вероятнее всего, роль и значимость некультивируемого состояния может различаться в зависимости от таксономической принадлежности микроорганизмов (Oliver, 2010).

Цистоподобные покоящиеся клетки

Для ряда бактерий, как неспорообразующих, так и спорообразующих, культивируемых в условиях, репрессирующих спорообразование, продемонстрировано формирование особых клеток, названных цистоподобными покоящимися (Эль-Регистан и др., 1980; Дуда и др., 1982; Лойко и др., 2011). Цистоподобные покоящиеся клетки (ЦПК) имеют особую ультраструктуру. Они содержат многослойную капсулу, многопрофильную клеточную стенку, мелко- или крупногранулированную цитоплазму и конденсированный нуклеоид (Эль-Регистан и др., 1980; Дуда и др., 1982; Сузина и др., 2004). Такие клетки имеют очень низкий, или невыявляемый уровень метаболизма. Для ЦПК характерна высокая фенотипическая вариабельность. При вхождении этих клеток в новый цикл онтогенетического развития происходит диссоциация микробной популяции, связанная с выщеплением колониально-морфологических вариантов (Эль-Регистан и др., 1980; Дуда и др., 1982; Дорошенко и др., 2001; Ильинская и др., 2002а).

Образование ЦПК регулируется аутоиндукторами анабиоза – алкилоксибензолами (АОБ) (Мулюкин и др., 1996; Эль-Регистан и др., 2006; Мулюкин и др., 2008). Эти соединения, накапливаясь в популяциях до определенного уровня, вызывают переход в стационарную фазу роста. При дальнейшем повышении их концентрации происходит образование покоящихся форм. АОБ способны взаимодействовать с различными макромолекулами и липидами. При взаимодействии аутоиндукторов анабиоза с липидами происходит поликристаллизация последних, что приводит к изменению функциональной активности мембран. АОБ также модифицируют

структуру ферментов и обеспечивают изменение их каталитических функций (Беспалов и др., 2000; Колпаков и др., 2000; Мулюкин и др., 1996). В частности, эти соединения являются ингибиторами активности гидролитических ферментов, что, по всей вероятности, предотвращает лизис клеток (Колпаков и др., 2000).

АОБ способны взаимодействовать с ДНК-связывающими белками, а также непосредственно с ДНК, изменяя ее физико-химические свойства, и влиять, таким образом, на структуру бактериального нуклеоида. Кроме того, аутоиндукторы анабиоза могут вызывать мутагенный эффект (Kozubek, Tuman 1999; Ильинская и др., 2002б; Давыдова и др., 2005; Мулюкин и др., 2005). Все это обеспечивает снижение уровня метаболизма в покоящейся клетке.

Персистеры

Еще одну группу «особых» клеток в составе бактериальных популяций представляют персистеры. Эти клетки характеризуются очень низкой скоростью деления. В обычных условиях они составляют от 0,001 до 0,1 % микробной популяции. Персистеры проявляют повышенную устойчивость к стрессовым факторам, в том числе, к воздействию антибиотиков (Lewis, 2010). При снятии стрессового фактора персистеры формируют основу для возобновления популяции (Keren *et al.*, 2004).

«Выщепление» персистеров, происходящее стохастически, сопряжено с реорганизацией физиологических процессов, но не связано с изменением первичной структуры бактериальной ДНК. При реверсии персистеров в активнопролиферирующее состояние устойчивость к антибиотикам снижается до уровня исходной популяции. Таким образом, персистеры характеризуются именно физиологической устойчивостью, не связанной с генетической изменчивостью (Shah *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2009).

Процентное соотношение персистеров и активно делящихся клеток в популяции варьирует в зависимости от стадии роста. Минимальное значение характерно для логарифмической стадии роста, в то время как в стационарной

доля персистеров увеличивается. Вероятно, что это может быть связано с повышением концентрации ряда сигналов межклеточной коммуникации, в том числе медиаторов системы кворум сенсинга. В пользу этого свидетельствует положительное влияние факторов межклеточной коммуникации и их аналогов на формирование персистеров (Möker *et al.*, 2010; Han *et al.*, 2011; Vega *et al.*, 2012).

L-формы

У грамотрицательных бактерий существуют особые клеточные формы, названные L-формами. У таких клеток полностью или частично отсутствует клеточная стенка, в зависимости от чего они подразделяются на протопласты и сферопласты, соответственно. Эти формы могут возникать спонтанно, или индуцированно (под действием антибиотиков, ферментов, аминокислот и других факторов). L-формы могут быть нестабильными и стабильными; первые, в отличие от вторых, способны ревертировать в обычные вегетативные формы с клеточной стенкой (Strang *et al.*, 1991).

L-формы достаточно полиморфны: шаровидные, нитевидные или бесструктурные. Их размер может сильно варьировать (от 0,2 до 50 мкм). В отличие от вегетативных клеток, L-формы могут содержать крупные вакуоли. Метаболическая активность L-форм достаточно низкая (Casadesu's, 2007).

Образование L-форм рассматривается как способ переживания неблагоприятных условий, в том числе в организме хозяина. Утрата клеточной стенки влечет за собой исчезновение ряда антигенов и снижение иммуногенности, что может быть рассмотрено как эффективный способ избегания защитных ответов макроорганизма. Действительно, L-формы способны длительно персистировать в организме хозяина при латентных инфекциях (Allan *et al.*, 2009).

У патогенных бактерий ключевые факторы вирулентности секретируются из клеток через различные транспортные системы, пронизывающие клеточную стенку. Поэтому, сильная модификация оболочки (или полное ее отсутствие) у L-форм, как правило, влечет за собой нарушение

транспорта и продукции детерминант патогенности, что негативно сказывается на их вирулентности. Восстановление вирулентности происходит при реверсии в родительскую форму (Neimark, 1986). Так, в отличие от вегетативных клеток, L-формы *Pseudomonas syringae* не стимулируют реакцию гиперчувствительности у растений табака и не вызывают симптомы заболевания у растений фасоли. Тем не менее, развитие заболевания может происходить и в случае образования L-форм: при инфекции, вызванной бактериями рода *Erwinia*, в клубнях картофеля обнаруживали как вегетативные клетки, так и L-формы (Webb, Wood, 1974). Кроме того, показано, что L-формы могут вызывать системную устойчивость у растений (Amijee *et al.*, 1992).

Бактериальные биопленки

Существование бактерий в природе в форме «планктонных культур» считается скорее исключением, а не закономерностью. Обычно, микробные популяции формируют сложные трехмерные структуры: агрегаты, микроколонии и биопленки. В рамках таких структур микробная популяция отчасти напоминает ткани высших организмов: отдельные клетки при этом могут морфологически и/или физиологически дифференцироваться и формировать сложную систему вследствие образования общего внеклеточного матрикса (Sutherland, 2001). Он стабилизирует трехмерную структуру биопленки и формирует для клеток барьер, защищающий их от неблагоприятных факторов (высыхания, изменения pH, неоптимальной осмотичности среды, а так же защитных реакций организма и медицинских препаратов) (Flemming, 1993; Gilbert *et al.*, 2007).

Основными компонентами матрикса биопленок являются экстраклеточные полисахариды; но наряду с ними в его состав также входят белки, липиды и ДНК (Branda *et al.*, 2005). Биопленки часто пронизаны каналами, образующими сложную проводящую систему, по которой циркулируют водные растворы, обеспечивая возможность взаимодействия клеток с окружающей средой (приток питательного субстрата, отток

экстраклеточных метаболитов (ферментов, токсинов) и т.д. (Costerton, 1995; Stanley, Lazazzera, 2004).

Начальной стадией формирования биопленок чаще всего является прикрепление клеток к твердому субстрату с помощью пилей, либо мембраносвязанных или внеклеточных метаболитов (полисахаридов, белков). После этого происходит размножение клеток и формирование экстраклеточного матрикса. Образование биопленок обычно происходит на границе раздела фаз (вода/воздух) (Stoodley *et al.*, 1997, 1998; Branda *et al.*, 2005). На поздних этапах развития биопленок часть клеток может диспергировать (отделяться) и колонизировать новые микронизи (Rinaudi, Giordano, 2010).

Формирование биопленок является важным аспектом взаимодействия многих патогенных и симбиотических бактерий с высшими организмами (Danhorn, Fuqua, 2007). Это связано с несколькими причинами. Во-первых, в составе биопленки увеличивается резистентность клеток. Во-вторых, в биопленке создается высокая плотность бактериальной популяции, которая необходима для массивной и координированной продукции факторов вирулентности.

У фитопатогенов формирование биопленок обычно приурочено к колонизации ксилемных сосудов или покровов растения-хозяина. Адгезию клеток к клеточным стенкам хозяина обеспечивают бактериальные экстраклеточные полисахариды, описанные, например, у патогена кукурузы *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* (стевартан) (Koutsoudis *et al.*, 2006) и у вызывающей «бактериальный ожог» розоцветных *Erwinia amylovora* (амиловоран, леван) (Bogs *et al.*, 1998; Koczan *et al.*, 2009). Мутантные формы этих бактерий по генам ферментов биосинтеза экзополисахаридов не способны колонизировать ксилемные сосуды, что сказывается на их вирулентности.

Формирование биопленки в ксилемном сосуде может в значительной степени нарушать водный транспорт и приводить к увяданию растений.

Бактериальный вилт является типичным симптомом, вызываемым целым рядом фитопатогенов, основной стратегией взаимодействия которых с растениями является интенсивная колонизация сосудистой системы. Однако нарушение транспирационного тока может являться негативным фактором не только для самого растения, но и для некоторых патогенов, неспособных колонизировать какие-либо клетки растений, помимо зрелых ксилемных сосудов. Для таких бактерий (*xylem-limited bacteria*), к которым относится патоген винограда и цитрусовых *Xylella fastidiosa*, ток жидкости по сосудам обеспечивает поступление ростового субстрата. Поэтому интенсивное развитие биопленок в сосудах может лишить микроорганизмы источника питания. Исходя из особенностей жизненного цикла ксилеллы, у этой бактерии принцип регуляции продукции экзополисахаридов отличается от такового у большинства других бактерий.

Обычно синтез экзополисахаридов, как и многих других факторов вирулентности, осуществляется при достижении высокой плотности популяции и регулируется при участии кворум-сенсорной системы. Благодаря этому, при низкой плотности популяции, недостаточной для эффективной атаки организма хозяина, продукция факторов вирулентности подавляется. Когда концентрация бактериальных клеток достигает некоего порогового уровня, экспрессия генов вирулентности активируется (Miller, Bassler, 2001; Waters, Bassler, 2005; Antunes *et al.*, 2010). В случае с ксилеллой, наоборот, система кворум сенсинга является негативным регулятором продукции экзополисахаридов. Это позволяет микроорганизмам сдерживать чрезмерное разрастание биопленок в ксилемных сосудах и препятствовать блокировке водного транспорта в организме хозяина, поддерживая, таким образом, постоянный приток питательного субстрата (Leite *et al.*, 2004).

Таким образом, микробная популяция представляет собой динамично развивающуюся систему, в которой может происходить формирование специализированных клеточных фенотипов. Дифференцировка бактериальных клеток регулируется экзогенными факторами и эндогенными

регуляторами и служит важной составляющей адаптивного потенциала микробной популяции. Особый интерес представляет исследование процесса диссоциации микробной популяции в растительных организмах, поскольку их внутренняя среда дифференцирована на различные типы клеток и тканей, условия в которых значительно различаются. Поэтому организм хозяина формирует очень неоднородную среду для микроорганизмов, что может являться одной из движущих сил, запускающих процессы бактериальной цитодифференцировки.

1.3. Роль систем гормональной регуляции растений в формировании растительно-микробных патосистем

Процесс формирования растительно-микробных патосистем включает ряд закономерных физиологических процессов, приводящих к «преобразованию» организма хозяина. Существенная роль в этом преобразовании отведена гормональным системам растения. Модуляция тех или иных гормональных систем при этом может либо отражать защитный ответ растения, либо быть результатом манипулирования микроорганизмами «поведением» хозяина. Кроме того, поскольку все системы гормональной регуляции функционируют в рамках единой сигнальной сети, изменения в работе отдельно взятой гормональной системы могут отражаться на функционировании других как «вторичные эффекты» (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2007; Bari, Jones, 2009).

Принято считать, что развитие патологической системы происходит в том случае, когда факторы авирулентности патогенов (например, Avr-белки) не распознаются соответствующими R-белками растения-хозяина, и защитный ответ либо не активируется, либо активируется слишком поздно, для того чтобы препятствовать активному размножению патогенного организма (Дьяков и др., 2001; Agrios, 2005). Однако полное «молчание» защитных систем растений при инвазии патогенных организмов приводит к невозможности формирования патологической системы. Это связано с тем,

что успешное взаимодействие бактерий и растений сопряжено с активацией особых физиологических реакций в организме хозяина, объединенных под названием реакция восприимчивости. Причем регуляторные системы, задействованные в реакциях и восприимчивости, и устойчивости, одни и те же (в первую очередь, это салицилат- и жасмонат/этилен-зависимые гормональные системы). Поэтому «отключение» защитных систем у мутантных форм растений в ряде случаев не увеличивает, а наоборот, снижает их восприимчивость к ряду патогенов по сравнению с диким типом (Aloni *et al.*, 1995; Hirsch *et al.*, 2002; O'Donnell *et al.*, 2003 а, б).

Таким образом, развитие патологической системы включает совокупность физиологических ответов растения, которые, с одной стороны, контролируют развитие популяции микроорганизмов *in planta*, а с другой стороны, «оптимизируют» внутреннюю среду хозяина, формируя «комфортную» экологическую нишу для эндофитов. Основными системами гормональной регуляции, участвующими в растительно-микробных взаимодействиях, считаются салицилат- и жасмонат/этилен-зависимые, которые обычно, хотя и не всегда, являются антагонистами (Kunkel, Brooks, 2002; Anderson *et al.*, 2004; Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011). Однако постоянно увеличивается количество работ, указывающих на то, что и другие гормональные системы (ауксин-, гиббереллин-, цитокинин-, абсцизовая кислота (АБК)-зависимые) играют важную роль во взаимодействии бактерий и растений.

Салициловая кислота

Салициловая кислота (СК) относится к «защитным» фитогормонам. Несмотря на то, что СК регулирует ряд физиологических процессов, не связанных напрямую с защитными реакциями (цветение, активация цианид-устойчивого дыхания и термогенез), основная ее роль связана с формированием стрессового ответа на биотические факторы (Vlot *et al.*, 2009; Медведев, Шарова, 2011).

Синтез салициловой кислоты играет ключевую роль в реакции сверхчувствительности (РСЧ) – программируемой смерти растительных клеток, позволяющей локализовать зону заражения и подавить развитие системной инфекции. При этом несколько растительных клеток распознают патогена и погибают вместе с ним, обеспечивая выживание целого организма.

На начальных этапах реакции РСЧ происходит окислительный взрыв вследствие образования активных форм кислорода (АФК), которые вызывают перекисное окисление липидов, нарушение целостности мембран, инактивацию ферментов и разрушение нуклеиновых кислот. Образование большого количества перекиси водорода при РСЧ является причиной усиления синтеза СК, которая, в свою очередь, является ингибитором каталазы – фермента, расщепляющего перекись водорода. В итоге, перекись водорода, активируя синтез СК, способствует еще большему накоплению АФК и таким образом вызывает усиление РСЧ (Дьяков и др., 2001; Vlot *et al.*, 2009; Медведев, Шарова, 2011).

СК также является индуктором системной приобретенной устойчивости растений, которая является результатом повышения содержания защитных соединений, таких как фитоалексины, лигнин, хитиназа и ряд других гидролитических ферментов во всем организме. Благодаря этому растения проявляют устойчивость к повторному заражению широким рядом патогенов (грибы, бактерии, вирусы) (Дьяков и др., 2001; Тарчевский, 2002; Медведев, Шарова, 2011).

СК в растениях может синтезироваться из хоризмовой кислоты (ХК) двумя различными путями. В первом случае ХК преобразуется до фенилаланина, который с помощью фенилаланин-аммиак-лиазы превращается в коричную кислоту. Последняя затем окисляется до бензойной или кумаровой кислот, из которых синтезируется СК. Во втором случае, ХК метаболизируется до СК через изохоризмат с помощью ферментов изохоризмат-синтазы и изохоризмат-пируват-лиазы (Vlot *et al.*, 2009; Медведев, Шарова, 2011).

Одним из основных компонентов пути передачи салицилат-зависимого сигнала является белок NPR1 (Dong, 2004). В отсутствии СК, NPR1 локализован в цитоплазме, где он формирует мультимеры. Увеличение содержания СК приводит к изменению редокс-статуса клетки (Mou *et al.*, 2003), что ведет к переходу NPR1 белков в восстановленное состояние, диссоциации NPR1 комплекса и миграции NPR1 мономеров в ядро. В ядре NPR1 связывается с транскрипционными факторами, что активирует экспрессию салицилат-индуцируемых генов (Dong, 2004).

Недавно были идентифицированы рецепторы салициловой кислоты – белки NPR3 и NPR4 (Fu *et al.*, 2012). Они служат адаптерами между NPR1 и убиквитин-лигазным комплексом (CUL3), а также напрямую связывают СК. NPR3 обладает меньшей аффинностью к СК, чем NPR4, что имеет важное значение для функционирования СК-зависимой регуляторной системы. СК контролирует формирование комплексов NPR1/NPR3 и NPR1/NPR4 и таким образом регулирует стабильность и активность NPR1. При связывании с СК NPR4 теряет способность обеспечивать деградацию NPR1, а NPR3 – наоборот, приобретает (Fu *et al.*, 2012).

При низкой концентрации СК NPR4 обеспечивает разрушение большей части NPR1 в результате CUL3^{NPR4}-зависимой деградации. Эта деградация важна для того, чтобы предотвратить активацию защитных реакций в норме. При этом базовый уровень СК способствует диссоциации части NPR1/NPR4-комплексов, что поддерживает в клетке определенный уровень NPR1, необходимый для нормального функционирования растительного организма (Wildermuth *et al.*, 2001; Nawrath *et al.*, 2002).

Локальное и системное увеличение уровня СК в растении (например, при атаке патогенов) формирует ее концентрационный градиент (Enyedi *et al.*, 1992; Meier *et al.*, 1993). Наиболее высокий уровень СК характерен для места инфицирования, где проявляется РСЧ (Torres *et al.*, 2005; Lu, 2009). В области РСЧ, из-за высокой концентрации СК, прекращается разрушение NPR1 CUL3^{NPR4}-зависимым способом. Однако взаимодействие NPR3 с СК в зоне

PCЧ активирует $CUL3^{NPR3}$ -зависимую деградацию NPR1. Таким образом, два рецептора СК регулируют содержание NPR1 при разных концентрациях этого фитогормона (Fu *et al.*, 2012).

Интенсивное разрушение NPR1 в зоне инфицирования имеет важное значение, поскольку этот белок подавляет развитие PCЧ (Rate, Greenberg, 2001). В области, граничащей с зоной PCЧ, меньший уровень СК лимитирует взаимодействие NPR1 и NPR3, позволяя NPR1 накапливаться в этой зоне. Это, с одной стороны, локализует зону PCЧ, а с другой стороны, активирует NPR1-зависимую передачу салицилатного сигнала, что индуцирует системную приобретенную устойчивость. Таким образом, система передачи салицилатного сигнала организована так, чтобы обеспечить протекание очень разноплановых СК-зависимых процессов.

Важнейшая роль СК в защитном ответе растений была продемонстрирована во множестве экспериментальных работ. Многие из них основаны на анализе трансгенных растений, экспрессирующих ген *nahG*, который кодирует салицилат гидролазу – фермент, разрушающий салициловую кислоту. В таких растениях в процессе инфекции, вызванной патогенными организмами, не накапливалась СК и не развивалась системная приобретенная устойчивость. Это приводило к увеличению восприимчивости растений, как к вирулентным, так и к авирулентным патогенам (Gaffney *et al.*, 1993; Delaney *et al.*, 1994; Vernooij *et al.*, 1994; Lawton *et al.*, 1995). При блокировке экспрессии гена, кодирующего фенилаланин-аммиак-лиазу (один из ферментов биосинтеза СК), растения также проявляли большую восприимчивость по сравнению с диким типом и не были способны активировать системную приобретенную устойчивость (Pallas *et al.*, 1996; Nawrath, M'ettraux, 1999; Wildermuth *et al.*, 2001; Nawrath *et al.*, 2002). В то же время, мутанты со сверхпродукцией СК проявляли повышенную устойчивость к биотрофным патогенам (Kachroo *et al.*, 2001, 2005; Shah *et al.*, 2001; Nandi *et al.*, 2005).

Хотя салициловая кислота является ключевым сигналом защитного ответа у растений, ее участие в растительно-микробном взаимодействии может быть сложным и неоднозначным. Высокий уровень СК не всегда сопряжен с повышением устойчивости растений. В некоторых случаях, наоборот, накопление СК необходимо для успешной колонизации организма хозяина патогенными организмами. Считается, что некротрофные патогены индуцируют образование СК, чтобы вызвать локальную гибель клеток хозяина, приводящую к высвобождению из них питательного субстрата (Govrin, Levine, 2000). Так, грибные патогены *Botrytis cinerea* и *Sclerotinia sclerotiorum* индуцируют в растениях окислительный взрыв и РСЧ. Причем степень их вирулентности напрямую зависела от содержания АФК в тканях хозяина. В мутантных растениях, не способных запускать РСЧ, рост этих патогенов был подавлен, а при искусственной стимуляции РСЧ активировался (Govrin, Levine, 2000).

СК необходима и для «правильного» протекания патологических процессов, вызываемых биотрофными патогенами. Патогенез, индуцируемый *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* у резуховидки, включает несколько стадий, характеризующихся различиями в симптоматике. Значительная часть инфекционного процесса сопряжена с запуском физиологических реакций, характерных для естественного старения, что принято называть «заболевание, похожее на старение» («*Disease resemble senescence*»). Морфологические проявления симптомов заболевания при этом выражаются хлорозом, за которым следует терминальная стадия инфекции, связанная с развитием некроза. Ингибирование салицилат-индуцируемых процессов у мутантных растений приводит к нетипичной симптоматике, при которой развитие хлороза не происходит, а сразу же индуцируется образование некротических пятен (O'Donnell *et al.*, 2003a).

Взаимодействие другого представителя ксантомонад – *X. campestris* pv. *vesicatoria* – со специфичным хозяином (растением томата) сопряжено с увеличением уровня СК в растениях, что, однако, не сдерживает развитие

патогена *in planta*. У мутантных растений со сниженным содержанием СК симптомы заболевания не формируются, однако экзогенное внесение салицилата восстанавливает характерную для дикого типа симптоматику (O'Donnell *et al.*, 2001). При этом СК не влияет на ростовую активность патогена, а только обеспечивает проявление симптомов заболевания. Это свидетельствует о том, что СК может являться не только индуктором защитных реакций, но и важным компонентом восприимчивого ответа растений (O'Donnell *et al.*, 2001).

У мутантных форм резуховидки *acd5*, вследствие повышенного содержания СК в большей степени выражена РСЧ, а также конститутивно высокий уровень экспрессии СК-индуцируемых генов. Несмотря на это мутантные растения более восприимчивы к *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, чем растения дикого типа. Это указывает на то, что повышенное содержание СК, выраженная РСЧ и активация СК-зависимого защитного ответа не всегда связаны с устойчивостью растений к патогенам (Greenberg *et al.*, 2000).

Таким образом, СК регулирует множество аспектов, детерминирующих особенности взаимодействия растений и микроорганизмов. Ее роль может быть связана как с активацией защитных систем растений, приводящей к элиминации патогенного организма, так и с кондиционированием внутренней среды хозяина, что благоприятствует формированию патосистемы.

Жасмоновая кислота и этилен

При исследовании растительно-микробных систем жасмоновая кислота (ЖК) и этилен, как правило, рассматриваются как «партнеры», которые синергично регулируют целый ряд патоген-индуцируемых процессов у растения-хозяина (Xu *et al.*, 1994; Pieterse *et al.*, 1998; Penninckx *et al.*, 1998; Thomma *et al.*, 2001; Glazebrook, 2005). С помощью транскриптомных анализов было выявлено, что регулоны ЖК и этилена значительно перекрываются (Schenk *et al.*, 2000). В частности, экспрессия гена ERF1 – этилен-чувствительного фактора транскрипции, активируется ЖК (Memelink, 2009). Тем не менее, спектры физиологических процессов, контролируемых

ЖК и этиленом, не связанных с растительно-микробными взаимодействиями, существенно различаются.

Функции этилена связаны с регуляцией процессов созревания плодов, прорастания семян, старения тканей, опадения плодов и листьев, подавления роста клеток растяжением, развития цветков, образования корневых волосков. Этилен участвует в ответных реакциях растительных организмов на различные стрессовые факторы: колебание температуры, пониженное содержание кислорода, засуха, механическое повреждение (Полевой, 1989; Медведев, Шарова, 2011).

У семенных растений этилен синтезируется из аминокислоты метионина (АМК), которая, в свою очередь, образуется из метионина. Рецепторы этилена представлены несколькими белками: ETR1, ETR2, EIN4, ERS1, ERS2. В отсутствие этилена его рецепторы подавляют процессы, контролируемые этим гормоном. Непосредственное участие в этом принимает белок CTR1, который является компонентом MAP-киназного модуля и блокирует его работу. В отсутствие этилена его рецепторы функционируют как гистидинкиназы и фосфорилируют CTR1. Это приводит к репрессии MAP-киназного каскада и блокирует передачу этиленового сигнала. При повышении концентрации этилена происходит инактивация рецептора(ов) и CTR1, что приводит к активации MAP-киназного каскада. На следующем этапе передачи сигнала активируется белок EIN2, в результате чего происходит димеризация фактора транскрипции EIN3, который, в свою очередь, связывается с промоторной областью генов первичного ответа на этилен, в том числе и ERF1 – этилен-зависимого фактора транскрипции, активирующего экспрессию генов вторичного ответа (Медведев, Шарова, 2011).

ЖК в растениях контролирует деление и растяжение клеток, созревание плодов, рост корня, тигмоморфогенез усиков, процессы старения, прорастание семян, развитие пыльцы, участвует в регуляции формирования

клубней и определяет устойчивость к насекомым-фитофагам и поранению (Creelman, Mullet, 1997; Wasternack *et al.*, 2006; Reinbothe *et al.*, 2009).

Жасмонаты относятся к обширному классу соединений – оксилипинам – физиологически активным продуктам перекисного окисления жирных кислот. В растениях они синтезируются в результате окисления линоленовой кислоты при участии липоксигеназ. Образующиеся при этом продукты – гидроперекиси жирных кислот – через каскад реакций, катализируемых алленоксидсинтазами и алленоксидциклазами, преобразуются до жасмоновой кислоты (ЖК) (Creelman, Mullet, 1995, 1997; Wasternack, 2007).

Регуляция экспрессии жасмонат-индуцируемых генов основана на убиквитин-зависимой деградации JAZ белков. Эти белки взаимодействуют с фактором транскрипции MYC2 и таким образом блокируют экспрессию целевых генов (Memelink, 2009). При высокой концентрации жасмонаты взаимодействуют с белком COI1, который является компонентом E3 убиквитин-лигазного комплекса, что приводит к его взаимодействию с JAZ белками, протеолизу последних и активации экспрессии ЖК-индуцируемых генов (Chung, Howe, 2009; Chung *et al.*, 2010).

В основу передачи ЖК-сингала заложены принципы и позитивной, и негативной обратной связи. С одной стороны, ЖК активирует экспрессию генов, кодирующих ферменты ее собственного биосинтеза (Pieterse *et al.*, 2012). С другой стороны, к ЖК-индуцируемым генам принадлежат гены JAZ белков – негативных регуляторов передачи ЖК-сигнала (Shoji *et al.*, 2008; Memelink, 2009; Soitamo *et al.*, 2012). По всей вероятности, сочетание принципов позитивной и негативной обратной связи обеспечивает возможность тонкой регуляции как продукции этого фитогормона, так и передачу его сигнала.

Наиболее известным примером согласованности этилен- и ЖК-зависимого ответов является активация совокупности неспецифических реакций, объединенные под названием индуцированной системной устойчивости. В отличие от системной приобретенной устойчивости,

рассмотренной выше и регулируемой в первую очередь СК, индуцируемая системная устойчивость, активируемая при участии ЖК и этилена, характеризуется иным набором реакций (Farmer, Ryan, 1992; Pieterse *et al.*, 1998; Penninckx *et al.*, 1998; Pieterse *et al.*, 2000). Такой тип устойчивости не связан с формированием РСЧ, а сопряжен с активацией биосинтеза разнообразных защитных соединений, среди которых антимикробные белки дефензины и тионины, ингибиторы протеиназ, ферменты биосинтеза вторичных соединений (алкалоидов, фитоалексинов), белки, формирующие механические барьеры в клеточной стенке на пути инфекционных агентов (гидроксипролин-богатые белки) (Дьяков и др., 2001; Agrios, 2005; Медведев, Шарова, 2011).

Активаторами индуцируемой системной устойчивости, как правило, являются «универсальные» молекулы, характерные для большинства патогенов: фрагменты флагеллина, хитина, липополисахариды, или эндогенные элиситоры. Поэтому такой тип устойчивости считается неспецифичным. Индуцируемая системная устойчивость может формироваться под влиянием не только патогенов, но непатогенных ризобактерий, что снижает восприимчивость растений к агрессивным патогенам (Pieterse *et al.*, 2001). В то же время, системная приобретенная устойчивость обычно индуцируется эффекторными белками патогенов, в частности, транспортируемыми с помощью системы секреции третьего типа и считается более специфичной (Pieterse *et al.*, 2012).

Роль и ЖК, и этилена в индукции защитных реакций растений была неоднократно подтверждена и не вызывает сомнений. Мутанты резуховидки, характеризующиеся конститутивно активированным состоянием ЖК- и этилен-зависимых путей, проявляли большую устойчивость к возбудителю мучнистой росы (Ellis, Turner, 2001; Ellis, *et al.*, 2002). Блокировка передачи ЖК/этилен-зависимого сигнала, наоборот, делала растения более восприимчивыми.

Обработка растений риса ЖК или сверхэкспрессия гена алленоксидсинтазы индуцировали устойчивость растений к патогенному грибу *Magnaporthe grisea* (Mei *et al.*, 2006). Сверхэкспрессия гена липоксигеназы в растениях томата, приводящая к повышению уровня ЖК, увеличивала устойчивость растений к *Cladosporium fulvum* (Hu *et al.*, 2013).

Формирование защитного ответа часто сопряжено с увеличением продукции этилена, который регулирует такие процессы как синтез фитоалексинов и антимикробных PR белков, а также биосинтез лигнина (Knoester *et al.*, 1998; Adie *et al.*, 2007a). Этилен обеспечивает формирование в ксилемных сосудах гелей, основными компонентами которых являются полисахариды клеточной стенки (VanderMolen *et al.*, 1983, 1986; Perez-Donoso *et al.*, 2007). Подобное желирование ксилемного сока может служить защитным механизмом, благодаря которому формируется барьер, препятствующий системному распространению инфекционных агентов по растению через сосудистую систему. В то же время, нарушение транспорта воды вследствие этого может увеличить восприимчивость растений, а также облегчить колонизацию ксилемных сосудов микроорганизмами из-за изменения реологических свойств ксилемного сока и увеличения концентрации в нем питательного субстрата.

Помимо защитных реакций, и этилен, и ЖК могут являться индукторами восприимчивости растений. Патогенез, индуцируемый рядом микроорганизмов, связан с активацией физиологических реакций, сопряженных с процессами естественного старения. Запуск подобных реакций не происходил при инфицировании мутантных растений, нечувствительных либо к ЖК, либо к этилену (Bent *et al.*, 1992; Knoester *et al.*, 1998; Lund *et al.*, 1998; Thatcher *et al.*, 2009). При этом в жасмонат-нечувствительных мутантах, помимо отсутствия симптомов заболевания, сильно подавлялся рост некротрофного гриба *Fusarium oxysporum* (Thatcher *et al.*, 2009). Это было объяснено тем, что патоген не имел возможности индуцировать реакции старения через жасмонат-зависимую систему у

мутантных растений. В результате этого отсутствие детерминированной последовательности патоген-индуцируемых реакций, по всей видимости, привело к невозможности «правильного» преобразования внутренней среды хозяина, необходимого для развития патологической системы (Thatcher *et al.*, 2009).

ЖК/этилен-зависимые процессы в основном считаются эффективными способами защиты от некротрофных патогенов, в то время как СК определяет устойчивость к биотрофам (Тарчевский, 2002; Truman *et al.*, 2006; Robert-Seilanianz, *et al.*, 2007; Bari, Jones, 2009). Эти два пути (ЖК/этилен- и СК-зависимый) – альтернативные и в большинстве случаев являются антагонистами. Так, ЖК-нечувствительные мутанты имеют повышенный уровень СК, что сопряжено с повышением устойчивости к биотрофным патогенам (Kloek *et al.*, 2001) и с увеличением восприимчивости к некротрофным (Thomma *et al.*, 1998). Это создает возможность «выбора» приоритетного способа обороны, исходя из характеристик атакующего агента (Spoel *et al.*, 2007; Grant, Jones, 2009; Pieterse *et al.*, 2012).

Антагонизм СК и ЖК/этилен-зависимых путей формирует для патогенов основу для манипулирования защитными системами хозяина. Наиболее известным примером этого является репрессия салицилат-зависимого пути при инфекции, вызванной *Pseudomonas syringae*, за счет активации ЖК пути. *P. syringae* синтезирует фитотоксин коронатин – функциональный аналог ЖК, активирующий ЖК-зависимый гормональный путь (Brooks *et al.*, 2005; Browse, 2009; Geng *et al.*, 2012; Zheng *et al.*, 2012; Pieterse *et al.*, 2012). Синтез коронатина приводит к репрессии СК-зависимых защитных реакций и к развитию заболевания. Одним из подтверждений этого является повышение устойчивости ЖК-нечувствительных мутантов к этому патогену, связанное с увеличением уровня СК в растениях (Kloek *et al.*, 2001; Laurie-Berry *et al.*, 2006; Nickstadt *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2012)

В недавних исследованиях появились первые экспериментальные данные о молекулярных механизмах подавления коронатином СК-зависимых

реакций. Оказалось, что этот фитотоксин репрессирует продукцию изохоризмат синтазы – фермента, участвующего в биосинтезе СК, и активирует ферменты катаболизма СК (Zheng *et al.*, 2012).

Антагонизм СК и ЖК/этилен-зависимых путей также определяет фактор транскрипции WRKY, который контролирует экспрессию СК-индуцируемых генов (Wang *et al.*, 2006; Eulgem, Somssich, 2007). Сверхэкспрессия соответствующего гена обеспечивает, помимо индукции СК-зависимых генов, репрессию ЖК-индуцируемых, что приводит к повышению устойчивости растений к биотрофным патогенам и снижению к некротрофным. Блокировка экспрессии гена WRKY, наоборот, обеспечивает репрессию СК-индуцируемых генов и активацию ЖК-индуцируемых, а также большую устойчивость к некротрофам (Li *et al.*, 2004, 2006). Это означает, что WRKY является позитивным регулятором экспрессии СК-индуцируемых генов и негативным ЖК/этилен-индуцируемых и участвует в определении баланса между двумя гормональными путями.

Кроме того, митоген-активируемая протеин киназа4 (MAP4) регулирует антагонистические взаимоотношения между СК- и ЖК/этилен-путями. Мутанты по гену MAP4 имеют повышенный уровень СК и приобретают устойчивость к биотрофным псевдомонадам, а экспрессия ЖК-индуцируемых генов у таких мутантных форм ниже, чем у дикого типа, что негативно сказывается на устойчивости к некротрофной *Alternaria brassicicola* (Petersen *et al.*, 2000; Brodersen *et al.*, 2006). NPR1 – компонент передачи салицилатного сигнала, также участвует в СК-ЖК «кросс-токе». В присутствии СК этот белок переходит в восстановленное состояние и в таком состоянии он блокирует передачу ЖК-сигнала (Spoel *et al.*, 2003; Dong, 2004).

Несмотря на то, что согласно традиционной точке зрения, передача ЖК/этилен- и СК-сигнала являются антагонистическими процессами, взаимодействие этих гормональных систем в действительности проходит по более сложному сценарию, чем просто взаимная репрессия. При определенных концентрациях гормонов ЖК/этилен- и СК-зависимый пути

могут взаимодействовать и агонистически (Mur *et al.*, 2006; Koornneef, Pieterse, 2008; Gutjahr, Paszkowski, 2009). Кроме того, в процессе патогенеза могут меняться приоритеты при выборе стратегии ответных реакций, и реакции, характерные для системной приобретенной устойчивости и индуцируемой системной устойчивости, не взаимно исключают друг друга, а запускаются последовательно (van Wees *et al.*, 2000). Это, вероятно, связано с чередованием биотрофной и некротрофной стадий жизненного цикла у ряда патогенов, что способствует включению разных защитных систем на разных этапах взаимодействия с микроорганизмом (Glazebrook, 2005; Robert-Seilanianz *et al.*, 2007; López *et al.*, 2008; Spoel, Dong, 2008).

Таким образом, роль ЖК и этилена в растительно-микробных взаимодействиях является многоплановой. Эти фитогормоны координируют множество физиологических процессов, определяющих либо устойчивость, либо восприимчивость растений к инфекционным заболеваниям.

Ауксины

Ауксины (индолил-3-уксусная кислота (ИУК) и ее аналоги) в растениях активируют деление и растяжение клеток, ростовые движения (настии, тропизмы), определяют апикальное доминирование, регулируют процесс дифференцировки тканей в ходе онто- и морфогенеза, стимулируют корнеобразование и формирование плодов, обладают аттрагирующим свойством (Медведев, Шарова, 2011).

Ауксины играют важную роль не только в регуляции роста и развития растений, но и при взаимодействии растений и микробов. Наиболее известные примеры, демонстрирующие существенное значение ауксин-зависимых процессов при формировании растительно-микробных систем, связаны с микроорганизмами, способными синтезировать эти фитогормоны и, таким образом, влиять на физиологические процессы организма хозяина. К этим микроорганизмам, в первую очередь, относятся бактерии, индуцирующие гипертрофию клеток и тканей растения, что служит причиной появления опухолей или галлов: *Agrobacterium tumefaciens* (Escobar, Dandekar, 2003), *P.*

syringae pv. *savastanoi* (Bari, Jones, 2009), *Erwinia herbicola* pv. *gypsophilae* (Robert-Seilantantz *et al.*, 2011), *Rhodococcus fascians* (Benjamins, Scheres, 2008). Однако другие бактерии (*Erwinia chrysanthemi*, *P. syringae* и *R. solonacearum*), несмотря на способность синтезировать ауксин, не вызывают «разрастание» тканей растений (Beaudoin *et al.*, 2000; Berrocal-Lobo *et al.*, 2004; Canet *et al.*, 2010). Мутации в генах, кодирующих ферменты биосинтеза ауксинов, у ИУК-продуцирующих микроорганизмов влияют на рост бактерий *in planta* и приводят к изменению характера инфекционного процесса у хозяина (Beaudoin *et al.*, 2000).

Инфекция, вызываемая *P. syringae*, сопряжена с увеличением содержания ИУК, с индукцией экспрессии генов, кодирующих ферменты биосинтеза ауксина и со снижением уровня экспрессии гена репрессора ауксин-зависимых ответов у растения-хозяина (O'Donnell *et al.*, 2003a). Ключевую роль в этих процессах играет один из факторов вирулентности *P. syringae* – эффекторный белок AvrRpt2, транспортируемый через систему секреции третьего типа (Chen *et al.*, 2007). Сходным образом функционирует эффекторный белок AvrBs3 бактерии *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, вызывая активацию экспрессии ИУК-индуцируемых генов, что приводит к гипертрофии клеток растений (Marois *et al.*, 2002). Репрессия ИУК-зависимой передачи сигнала приводит к устойчивости растений к *P. syringae*, а активация – способствует увеличению чувствительности (Navarro *et al.*, 2006).

Большая часть ауксинов в растениях содержится в неактивной конъюгированной форме. Процесс конъюгации избыточного ауксина с аминокислотами осуществляется при участии IAA-амидосинтетаз, кодируемых генами GH3 (Staswick *et al.*, 2005). Сверхэкспрессия гена GH3-8 у риса, приводящая к увеличению содержания конъюгированного ауксина и уменьшению содержания «свободного», индуцирует устойчивость растений к бактериальному ожогу, вызываемому *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Ding *et al.*, 2008). Этот микроорганизм при колонизации хозяина индуцирует у растения экспрессию генов ферментов биосинтеза ИУК и вызывает ауксин-

зависимую активацию синтеза экспансинов – белков, разрыхляющих структуру клеточной стенки растения, что способствует развитию патогенного организма *in planta*. У устойчивых мутантных по гену GH3-8 растений, вследствие низкого содержания неконъюгированной ИУК, снижается экспрессия генов экспансинов, что угнетает развитие патогена (Ding *et al.*, 2008).

В пользу негативного влияния ауксинов на устойчивость растений также свидетельствует то, что экзогенное внесение этих гормонов стимулирует развитие ряда заболеваний, вызываемых *Agrobacterium tumefaciens* (Yamada, 1993), *Pseudomonas savastanoi* (Yamada, 1993) и *P. syringae* (Navarro *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007). Таким образом, большинство из описанных на сегодняшний день примеров демонстрирует, что ауксины и/или ауксин-зависимые процессы способствуют снижению устойчивости растений к инфекционным заболеваниям, а репрессия ауксин-опосредуемых ответных реакций увеличивает устойчивость растений к биотическим стрессорам. Однако на примере ряда патосистем, включающих некротрофные грибы (*Plectosphaerella cucumerina*, *Botrytis cinerea*), показано, что активация ауксин-зависимых реакций приводит к устойчивости растений к этим патогенам. При этом сами патогены при колонизации растений способствуют снижению уровня экспрессии ауксин-зависимых генов у хозяина, делая его более восприимчивым (Llorente *et al.*, 2008). Таким образом, описанные данные свидетельствуют о том, что модуляция ауксин-зависимой гормональной системы является важной составляющей, детерминирующей характер взаимодействия патогенов и растений.

Цитокинины

Цитокинины в растениях контролируют такие процессы как деление и дифференцировка клеток, выход семян из состояния покоя, формирование зародыша, пробуждение пазушных почек при декапитации, задержка процессов старения, онтогенез пластид, формирование клубней и их выход из

состояния покоя, рост и ветвление корней. Кроме того, эти фитогормоны предотвращают распад хлорофилла, обладают аттрагирующим эффектом, то есть повышают способность клеток аккумулировать питательные вещества за счет их транспорта из других тканей, и определяют архитектуру растения (Muller, Sheen, 2007; Медведев, Шарова 2011).

Помимо растений, некоторые бактерии и грибы способны продуцировать цитокинины. В составе Ti-плазмиды *Agrobacterium tumefaciens* имеется ген *IPT*, необходимый для синтеза цитокининов. В процессе инфекции этот ген, наряду с другими, встраивается в геном хозяина, в результате чего индуцируется синтез цитокининов, активирующих процесс онкогенеза (Sakakibara *et al.*, 2006). У *Rhodococcus fascians* обнаружены гены ферментов биосинтеза цитокининов (Bari, Jones, 2009). Также показано, что этот микроорганизм в процессе инфекции влияет на метаболизм цитокининов у растений (Depuydt *et al.*, 2008). Ряд биотрофных грибов (*Cladosporium fulvum*, *Pyrenopeziza brassicae*, *Venturia inaequalis*) продуцируют цитокинины (Dörffling *et al.*, 1984; Walters, McRoberts, 2006). При инфицировании этими патогенами, в растениях индуцируются процессы деления и дифференцировки клеток хозяина. Цитокинины обнаружены в культуральных жидкостях клубеньковых бактерий рода *Rhizobium*, которые по всей вероятности, играют важную роль в индукции деления клеток коры корня в процессе формирования клубеньков (Медведев, Шарова, 2011).

Цитокинины играют важную роль в развитии «килы» – заболевания, вызываемого *Plasmodiophora brassicae* (Siemens *et al.*, 2006). При этом происходит снижение уровня экспрессии генов, кодирующих ферменты деградации цитокининов, и увеличение уровня экспрессии генов рецепторов цитокининов. Кроме того, сверхэкспрессия цитокинин оксидазы способствует устойчивости растений резуховидки к *Plasmodiophora brassicae* (Siemens *et al.*, 2006). Известно также, что цитокинины, а также ауксин подавляют реакцию сверхчувствительности (Robinette, Matthysse, 1990; Murphy *et al.*, 1997). Таким образом, цитокинины координируют не только процессы,

связанные с ростом и развитием растений, но и определяют некоторые аспекты взаимодействия растений с микроорганизмами.

Гиббереллины

Гиббереллины – фитогормоны дитерпеноидной природы, контролирующие процессы деления и растяжения клеток, цветения, диэтиоляции проростков, образования и прорастания клубней, удлинения стеблей (в том числе при затемнении), детерминации пола (Медведев, Шарова, 2011). Гиббереллины являются не только регуляторами процессов роста и развития растений, но и определяют устойчивость/восприимчивость растений к инфекционным заболеваниям. Эти фитогормоны продуцируются некоторыми бактериями и грибами и, поэтому, иногда рассматриваются как факторы, обеспечивающие взаимодействие микроорганизмов с растениями (MacMillan, 2001). Интересно, что впервые гиббереллины были обнаружены не у растений, а у фитопатогенного гриба *Gibberella fujikuroi*, вызывающего патологическое вытягивание проростков риса (Kurosawa, 1926).

Белки DELLA, участвующие в передаче гиббереллинового сигнала, влияют на функционирование жасмонат- и салицилат-зависимого путей, что сказывается на особенностях защитного ответа растений на биотические стрессовые факторы (Navarro *et al.*, 2008). У мутантов по генам DELLA после инфицирования *P. syringae* уровень экспрессии генов PR-1 и PR-2 (маркеров салицилат-зависимого пути) выше, а гена PDF1.2 (маркера жасмонат-зависимого пути) ниже по сравнению с растениями дикого типа. По всей вероятности, это определяет чувствительность DELLA-мутантов к некротрофным патогенам (*A. brassicicola* и *B. cinerea*) и устойчивость к биотрофным (*P. syringae* и *Hyaloperonospora arabidopsidis*) (Navarro *et al.*, 2008). Мутанты, у которых уровень экспрессии DELLA повышен, наоборот, более устойчивы к *A. brassicicola* и более чувствительны к *P. syringae*. Кроме того, экзогенная обработка гиббереллинами приводит к увеличению устойчивости к *P. syringae* и чувствительности к *A. brassicicola* (Navarro *et al.*, 2008).

Влияние белков DELLA на растительно-микробные взаимодействия может быть опосредовано также АФК. У мутантов резуховидки по генам этих белков происходило более выраженное повышение уровня АФК после инфицирования *Erwinia amylovora*, а экспрессия генов, кодирующих ферменты детоксикации АФК, была снижена по сравнению с растениями дикого типа (Achard *et al.*, 2006, 2008).

Гиббереллины являются также регуляторами синтеза фунгицидных соединений. У мутантных растений, характеризующихся повышенным содержанием гиббереллинов, увеличивается уровень экспрессии гена PBZ1, который кодирует белок, обладающий фунгицидными свойствами. Это повышает их устойчивость к грибному фитопатогену *Magnaporthe grisea* (Tanaka *et al.*, 2006). Все это свидетельствует о важной роли гиббереллинов в защитных реакциях против патогенов.

Абсцизовая кислота

Абсцизовая кислота (АБК) в растениях регулирует покой семян и почек, процессы ранних этапов онтогенеза (развитие семян и проростков), водный режим, движение замыкающих клеток устьиц, ростовые процессы. Основную роль АБК обычно связывают с координированием ответных реакций на абиотические стрессоры (засуха, засоление) (Wasilewska *et al.*, 2008; Медведев, Шарова, 2011). Однако в последнее время активно обсуждается участие этого фитогормона и в формировании растительно-микробных патосистем. Большинство авторов полагает, что АБК является негативным регулятором устойчивости растений к инфекционным заболеваниям (Mauch-Mani, Mauch, 2005; Mohr, Cahill, 2007; de Torres-Zabala *et al.*, 2007; Adie *et al.*, 2007).

Блокировка АБК-зависимой передачи сигнала у АБК-нечувствительных растений или у мутантов по генам биосинтеза АБК увеличивает устойчивость хозяев к ряду патогенов по сравнению с растениями дикого типа (Audenaert *et al.*, 2002; Thaler, Bostock, 2004; Achuo *et al.*, 2006; de Torres-Zabala *et al.*, 2007; Asselbergh *et al.*, 2008). Экзогенная обработка АБК, наоборот, повышает

чувствительность растений резуховидки и риса к *P. syringae* и *Magnaporthe grisea*, соответственно (Koga *et al.*, 2004; de Torres-Zabala *et al.*, 2007).

Одной из причин устойчивости АБК-дефектных фенотипов к инфекционным заболеваниям является наличие иерархии стресс-индуцируемых защитных реакций. Приоритет при этом имеют ответные реакции на абиогенные стрессоры, которые индуцируются АБК. Таким образом, при повышении концентрации этого гормона, ответные реакции на биогенные стрессоры, опосредуемые, в первую очередь, салициловой и жасмоновой кислотами, репрессируются (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2007). Для мутантов по генам ферментов биосинтеза АБК характерна сверхэкспрессия этилен/жасмонат-индуцируемых генов. Обработка растений экзогенной АБК, наоборот, репрессирует транскрипцию этих генов (Truman *et al.*, 2007; de Torres-Zabala *et al.*, 2007; Navarro *et al.*, 2008). Кроме того, увеличение содержания АБК в растениях в процессе инфекции может репрессировать салицилат-зависимый путь (de Torres Zabala *et al.*, 2007). Продемонстрировано, что АБК подавляет развитие салицилат-зависимой системной приобретенной устойчивости растений в ходе инфекции, вызванной *P. syringae*.

Еще один возможный механизм снижения устойчивости растений под влиянием АБК связан с подавлением экспрессии защитных генов хозяина, в том числе фенилаланин-аммиак-лиазы (ФАЛ) (Ward *et al.*, 1989; McDonald, Cahill, 1999; Audenaert *et al.*, 2002). Этот фермент является ключевым звеном в метаболической цепи биосинтеза фенилпропаноидов, в том числе, фитоалексинов, фитоантиципинов. Инфицирование растений сои авирулентным штаммом *Phytophthora sojae* приводило к индукции активности ФАЛ через четыре часа после инфицирования, а экзогенная АБК подавляла активность этого фермента. В то же время, инфицирование вирулентным штаммом *P. sojae* не приводило к индукции активности ФАЛ (McDonald, Cahill 1999).

Несмотря на традиционную точку зрения о негативном влиянии АБК на устойчивость растений к биотическим стрессовым факторам, в целом ряде работ показано, что обработка АБК, наоборот, определяет устойчивость растений к ряду патогенов: *P. syringae* pv. *tomato* (Melotto *et al.*, 2006), *Alternaria brassicicola* и *P. cucumerina* (Ton, Mauch-Mani, 2004), *R. solanacearum* (Hernandez-Blanco *et al.*, 2007). Мутанты, не синтезирующие АБК, оказались более чувствительными к инфекции, вызванной грибными патогенами *A. brassicicola*, *Pythium irregulare* (Adie *et al.*, 2007b) и *Leptosphaeria maculans* (Kaliff *et al.*, 2007).

Существует ряд предположений относительно роли АБК в защитных реакциях растения-хозяина. Во-первых, АБК может индуцировать устойчивость, способствуя синтезу каллозы (Flors *et al.*, 2008). Каллоза – своего рода «пожарный» полисахарид, образующийся при поранении клеток, а также при формировании срединной пластинки в ходе деления клеток (Горшкова, 2007). Считается, что образование этого полисахарида ограничивает распространение инфекционных агентов, и, зачастую, устойчивость растений коррелирует с интенсивностью биосинтеза каллозы. Показано, что АБК оказывает положительное влияние на накопление каллозы после инфицирования грибными патогенами (Ton, Mauch-Mani, 2004; Kaliff *et al.*, 2007; Flors *et al.*, 2008; Iriti, Faoro, 2008). Помимо этого, АБК может индуцировать изменения в структуре полисахаридов клеточной стенки, а также увеличивать плотность кутикулы, что сказывается на устойчивости растений и инфекционным заболеваниям (Curvers *et al.*, 2010).

Одним из наиболее известных физиологических ответов растений на АБК является закрывание устьиц. Для многих патогенов устьица являются «воротами» для проникновения в организм хозяина. Поэтому АБК-индуцируемое закрывание устьиц может являться компонентом устойчивости растений, что было продемонстрировано на примере *P. syringae* pv. *tomato* (Melotto *et al.*, 2006).

Известно, что некоторые фитопатогенные организмы, а также микоризные и сапрофитные грибы способны синтезировать АБК или АБК-подобные вещества и, таким образом, модулировать физиологические процессы в организме растения-хозяина (Assante *et al.* 1977; Dörffling *et al.* 1984; Kettner, Dorffling, 1995; Cutler, Krochko, 1999; Jiang *et al.*, 2010). Было показано, что АБК может аккумулироваться в гифах и конидиях *Magnaporthe grisea*. Кроме того, этот растительный гормон был выявлен в культуральной жидкости данного фитопатогена, что свидетельствует о секреции грибной АБК (Jiang *et al.*, 2010). Известно также, что симбиотическая бактерия *Azospirillum brasilense* синтезирует АБК *in vitro* (Cohen *et al.*, 2008).

Таким образом, на основании информации, приведенной в настоящем подразделе, можно сделать три заключения. Во-первых, особенности функционирования гормональных систем растений во многом определяют стратегию их взаимодействия с бактериями. Во-вторых, роль отдельно взятых гормональных систем в детерминировании особенностей взаимодействия растений и микроорганизмов дуалистична: одни и те же системы могут определять и восприимчивость, и устойчивость растений в зависимости от видовой принадлежности патогена и хозяина, а также внешних условий. И, в-третьих, особую важность представляет известное обстоятельство, что отдельные гормональные сети работают в рамках единой сигнальной сети. Поэтому изменения в работе одних гормональных систем могут приводить к глобальным гормональным перестройкам, что, в свою очередь, может опосредованно служить предпосылкой для формирования патосистемы.

Сделанные заключения можно продемонстрировать на примере взаимодействия *Agrobacterium tumefaciens* с растениями. Хотя эта система хорошо изучена, многие аспекты ее функционирования указывают на сложный и еще не до конца понятный механизм данного растительно-микробного взаимодействия.

Известно, что *A. tumefaciens* интегрирует в геном хозяина гены ферментов биосинтеза ауксина и цитокинина. В результате индукции

экспрессии этих генов происходит активация деления растительных клеток и их гипертрофия. Следствием этого является формирование опухоли (галла). Это новообразование представляет собой совокупность генетически модифицированных клеток, продуцирующих питательный субстрат для агробактерий – модифицированные аминокислоты опины (Hiei *et al.*, 1997; Escobar, Dandekar, 2003). Следовательно, для успешного прохождения жизненного цикла бактерий необходимо не просто образование галла, а его «правильное» функционирование, сопряженное с интенсивными метаболическими процессами.

Поддержание активного обмена веществ в галле может быть сильно затруднено вследствие отсутствия у такой структуры полноценных покровных тканей и кутикулы, что может приводить к чрезмерному испарению воды и отмиранию тканей галла. Однако показаны механизмы, которые нейтрализуют эту проблему (Efetova *et al.*, 2007). Оказалось, что образование галла сопряжено с увеличением содержания не только цитокининов и ауксинов, но и АБК. Последняя, в свою очередь, индуцирует биосинтез суберина, препятствующего избыточному испарению влаги, и накопление осмотически активных соединений, что способствует более интенсивному транспорту воды в направлении опухоли. При этом активация биосинтеза АБК происходит не в самом галле, а в листьях, откуда этот фитогормон транспортируется по сосудистой системе. В свою очередь, интенсивная продукция АБК в листьях индуцируется вследствие увеличения содержания этилена в галлах, что происходит из-за повышения концентрации ауксина (Efetova *et al.*, 2007).

Кроме того, нормальное функционирование галла не было бы возможным, если бы он состоял исключительно из недифференцированных клеток, не способных выполнять проводящую и опорную функции. Оказалось, что процесс образования галлов включает не только гипертрофию, но и дифференцировку клеток, что сопряжено с неоваскуляризацией растительных тканей (новообразованием сосудистых пучков) и

формированием волокон (Aloni *et al.*, 1995). Не вызывает сомнений, что сложный процесс дифференцировки клеток, в том числе при формировании галлов, требует строго детерминированной работы гормональных систем, особенности которой пока остаются неизвестными.

Важно отметить, что агробактерии как «пользователи» гормональных систем хозяина не являются уникальными микроорганизмами. Существует много примеров, указывающих либо на существенное значение модуляции работы гормональных систем при различных бактериальных инфекциях, либо на возможность восприятия («подслушивания») эндогенных сигналов микроорганизмами (Mathesius *et al.*, 2003; Liu, Nester, 2006; Robert-Seilanianantz *et al.*, 2007; von Rad *et al.*, 2008; Bari, Jones, 2009; Cao, *et al.*, 2011; Kulkarni *et al.*, 2013). В связи с этим, мониторинг «состояния» гормональных систем растений при развитии бактериозов представляется актуальной областью исследований, способной предоставить ценную информацию о механизмах взаимодействия растений и бактерий.

1.4. Растительно-микробные патосистемы, включающие представителей рода *Pectobacterium*

Представители рода *Pectobacterium* включены в список десяти самых вредоносных фитопатогенов. Потери урожая, наносимые этими микроорганизмами, могут составлять до 60 % от общего урожая (Mansfield *et al.*, 2012). Ранее пектобактерии и целый ряд других фитопатогенных энтеробактерий (*Pantoea*, *Dickeya*) принадлежали к единому роду *Erwinia*. Однако развитие методов молекулярной филогении привело к разделению «эрвиний» на несколько отдельных родов (Mansfield *et al.*, 2012). Пектобактерии и Дикеи выделены в отдельную группу энтеробактерий, вызывающих «мягкие гнили» у растений («Soft-rot *Enterobacteriaceae*») (Charkowski *et al.*, 2012). Симптомы заболеваний, вызываемых этими патогенами, обычно связаны с обширными некрозами и мацерацией

паренхимных тканей. При этом могут поражаться как растения в полевых условиях, так и овощи и фрукты при хранении (Горленко и др., 1981).

Типичным заболеванием, вызываемым *Pectobacterium atrosepticum*, является «черная ножка» у растений картофеля, которое характеризуется некрозом тканей в нижней надземной части побегов. Однако симптомы, вызываемые этим патогеном, могут отличаться существенной вариабельностью. Помимо «черной ножки» *P. atrosepticum* может являться причиной увядания и хлорозов, проявляющихся в разной степени в зависимости от чувствительности определенных сортов растений и условий окружающей среды (в первую очередь влажности и температуры) (Bain *et al.*, 1990; Helias *et al.*, 2000; Perombelon, 2002).

Основным резервуаром пектобактерий считается почва (*soil-borne pathogens*), где микроорганизмы сохраняются как в «свободном» состоянии, так и на растительных остатках (de Haan *et al.*, 2008; Terta *et al.*, 2010; Thomas *et al.*, 2011). Однако, также известно, что эти микроорганизмы могут распространяться посредством семенного материала, сохраняясь на поверхности клубней в неактивном состоянии (Salmond, 1994; van der Wolf, de Boer, 2007; Perombelon, van der Wolf, 2002). Поэтому производство качественного посевного незараженного материала является одной из стратегий контроля заболеваний, вызываемых возбудителями мягких гнилей. Однако это является непростой задачей, поскольку зачастую на контаминированных клубнях не выявляются симптомы заболевания, а бактерии в посадочном материале могут находиться в покоем состоянии, что затрудняет своевременную диагностику (van der Merwe *et al.*, 2010).

Считается, что развитие инфекционного процесса, вызываемого пектобактериями, начинается с размножения микроорганизмов в материнском клубне, что приводит к его полному разрушению. В результате этого, бактерии попадают в почву и контаминируют дочерние клубни (Perombelon, 2002).

Пектобактерий традиционно считают патогенами, использующими «грубую силу» при взаимодействии с растением-хозяином («*brute force pathogens*») (Charkowski *et al.*, 2012), которая выражается в массивной продукции экстраклеточных ферментов, разрушающих полимеры растительной клеточной стенки. К этим ферментам относятся пектатлиазы, пектинлиазы, пектинметилэстеразы, полигалактуроназы, целлюлазы, рамногалактуроназы, протеазы и др. Пектиназы (включающие, например, пектатлиазы, пектинлиазы, полигалактуроназы), расщепляют пектиновые вещества, вызывая разрушение срединной пластики (мацерацию тканей) и гибель клеток (Toth *et al.*, 2003). Бактериальные ферменты, разрушающие растительную клеточную стенку, секретируются во внешнюю среду в два этапа (Salmond, 1994). На первом этапе ферменты экспортируются в периплазматическое пространство при помощи Sec-системы, а на втором – выделяются во внешнюю среду посредством системы секреции второго типа (Lory, 1998; Corbett *et al.*, 2005).

Важным фактором вирулентности многих микроорганизмов является система секреции третьего типа (ССТТ) и транспортируемые с ее помощью эффекторные белки и харпины. Компоненты секреторного аппарата третьего типа кодируются генами *hrp* (*hypersensitive response and pathogenicity*) и являются необходимыми либо для развития заболевания, либо для индукции реакции сверхчувствительности (Yang *et al.*, 2002). В наибольшей степени эта секреторная система охарактеризована у биотрофных фитопатогенов родов *Pseudomonas* и *Xanthomonas* (Arlat *et al.*, 1991; Rossier *et al.*, 1999; Collmer *et al.*, 2000; Schechter *et al.*, 2004; Alfano, Collmer, 2004).

Система секреции третьего типа представляет собой канал (пиль), соединяющий бактериальную и растительную клетку (Buttner, Bonas, 2002). Некоторые эффекторные белки этой системы доставляются через секреторный аппарат непосредственно в цитоплазму клетки растения (Buttner, Bonas, 2002; Lentimaki *et al.*, 2003). Другие – хелперные белки или харпины – хотя и транспортируются через эту систему, но непосредственно внутрь

растительной клетки не проникают (Wei *et al.*, 1992). Белки ССТТ могут распознаваться либо внутри клеток хозяина, либо рецептором, находящимся в клеточной стенке. Это, в свою очередь, может приводить либо к блокировке, либо к активации сигнальных систем растения и, таким образом, определять особенности ответных реакций хозяина (Buttner, Bonas, 2002).

У пектобактерий ССТТ изучена в меньшей степени, чем у псевдомонад и ксантомонад. До настоящего времени охарактеризован лишь небольшой набор белков, транспортируемых через эту систему. Учитывая то, что ССТТ в основном считается инструментом биотрофных патогенов, необходимым для тонкой «подстройки» физиологических процессов у хозяина, функции этой системы у патогенов, использующих «грубую силу» остаются не до конца выясненными. Тем не менее, известно, что «отключение» секреторного аппарата третьего типа, или мутации в генах, кодирующих эффекторные белки, негативным образом сказываются либо на вирулентности пектобактерий, либо на их способности индуцировать реакцию сверхчувствительности (Bauer *et al.*, 1994; Mukherjee *et al.*, 1997; Rantakari *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2011; Hogan *et al.*, 2013).

Имеются основания полагать, что ССТТ играет важную роль при бессимптомных инфекциях, которые на сегодняшний день практически не охарактеризованы. Основное внимание исследователей сосредоточено на изучении этапов взаимодействия пектобактерий и растений, сопряженных с типичными патологическими процессами. Тем не менее, хорошо известно, что пектобактерии способны колонизировать организм хозяина, не вызывая при этом симптомов заболевания (Perombelon, 2002; Czajkowski *et al.*, 2011; Toth *et al.*, 2011). По всей видимости, именно латентные инфекции позволяют пролонгировать период взаимодействия бактерий с организмом хозяина и оптимизировать популяционный цикл микроорганизмов относительно жизненного цикла растения, а также обеспечить трансмиссию патогена из поколения в поколение посредством семенного материала (клубни). В связи с этим, изучение латентных инфекций и, в том числе, факторов вирулентности,

обеспечивающих бессимптомное развитие популяций пектобактерий в организме растения, представляет безусловную актуальность.

Одним из факторов вирулентности ряда биотрофных бактерий является фитотоксин коронатин. Его изучение было проведено на примере *P. syringae*. Коронатин является функциональным аналогом жасмоновой кислоты, индуцирующим ЖК-зависимый гормональный путь и репрессирующим СК-зависимый путь у растений (раздел 1.3). Интересно, что у *P. atrorepticum*, типичного некротрофа, обнаружен ряд генов, кодирующих ферменты биосинтеза коронатина (Bell *et al.*, 2004). Мутации в этих генах негативно сказываются на вирулентности этого микроорганизма (Bell *et al.*, 2004). Следует, однако, отметить, что весь спектр генов, необходимых для синтеза коронатина, у пектобактерий не выявлен. Поэтому предполагается, что эти микроорганизмы синтезируют не типичный коронатин, характерный для псевдомонад, а сходное с ним соединение, являющееся функциональным аналогом (Slawiak, Lojkowska, 2009). В пользу этого свидетельствует то, что 1) инфекционный процесс, вызванный пектобактериями, сопряжен с активацией ЖК-пути и репрессией СК-пути (Vidal *et al.*, 1997; Norman-Setterblad *et al.*, 2000); 2) супернатанты бактериальных культур подавляют развитие СК-зависимых ответов у растений (Vidal *et al.*, 1997); 3) активация СК-пути у хозяина на начальных этапах инфекции подавляет размножение пектобактерий *in planta* (Palva *et al.*, 1994).

Таким образом, пектобактерии обладают большим арсеналом факторов вирулентности для эффективной колонизации растения-хозяина. Однако конститутивная продукция факторов вирулентности, даже при условии их большого количества и разнообразия, не обеспечивала бы успешное взаимодействие пектобактерий с растениями. Поэтому синтез детерминант патогенности строго контролируется широким набором сенсорно-регуляторных систем, оптимизирующих их продукцию на транскрипционном, пост-транскрипционном и трансляционном уровнях в зависимости от комплекса факторов (von Bodman *et al.*, 2003; Barnard *et al.*, 2007; Mole *et al.*,

2007; Liu *et al.*, 2008; Põllumaa *et al.*, 2012). Такая регуляция, в частности, препятствует образованию олигосахаридов – продуктов распада полисахаридов клеточной стенки растения, запускающих защитные реакции хозяина на ранних стадиях инфекционного процесса (Mae *et al.*, 2001). Благодаря этому бактерии также могут оставаться «незамеченными» при хронических инфекциях и сосуществовать с растением, не вызывая симптомов заболевания (Helias *et al.*, 2000).

Ключевой системой, регулирующей продукцию факторов вирулентности (в том числе и у пектобактерий) в зависимости от плотности бактериальной популяции, является система «кворум сенсинга» (Burr *et al.*, 2006, Barnard, Salmond, 2007; Liu *et al.*, 2008; Põllumaa *et al.*, 2012; Crépin *et al.*, 2012; Cubitt *et al.*, 2013). Ее функционирование связано с синтезом и восприятием аутоиндукторов – сигнальных молекул, диффундирующих из клеток в окружающую среду. Основными компонентами системы кворума являются ферменты, отвечающие за синтез аутоиндукторов, и сенсоры аутоиндукторов, которые регулируют экспрессию кворум-зависимых генов. Функционирует эта система по принципу положительной обратной связи. По мере увеличения концентрации бактериальных клеток происходит накопление аутоиндукторов до пороговой концентрации. Это обеспечивает активацию экспрессии большого набора «кворум-зависимых» генов, в число которых входит и ген синтазы аутоиндукторов. Благодаря этому, еще более интенсифицируется синтез сигнальных молекул, и происходит их лавинообразное накопление в бактериальном микроокружении (Whitehead *et al.*, 2001).

У *P. atrosepticum* функционирует две системы кворума, опосредованные разными медиаторами: аутоиндукторами второго типа (АИ-2) и ацил гомосеринлактонами (АГЛ) (Pirhonen *et al.*, 1993; Coulthurst *et al.*, 2006). Основные компоненты АИ-2-зависимой системы кворума считаются более консервативными среди представителей прокариот, однако ее влияние на физиологические процессы значительно различается у разных видов

бактерий. Известно, что у пектобактерий АИ-2 является позитивным регулятором продукции экзоферментов и влияет на вирулентность этих микроорганизмов (Coulthurst *et al.*, 2006). Однако более выраженный эффект на продукцию факторов вирулентности оказывает система кворума, опосредованная АГЛ. Мутантные формы этих микроорганизмов по гену АГЛ-синтазы (*expI*, *carI*) авирулентны (Pirhonen *et al.*, 1993; Burr *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2008).

Пост-транскрипционную регуляцию продукции многих факторов вирулентности у пектобактерий осуществляет система регуляции синтеза вторичных метаболитов (**Regulator secondary metabolite**, Rsm) (Cui *et al.*, 1995). Она включает два основных компонента: РНК-связывающий белок RsmA и нетранслируемую РНК *rsmB*. RsmA препятствует трансляции целевых мРНК и обеспечивает их расщепление, а *rsmB*, обладая большим сродством к RsmA, нейтрализует его эффект (Chatterjee *et al.*, 1995; Cui *et al.*, 1995; Mukherjee *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1998). Репрессия/дерепрессия генов, регулируемых этой системой, происходит при изменении «RsmA/*rsmB* баланса». На этот баланс может влиять целый ряд сигнальных цепей, передающих информацию об окружающей среде и физиологическом состоянии клеток. Поэтому, можно сказать, что система регуляции синтеза вторичных метаболитов служит комплексом, собирающим разнородную информацию, и, исходя из ее совокупности, адекватно корректирует экспрессию генов вирулентности.

Важными регуляторами продукции бактериальных ферментов, разрушающих полимеры растительной клеточной стенки, являются сенсоры продуктов разложения пектиновых веществ. Один из таких сенсоров – репрессор транскрипции KdgR – взаимодействует с промоторными областями генов пектатлиаз, полигалактуроназ, ряда компонентов системы секреции третьего типа и *rsmB*. При образовании 2-кетоглюконовой кислоты (КДГ) – интермедиата, образующегося при катаболизме пектиновых веществ, и его связывании с KdgR происходит дерепрессия целевых генов за счет понижения

сродства этого репрессора транскрипции к ДНК (Condemine, Robert-Baodouy, 1987; Liu *et al.*, 1999; Kazemi-Pour *et al.*, 2004).

Продукты разложения пектиновых веществ, по-видимому, являются не единственными метаболитами растительного происхождения, влияющими на синтез пектолитических ферментов. В недавних исследованиях было продемонстрировано, что в водоекстрагируемой низкомолекулярной фракции побегов картофеля присутствуют метаболиты «не пектиновой природы», которые активируют продукцию экстраклеточных пектаттиаз у *P. atrosepticum* SCRI1043 (Tarasova *et al.*, 2013). Наличие у пектобактерий сенсорных компонентов, воспринимающих «сигналы» растения, в составе систем регуляции продукции факторов вирулентности, по всей видимости, предотвращает нецелесообразное расходование ресурсов на их синтез вне организма хозяина.

Влияние на синтез факторов вирулентности у пектобактерий оказывают и системы, регулирующие формирование стрессового ответа. Существенная часть бактериальных генов, экспрессия которых индуцируется при взаимодействии с растением, кодирует внутриклеточные стрессовые белки (Andersson *et al.*, 1999 а, б; Dong, Schellhorn, 2010). Стресс-индуцируемый сигма фактор RpoS играет важную роль в адаптации бактериальных клеток, в частности, к условиям внутренней среды растения-хозяина (Mukherjee *et al.*, 1998). Кроме того, RpoS является позитивным регулятором экспрессии гена *rsmA* и, благодаря этому, оказывает негативное влияние на продукцию факторов вирулентности. Мутация по соответствующему гену приводит к формированию фенотипов, характеризующихся сверхпродукцией факторов вирулентности *in vitro* (Mukherjee *et al.*, 1998). Однако этот потенциал не реализуется *in planta*, поскольку инактивация *rpoS* приводит к снижению устойчивости микроорганизмов к ответным реакциям растений (Andersson *et al.*, 1999 а, б). По всей вероятности, наличие стресс-индуцируемых белков среди негативных регуляторов продукции детерминант патогенности,

позволяет бактериям при необходимости сдвигать приоритет от проявления вирулентности к адаптации и выживанию.

По мнению ряда авторов, одним из самых неисследованных вопросов, касающихся взаимодействия пектобактерий и растений, является проблема выживания этих микроорганизмов вне организма хозяина в ходе вневегетационного периода и сохранение их патогенного потенциала, обеспечивающее начало нового популяционного цикла *in planta* (Charkowski *et al.*, 2012, Davidsson *et al.*, 2013). Для *P. atrosepticum* был охарактеризован ряд адаптивных программ, которые потенциально могут обеспечивать выживание популяций этих микроорганизмов в стрессовых условиях естественных экосистем (Горшков и др., 2009; Gorshkov *et al.*, 2010).

На сегодняшний день отсутствуют эффективные меры борьбы с заболеваниями, вызываемыми представителями рода *Pectobacterium* (Norman-Setterblad *et al.*, 2000; Charkowski *et al.*, 2012). По всей вероятности, это связано с двумя основными причинами. Во-первых, пока не выявлены гены у растений, определяющие устойчивость к пектобактериям. Наиболее значимые в этом направлении результаты были достигнуты в недавно проведенных исследованиях, в которых продемонстрировано, что степень устойчивости растений картофеля к *P. atrosepticum*, *P. carotovorum* и *D. dadantii* коррелирует с уровнем экспрессией гена PR-5t (Третьякова, 2013). Вероятно, экспрессия этого гена может служить маркером устойчивости растений к бактериальной мягкой гнили.

Во-вторых, при исследовании взаимодействия пектобактерий с растениями, ввиду экономических соображений, рассматриваются, главным образом, лишь острые стадии инфекции, когда происходит запуск необратимых процессов, связанных с системным и интенсивным поражением тканей растения. В тоже время, нельзя не отметить, что эти процессы представляют собой лишь вершину айсберга. В действительности, взаимодействие пектобактерий и растений значительно более

пролонгировано, чем период развития симптомов. Более того, это взаимодействие далеко не всегда включает острую стадию инфекции.

Возможные подходы для решения проблемы бактериозов, вызываемых пектобактериями, могут быть связаны с более глубоким пониманием экологии этих микроорганизмов, которые способны не только к агрессивному «поведению», но и к мирному сосуществованию со своими хозяевами. Основой для этого могут послужить физиолого-биохимические критерии, различающиеся при разных стратегиях взаимодействия в системе паразит/хозяин. Возможно, что эти критерии позволят приблизиться к пониманию причин и условий, определяющих дифференцированное «поведение» пектобактерий *in planta* и провоцирующих их на применение «грубой силы». Безусловно, те же самые вопросы представляют не только практический интерес, но и существенную фундаментальную значимость. По-прежнему остается неясным, как и почему бактерии, способные наносить существенный вред растению, мирно сосуществуют со своим хозяином, формируя умеренную патосистему. В связи с этим, в настоящем исследовании мы предприняли попытку охарактеризовать физиолого-биохимические и морфологические аспекты формирования растительно-микробной патологической системы, включающей представителя фитопатогенов, вызывающих мягкие гнили растений.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объект исследования

В качестве объекта исследования в работе была использована патологическая система, включающая растения табака (*Nicotiana tabacum* сорт «Hawana») и фитопатогенную бактерию *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 (*Pba*). Несмотря на то, что основным хозяином этого патогена является картофель, для достижения цели исследования и решения поставленных задач нами был выбран неспецифичный хозяин. Это связано с тем, что развитие заболевания у специфичного хозяина характеризуется значительной вариабельностью симптомов; при этом также может различаться продолжительность латентной стадии инфекции у отдельных растений (Perombelon, 2002; Toth *et al.*, 2011; Czajkowski *et al.*, 2011; результаты собственных экспериментов (данные не приводятся)). Неоднородность симптомов заболевания существенно затрудняет характеристику процесса взаимодействия пектобактерий и растений, поскольку не позволяет объективно дифференцировать процесс формирования патосистемы на различные стадии и выявлять закономерности при анализе тех или иных параметров вследствие существенной неоднородности экспериментальных данных. В тоже время, в использованной нами модели развитие симптомов заболевания у отдельных растений проходило достаточно однородно.

2.2. Культивирование *P. atrosepticum* SCRI1043

Штамм *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 (*Pba*) (Bell *et al.*, 2004) был любезно предоставлен из коллекции микроорганизмов Белорусского государственного университета (г. Минск) доцентом Е.А. Николайчиком. Клетки бактерий выращивали на среде Luria-Bertani (LB) (Sambrook *et al.*, 1989), содержащей: 10 г/л пептона (Helicon, США); 5 г/л дрожжевого экстракта (Helicon, США) и 10 г/л NaCl. Кислотность среды доводили 5N NaOH до pH 7,5. Стерилизацию среды проводили в течение 45 мин при 0,8

атм. В качестве инокулята использовали культуры поздней логарифмической фазы в количестве, дающем начальную оптическую плотность клеточной суспензии 0,1 ОЕ ($\lambda = 600$ нм). Культуры инкубировали в термостатируемом шейкере-инкубаторе IS-971R (JEIO TECH, Корея) при вращении платформы со скоростью 160 об/мин и температуре 28 °С.

При оценке морфологических изменений клеток *Pba* в зависимости от условий культивирования бактерии либо инкубировали в безуглеродной среде АВ (голодание) при различной начальной плотности популяции, либо культивировали в присутствии метаболитов растения-хозяина.

Для получения голодающих культур (Горшков и др., 2009) клетки *Pba* культивировали до плотности $(1 - 2) \times 10^9$ КОЕ/мл в среде LB как описано выше. Далее клетки осаждали центрифугированием (8000 g, 15 °С, 10 минут) и суспендировали в исходном объеме безуглеродной минеральной среды АВ содержащей на 1л: 1 г NH_4Cl ; 0,62 г $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; 0,15 г KCl ; 0,013 г $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$; pH 7,5. Затем клетки осаждали центрифугированием и вновь отмывали в среде АВ. После двукратного отмывания клетки ресуспендировали в десятикратном от исходного объеме среды АВ. Часть клеточной суспензии разводили до плотности $(1 - 3) \times 10^4$ КОЕ/мл в той же среде. Голодающие культуры, соответствовавшие титрам инокуляции 10^4 и 10^8 КОЕ/мл, инкубировали в термостате при 28 °С без аэрации в течение четырех суток.

При оценке влияния метаболитов растений на ультраструктуру клеток *Pba* бактерии культивировали в стандартных условиях (28 °С, аэрация при 160 об/мин) в модифицированной среде IM (induction medium) (Tarasova *et al.*, 2013), содержащей 100 мМ натрий-калиевого фосфатного буфера (pH 7,0), 5 мМ K_2SO_4 , 0,5 мМ CaCl_2 , 5 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и 2 г/л полигалактуроновой кислоты (Sigma, США). Клетки, выращенные на среде LB, осаждали центрифугированием (8000 g, 15 °С, 10 минут) и дважды отмывали в среде IM, так же как описано для инокуляции безуглеродной среды. Затем среду IM инокулировали клетками *Pba* с начальным титром $(1 - 2) \times 10^7$ КОЕ/мл, и

культивировали бактерии в течение двух суток. В опытных вариантах в среду добавляли низкомолекулярную фракцию водного экстракта побегов картофеля в соотношении 15 мкл экстракта / мл среды.

Для получения растительного экстракта 10 г побегов картофеля гомогенизировали в 25 мл деионизированной воды. Смесь инкубировали в течение 2 часов при 4 °С, фильтровали и потом центрифугировали (10000 g, 4 °С, 20 мин). Супернатант фильтровали через нитроцеллюлозный фильтр с диаметром пор 0,2 мкм, после чего проводили ультрафильтрацию с помощью концентраторов с размером пор 3 кДа (Ultra-15 centrifugal filter device, Millipore, США). Низкомолекулярную фракцию (< 3 кДа) лиофилизировали, растворяли в 1 мл деионизированной воды, замораживали и хранили при –20 °С до использования в эксперименте.

Голодающие в течение 4 суток и выращенные на среде IM, в том числе в присутствии растительного экстракта, клетки *Pba* собирали центрифугированием при 10000 g в течение 10 мин при комнатной температуре. Материал переносили в полипропиленовые пробирки объемом 1,5 мл и проводили фиксацию образцов для анализа с помощью электронной микроскопии.

2.3. Культивирование растений табака и их инфицирование клетками *P. atrosepticum* SCRI1043

Растения табака (*Nicotiana tabacum* сорт «Hawana») выращивали в стерильных условиях на среде MS (Murashige – Skoog) (Murashige, Skoog, 1962), в состав которой входили (на 1л): 825 мг NH₄NO₃; 950 мг KNO₃; 850 мг KH₂PO₄; 0,83 мг KJ; 6,3 мг H₃BO₃; 22,3 мг MnSO₄×4H₂O; 8,6 мг ZnSO₄×7H₂O; 0,25 мг Na₂MoO₄×2H₂O; 0,025 мг CoCl₂×6H₂O; 0,025 мг CuSO₄×5H₂O; 185 мг MgSO₄×7H₂O; 220 мг CaCl₂×2H₂O; 100 мг мезоинозита; 1 мг тиамина; 2 мг пиридоксина. Раствор хелатного железа готовили в виде концентрата из Na₂ЭДТА (3,73 г/л) и FeSO₄×7H₂O (2,78 г/л) и добавляли в среду из расчета

1/100. В среду также добавляли 30 г/л сахарозы и агарозу (Ахуген, Испания) до 0,4 %. Стерилизацию среды проводили в течение 45 мин при 0,8 атм.

Семена табака, полученные из Белорусского государственного университета (г. Минск), стерилизовали 2 % раствором гипохлорида натрия с добавлением 0,5 % додецилсульфата натрия (SDS) в течение 10 – 15 минут. После этого продезинфицированные семена шесть раз промывали стерильной дистиллированной водой и помещали в чашки Петри, содержащие 20 мл агаризованной среды MS. После появления семядольных листьев проростки рассаживали в стерильные банки со средой MS. Культивирование растений проводили при 22 °С, 16-ти часовом световом дне и освещении 5000 люкс в климат-камере.

Для инфицирования клетками *Pba* использовали растения табака возраста 3 – 4-х недель. Клетки микроорганизма выращивали в среде LB (описано в разделе 2.2) до поздней логарифмической фазы роста, после чего собирали центрифугированием при 6000 g в течение 10 минут при комнатной температуре, дважды отмывали и ресуспендировали в 0,4 % растворе хлорида натрия. Плотность инокулята довели до $(1 - 3) \times 10^7$ колониеобразующих единиц на мл (КОЕ/мл) с помощью серийных разведений. Десять мкл суспензии бактериальных клеток (что соответствовало $(1 - 3) \times 10^5$ КОЕ) наносили на поверхность растения (в пазуху листа в середине стебля) без механических повреждений при помощи автоматического дозатора. На контрольные растения таким же образом наносили 10 мкл 0,4 % раствора хлорида натрия. После этого контрольные и инфицированные растения помещали в климат-камеру.

2.4. Оценка титра культивируемых клеток *P. atrosepaticum* SCRI1043 в инфицированных растениях

Титр клеток *Pba* в растениях табака оценивали по количеству колониеобразующих единиц в 1 грамме растительного материала (КОЕ/г) (Gorshkov *et al.*, 2014). Для этого навеску растительного материала (побеги,

или корни, или растительные остатки) растирали в ступке в физиологическом растворе (0,9 % NaCl) из расчета 1:2 (вес/объем). Из полученных суспензий делали последовательные десятикратные разведения. По 100 мкл каждого из разведений переносили в чашки Петри, содержащие 20 мл агаризованной среды LB (1,5 % бактоагара, Ferak, Германия), и растирали по поверхности шпателем Дригальского. Засеянные чашки Петри инкубировали при 28 °С в термостате; через двое суток проводили подсчет колоний. Титр КОЕ определяли по среднему числу выросших колоний с учетом степени разведения и пересчитывали на грамм сырой массы растительного материала.

2.5. «Оживление» покоящихся клеток *P. atrosepitum* SCRI1043

Через 30 суток после инфицирования растений клетками *Pba* остатки погибших растений взвешивали и растирали в ступке в двухкратном объеме среды АВ (вес/объем). Полученную суспензию рассеивали в виде серии десятикратных разведений на чашки Петри, содержащие агаризованную среду LB, для того чтобы подтвердить отсутствие культивируемых клеток *Pba* в растительном дебрисе до этапа «оживления». Для восстановления колониеобразующей способности клеток *Pba* был применен ряд подходов:

1. Осадки гомогенизированного растительного дебриса дважды отмывали в безуглеродной среде АВ, как описано в п. 2.2., суспендировали в исходном объеме и затем суспензию рассеивали на агаризованную среду LB (Горшков и др., 2009).

2. После отмывки осадков гомогенизированного растительного дебриса суспензии трижды последовательно разводили в 10 раз в среде АВ и затем добавляли 1/10 объема среды LB или растительного экстракта (способ приготовления экстракта описан в разделе 2.2). Полученные суспензии инкубировали при 28 °С и 160 об/мин в течение двух суток; затем 100 мкл суспензии высевали на агаризованную среду LB (Шлеева и др., 2003; Kana *et al.*, 2008).

3. После отмывки осадков в среде АВ полученные суспензии наносили

на стерильные растения табака, в которых через двое и семь суток оценивали титр КОЕ *Pba* (Ordax *et al.*, 2006; Grey, Steck, 2001).

4. Растительные остатки замораживали при -18°C и хранили при этой температуре в течение одного месяца; после этого их размораживали при комнатной температуре. Одну часть растительного дебриса гомогенизировали в среде АВ и высевали через два часа после разморозки, другую – через двое суток. Все процедуры «оживления» проводили в стерильных условиях. В тех случаях, когда происходило «оживление» и на агаризованной среде вырастали бактериальные колонии, их видовую принадлежность к *Pba* проверяли с помощью ПЦР-анализа. Для этого 10 случайным образом выбранных колоний отбирали петлей и ресуспендировали клетки в растворе ТЕ (10 мМ Трис-НСl, рН 8.0; 1 мМ ЭДТА, рН 8.0) с 1 % Triton X-100. Суспензию инкубировали при 100°C , 5 мин, после чего добавляли четыре объема деионизированной воды и центрифугировали при 10000 g, 2 мин. Пять микролитров полученного лизата добавляли в ПЦР-смесь, содержащую праймеры, специфичные ДНК *Pba* (Gorshkov *et al.*, 2014).

2.6. Приготовление образцов для световой и электронной микроскопии

С помощью различных видов микроскопии в ходе работы анализировали срезы стеблей контрольных и инфицированных *Pba* растений табака, а также клетки *Pba*, выращенные или инкубированные в культурах *in vitro*. Образцы стеблей табака (0,5 – 0,8 мм толщиной) были высечены с помощью стерильного бритвенного лезвия у контрольных и инфицированных *Pba* растений (18 часов, 2, 3 и 9 суток после инфицирования). Клетки *Pba*, выращенные в культурах *in vitro*, собирали центрифугированием при 8000 g в течение 10 мин при комнатной температуре.

Материал переносили в полипропиленовые пробирки объемом 1,5 мл и фиксировали в течение двух часов в 0,1 % растворе глутарового альдегида, приготовленного на фосфатном буфере (0,1 М, рН 7,2). Дальнейшую

фиксацию проводили в 2,5 % растворе глутарового альдегида, приготовленного на том же буфере, в течение 12 часов, после чего образцы промывали три раза по 15 минут в фосфатном буфере с сахарозой (6,8 г/100 мл). Затем материал выдерживали при 4 °C в течение 4 часов в 1 % растворе OsO_4 , приготовленного на том же буфере с добавлением 25 мг/мл сахарозы. Дегидратацию проводили, выдерживая образцы в этиловом спирте при разных его концентрациях и в ацетоне, следующим образом: 1) в 30 %-ном этаноле – 1 мин; 2) дважды в 40 %-ном этаноле по 10 мин; 3) дважды в 50 %-ном этаноле по 10 мин; 4) дважды в 60 %-ном этаноле по 15 мин; 5) дважды в 70 %-ном этаноле по 15 мин; 6) дважды в 80 %-ном этаноле по 15 мин; 7) дважды в 96 %-ном этаноле по 30 мин; 8) трижды в 100 % ацетоне по 20 минут.

После дегидратации препараты выдерживали в окиси пропилена в течение 45 минут, после чего последовательно пропитывали в течение 24 часов эпоксидной смолой ЭПОН 812 (Fluka, Швейцария) и окисью пропилена в следующих соотношениях: 1) 1:2; 2) 1:1; 3) 2:1. Затем материал помещали в чистую смолу и проводили полимеризацию при температурах 37 °C, 45 °C и 60 °C по 24 часа.

Ультратонкие и полутонкие срезы образцов получали на микротоме LKB-8800 (LKB, Швеция). Полутонкие срезы (около 2 мкм толщиной) окрашивали 1 % раствором (вес/объем) метиленового синего. Срезы фотографировали с помощью микроскопа (LSM 510 Meta; Carl Zeiss, Jena, Германия) в проходящем свете.

Ультратонкие срезы (около 300 нм), монтировали на медные сеточки и окрашивали 2 % водным раствором уранилацетата (Tandler, 1990) в течение 20 минут и цитратом свинца в течение 7 минут (Reynolds, 1963). Некоторые образцы были окрашены согласно методике Thiéry, используемой для гистохимического выявления полисахаридов (Thiery, 1967). В этом случае срезы были монтированы на золотые сеточки и последовательно обработаны 1 % водным раствором йодной кислоты (H_5IO_6) (вес/объем) в течение 20

минут, 0,2 % раствором тиокарбогидразида (Fluka, Швейцария) в 20 % уксусной кислоте (вес/объем) в течение 2 часов и 1 % водным раствором протеината серебра (Fluka, Швейцария) (вес/объем) в течение 30 минут в темноте. Образцы анализировали с помощью электронного микроскопа JEM-1200 EX (Jeol, Япония) при рабочем напряжении 80 кВ.

2.7. Выделение РНК и синтез кДНК при помощи реакции обратной транскрипции

Выделение тотальной РНК из растений табака проводили при помощи коммерческого набора «RNeasy Plant Mini Kit» (Qiagen, США) согласно инструкциям производителя. Концентрацию РНК определяли с использованием флуориметра Qubit (Invitrogen, США); нативность РНК оценивали при помощи гель-электрофореза в 1 % агарозном геле.

Для получения кДНК использовали 2 – 3 мкг тотальной РНК. В состав реакционной смеси для реакции обратной транскрипции входили 0,1 мкМ праймеры олиго-dT₁₈, 400 мкМ дезоксирибонуклеотидфосфатов, 100 ед. обратной транскриптазы RevertAid с соответствующим буфером (Thermo Scientific, США). На первой стадии раствор РНК в присутствии праймеров прогревали в течение 5 мин при 70 °С, а затем помещали на лед; на второй – добавляли остальные компоненты и инкубировали в амплификаторе DNA Engine thermocycler (Bio-Rad, США) при следующем температурном режиме: 25 °С – 10 мин; 42 °С – 60 мин; 70 °С – 10 мин. Общий объем реакционной смеси составлял 25 мкл. Два мкл полученной кДНК добавляли в ПЦР-смесь при постановке реакций.

2.8. Электрофорез нуклеиновых кислот в агарозном геле

Электрофоретическое разделение ДНК и РНК проводили в агарозных гелях (концентрация агарозы 1 – 1,5 %) в горизонтальных блоках при напряженности электрического поля 5 – 10 В/см. В качестве электролита использовали трис-ацетатный буфер (40 мМ трис-ацетат, pH 8,0; 0,02 М

ацетат натрия, 0,002 М EDTA). О ходе электрофореза судили по миграции бромфенолового синего (Serva, Германия), добавленного в пробы перед их нанесением в лунки геля. ДНК регистрировали по флуоресценции в ультрафиолетовом свете после экспозиции геля в растворе (10 мкг/мл) бромистого этидия (Маниатис и др., 1984) с помощью установки для видеодокументации гелей Gel-Doc (Bio-Rad, США).

2.9. Амплификация участков ДНК (кДНК) с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР РВ)

Для амплификации участков ДНК *Pba*, а также кДНК, соответствующих транскриптам различных генов растений табака, нами были сконструированы праймеры и флуоресцентные зонды TaqMan. Для этого был использован пакет программ Vector NTI версия 9. Конструирование праймеров и зондов проводили на основе последовательности генома *Pba* (NC_004547), или опубликованных во всемирной базе данных открытых рамок считывания генов табака. Для оценки уровня целевых транскриптов у растений табака праймеры конструировали на область генов, кодирующих алленоксидциклазу (*NtAOC*), регуляторный белок JAZ (*NtJ3*), липоксигеназу 2 (*NtLOX2*), белок PR-1a (*NtPR1a*), β -субъединицу митохондриальной АТФазы (*NtATP*), фактор элонгации трансляции (*NtEf*). Для количественной оценки геномных копий *Pba*, в том числе в растении-хозяине, праймеры конструировали на кодирующую область гена *expI* (*PbaexpI*), а также на участок межгенного спейсера 16S-23S рРНК (*Pba16-23IS*). Последовательности праймеров приведены в таблице 1. Праймеры и флуоресцентные зонды синтезировали в НПО «Синтол» (Москва). В качестве флуоресцентных меток в составе зондов TaqMan были использованы FAM, либо ROX с соответствующими гасителями флуоресценции (BHQ-1, BHQ-2, соответственно).

Таблица 1. Список использованных праймеров и флуоресцентных зондов TaqMan.

Праймеры и зонды	Последовательность 5'-3'	Размер продукта
<i>NtAOCF</i>	CGGCTCAACTGATTCCTCTACAAC	146 н.п.
<i>NtAOCR</i>	GTTTGTTGCTAAAGGGGACAAGATC	
<i>NtAOC</i> TaqMan probe	(ROX-C)GAACTCAA(T-BHQ-2)GAACGTGACCGTGGTAGC	
<i>NtJ3F</i>	CGGCAGATAAAGCTAAGGAAATC	141 н.п.
<i>NtJ3R</i>	CGATTGGTAAATCTCCAGAAATAATAGG	
<i>NtJ3</i> TaqMan probe	(ROX-C)CCAAGGAAACAACAACACTG(T-BHQ-2)GCTACTCAG	
<i>NtLOXF</i>	CACGCATAATGAGTTTGATAGTTTTG	172 н.п.
<i>NtLOXR</i>	CTGAGGAGTTGGGTACTTAAATAGGC	
<i>NtLOX</i> TaqMan probe	ROX-G)CCCTTTGT(T-BHQ-2)GAAAGCCATTACTGATAGC	
<i>NtPR1aF</i>	GAGGCGAAAGTCCATACTAATTG	180 н.п.
<i>NtPR1aR</i>	CCACTTGGTCTTTTTTATAGATCCAC	
<i>NtPR1a</i> TaqMan probe	(FAM-C)AAGCAGAACAATCCATACA(T-BHQ-1)ATTAACGTG	
<i>NtATPF</i>	GGTCGATGGCTTGGGAGTACC	107 н.п.
<i>NtATPR</i>	GCACAGATTACGTTCAATAATACCAG	
<i>NtATP</i> TaqMan probe	FAM-C)GTCTTCGC(T-BHQ-1)CGTGATCGCTTAGAGC	
<i>NtEfF</i>	GCCCAACACTTCTTGATGCTC	140 н.п.
<i>NtEfR</i>	GACACCAGTTTCCACACGACC	
<i>NtEf</i> TaqMan probe	(FAM-C)CTCTCAGGC(T-BHQ-1)CCCACTTCAGGATG	
<i>PbaexpIF</i>	GGAATTAGCGTAGTTGAACAAGGTCTG	148 н.п.

<i>Pba</i> expIR	GCCACTGCTTCAATTCATTGCTC	
<i>Pba</i> expI TaqMan probe	(FAM-C)CCACTGCGG (T-BHQ 1) TAATACGACGAGCCAAAGC	
<i>Pba</i> 16-23ISF	GATGATTCTTTTGAGTCATGTTTAC	196 н.п.
<i>Pba</i> 16-23ISR	GACACTTTTCGCAGGCTACCACG	
<i>Pba</i> 16-23IS TaqMan probe	(FAM-T)GTGTCAA(BHQ1- T)GAGTCTCTCAAATAATCGCAGCGC	

С разработанными нами праймерами были проведены тестовые реакции для проверки их специфичности, в которых было показано, что размер ПЦР-продуктов соответствовал теоретически ожидаемому. Праймеры, специфичные ДНК *Pba*, не приводили к образованию ПЦР-продуктов при использовании в качестве матрицы ДНК (либо кДНК) стерильных растений табака. В результате реакций с праймерами, комплементарными последовательностям различных генов растений табака, и ДНК *Pba* в качестве матрицы, ПЦР-продуктов также зарегистрировано не было. При постановке контрольных реакций, в которых отсутствовала ДНК (отрицательный контроль), образования продуктов не происходило.

ПЦР РВ проводили в реакционной смеси, в состав которой входили 120 мкМ дезоксинуклеозидтрифосфатов, 2 – 5 мкл раствора ДНК-матрицы (от 0,0001 до 10 нг), 0,1 мкМ каждого праймера и зонда TaqMan, 0,04 ед. «Hot-Start» Taq-полимеразы с соответствующим буфером (Евроген, Москва). Конечный объем реакционной смеси составлял 25 мкл. Температурно-временной режим реакции (40 циклов) и изменение флуоресценции контролировали с помощью термоциклера с оптическим модулем CFX96 (Bio-Rad, США). Стандартными параметрами реакции были следующие: (95 °С – 1 мин; затем 40 циклов: 94 °С – 10 сек, 60 °С – 1 мин). Образование ПЦР-продуктов регистрировали по флуоресценции FAM (абсорбция/эмиссия при 490/530), либо ROX (абсорбция/эмиссия при 580/610).

2.10. Анализ уровня экспрессии салицилат- и жасмонат-индуцируемых генов у растений табака

Расчет относительного уровня экспрессии целевых генов проводили на основе результатов количественного ПЦР-анализа в реальном времени (раздел 2.9). Количественное содержание кДНК, соответствующих транскриптам целевых и референсных генов, оценивали в относительных единицах, сопоставляя значения порогового цикла реакции (Ct) для каждого образца с калибровочной кривой. Калибровочную кривую, отражающую зависимость значения порогового цикла реакции от исходной концентрации ДНК-мишени, строили на основании результатов ПЦР-реакций, в которых в качестве матрицы использовали серию разведений (1-, 4-, 10-, 40-, 100-кратных) одного из образцов кДНК. Каждую реакцию проводили в трех аналитических повторностях. Отсутствие значимых количеств геномной ДНК подтверждали постановкой ПЦР с образцами РНК, для которых этап реакции обратной транскрипции был исключен.

Определение уровня экспрессии целевых жасмонат- и салицилат-индуцируемых генов проводили относительно двух референсных генов (кодирующих фактор элонгации трансляции и β -субъединицу АТФазного комплекса). В нашей лаборатории с помощью алгоритма geNorm было показано, что уровень экспрессии этих генов в растениях табака после инфицирования *Pba* не меняется и соответствует контрольным растениям (данные не опубликованы). Схема отбора образцов для определения уровня экспрессии целевых генов в контрольных и инфицированных *Pba* растениях табака дана при изложении результатов.

2.11. Оценка титра геномных копий *P. atrosepticum* SCRI1043 в инфицированных растениях табака

Определение титра геномных копий *Pba* в растениях табака проводили с помощью ПЦР в реальном времени (ПЦР РВ) относительно калибровочных кривых, построенных по результатам реакции с контрольными образцами

ДНК *Pba* известной концентрации (Gorshkov *et al.*, 2014; Petrova *et al.*, 2014). Выделение контрольной ДНК проводили с помощью коммерческого набора AxyPrep Multisource Genomic DNA Miniprep kit (Axygen, США) согласно инструкциям производителя. За одну геномную копию принимали 5,5 фг ДНК (5064 т.п.н.). Концентрацию ДНК в контрольных образцах оценивали с помощью флюориметра Qubit (Invitrogen, США). Зная концентрацию ДНК в растворе и размер генома *Pba*, вычисляли титр геномных копий в контрольных образцах при помощи web-ресурса (http://www.molbiol.ru/scripts/01_07.html). В качестве дополнительного контроля при определении титра геномных копий *Pba* в растениях табака проводили ПЦР с образцами лизатов культур *Pba* поздней логарифмической фазы роста с известным титром КОЕ, разведенных в 10^N -раз в деионизированной воде.

Титр геномных копий *Pba* в растениях табака оценивали в пересчете на 1 грамм растительного материала. Ткани растений гомогенизировали как описано в разделе 2.4. Аликвоты полученных суспензий (200 мкл) центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин при комнатной температуре. После удаления супернатанта осадок ресуспендировали в 50 мкл Трис-HCl, pH 8,0. К полученной суспензии добавляли Triton X-100 до 1 %. Смесь инкубировали при 100 °C в течение 10 мин, после чего к ней добавляли четыре объема деионизированной воды и центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем полученный осветленный лизат разводили в 10^N -раз деионизированной водой; по пять мкл из серии разведений добавляли в ПЦР-смеси при постановке реакций. Оценку числа геномных копий проводили в диапазоне $10^2 - 10^7$ копий ДНК-мишеней на пробу; калибровочная кривая, отражающая зависимость между количеством ДНК-мишеней и значением порогового цикла при ПЦР РВ, в этом диапазоне имела характер прямой.

2.12. Выделение различных фракций полисахаридов и их анализ

Выделение различных фракций полисахаридов проводили из стеблей контрольных (неинфицированных) и инфицированных *Pba* (двое суток после инфицирования) растений, а также из клеток *Pba*, выращенных *in vitro* (бактерии культивировали как описано в разделе 2.2). В качестве исходного материала использовали либо 1,2 г растительных тканей, либо около $1,2 \times 10^{10}$ клеток *Pba* (это количество примерно в пять раз превышает количество клеток патогена в 1,2 г инфицированного растения).

Растительные ткани или бактериальные клетки растирали в жидком азоте до гомогенного состояния, после чего добавляли четыре объема Na/K-фосфатного буфера (50 мМ, pH 7,0) и гомогенизировали в течение 3 – 5 минут. Полученные гомогенаты центрифугировали в течение 10 минут при 8000 g при 4 °C. Затем супернатант, содержащий буфер-экстрагируемые полисахариды, отделяли и термостатировали при 100 °C в течение 10 мин, после чего центрифугировали при 8000 g, 4 °C, 10 мин. Из полученного супернатанта осаждали полисахариды добавлением четырех объемов 96 % этилового спирта. Затем полисахариды буфер-экстрагируемой фракции трижды промывали 80 % этанолом и растворяли в деионизированной воде перед нанесением на колонку.

Осадок, оставшийся после отделения буфер-экстрагируемой фракции, суспендировали в 80 % этаноле и термостатировали при 100 °C в течение 10 мин, после чего центрифугировали при 8000 g, 4 °C, 10 мин. Далее осадки трижды промывали 80 % этанолом, трижды – ацетоном и трижды – 50 мМ Na/K-фосфатным буфером, pH 7,0. Для удаления крахмала осадки двукратно обрабатывали глюкоамилазой (Sigma, USA) в течение 18 – 20 ч при 37 °C. После этого отсутствие крахмала в образцах подтверждали с помощью окрашивания KI – I₂. Затем полисахариды осаждали центрифугированием (8000 g, 4 °C, 10 мин), трижды промывали водой и трижды – ацетоном, после чего высушивали.

Для выделения ионносвязанных пектиновых веществ полученные

осадки суспендировали в 0,5 % растворе оксалата аммония, pH 5,0 и термостатировали при 100 °C в течение часа. После центрифугирования (10000 g, 6 мин, 20 °C) отделяли супернатанты, а к осадку повторно добавляли оксалат аммония и проводили термостатирование, после чего вновь центрифугировали. Супернатанты, отобранные после первого и второго центрифугирования, объединяли; содержащиеся в них полисахариды осаждали четырьмя объемами 96 % этанола. Осадки полисахаридов дважды промывали 80 % этанолом и растворяли в деионизированной воде перед нанесением на колонку.

Полученные фракции буфер-экстрагируемых и оксалат-экстрагируемых полисахаридов хроматографировали на колонке с сефарозой CL-4B (Pharmacia, Швеция) (12×400 мм) при скорости 0,25 мл/мин; объем собираемых фракций составлял 1 мл. В качестве элюента использовали 10 мМ пиридин-уксуснокислый буфер (pH 4,5). Количество углеводов в каждой фракции определяли фенольным методом по Дюбуа (Dubois *et al.*, 1956).

Для определения моносахаридного состава отбирали фракции буфер-экстрагируемых полисахаридов, полученные после разделения на колонке с сефарозой CL-4B, соответствовавшие объемам элюции 13 – 23 мл (фракция 1) и 25 – 33 мл (фракция 2) с вычетом мертвого объема (8 мл). После высушивания аликвот (соответствовавших 40 мкг углеводов) этих фракций, полученные осадки растворяли в 500 мкл 2 М трифторуксусной кислоты (ТФУ) и термостатировали при 120°C в течение 1 часа. После гидролиза образцы высушивали в токе воздуха при 60°C и растворяли в деионизированной воде. Разделение и определение моносахаридов проводили при помощи высокоэффективной анионообменной хроматографии (система DX-500, Dionex, США) на колонке CarboPac PA-1 (4×250 мм, Dionex, США) с использованием электрохимического детектора в режиме пульс-амперометрии (ED 40, Dionex, США). В качестве элюентов использовали: А – 0,015 М NaOH; В – 1М NaOAc в 0,1 М NaOH. Хроматографию осуществляли при температуре колонки 30 °C и скорости элюирования 1 мл/мин.

Градиентное элюирование проводили следующим образом: 0 – 20 мин – 100 % А; далее линейный градиент по схеме: 20 – 21 мин – до соотношения элюентов А:В = 90:10 %; 21 – 31 мин – до соотношения элюентов А:В = 70:30 %, после этого промывка и уравнивание колонки в режиме 100 % В – 10 мин, 100 % А – 30 мин. Количественную оценку содержания углеводов проводили с помощью калибровочных кривых для каждого из анализируемых соединений и программного обеспечения PeakNet. Анализ каждого образца проводили в двух повторностях.

2.13. Проведение иммуноцитохимической реакции с антителами LM19 и INRA-RU

Иммуноцитохимическую реакцию проводили на полутонких (1 – 2 мкм толщиной, для флуоресцентной микроскопии) и ультратонких (около 300 нм толщиной, для электронной микроскопии) срезах стеблей контрольного и инфицированного растений табака. Образцы готовили, как описано в пункте 2.6, за исключением того, что использовали пониженную концентрацию и продолжительность воздействия OsO_4 (0,5 %, 1 час), а пропитку проводили в смоле LR White (LR White Resin, Medium Grade Acrylic Resin, TED PELLA INC, Cat.No. 18181). Проведение иммуноцитохимических реакций осуществляли со следующими антителами:

Первичные антитела:

1. Моноклональное антитело INRA-RU1 (мышинные IgM) (Ralet *et al.*, 2010), любезно предоставленное Fabienne Guillon из г. Нант (Франция), выявляет остов рамногалактуронана I. Для связывания антитела с субстратом необходимо шесть дисахаридных повторов $[\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rha-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalA-(1}\rightarrow]_7$.

2. Моноклональное антитело LM19 (крысиные IgM), которое распознает эпитоп $\alpha\text{-GalA(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-GalA(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-GalA(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-GalA}$, использовали для локализации неэтерифицированной гомогалактуроновой кислоты (Verhertbruggen *et al.*, 2009).

Вторичные антитела:

1. Козье анти-мышинное антитело для INRA-RU1 и козье анти-крысиное антитело для LM19, конъюгированные с частицами коллоидного золота размером 5 нм (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ);

2. Козье анти-мышинное антитело для INRA-RU1 и козье анти-крысиное антитело для LM19, связанные с флуоресцеин изотиоцианатом (FITC) (Sigma-Aldrich, USA).

Для иммуноцитохимического анализа ультратонкие срезы на никелевых сетках подвергали следующим процедурам:

(1) проводили блокирование неспецифического связывания антител с использованием 5 % нормальной козьей сыворотки (НКС) (Sigma, США) на TBST буфере, содержащем 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20, в течение 15 мин, при комнатной температуре в камере с высокой влажностью;

(2) инкубировали с первичным антителом (разведение 1:3 для INRA-RU1 и 1:100 для LM19) в TBST буфере, содержащем 0,6 % НКС – 1,5 ч при комнатной температуре;

(3) отмывали в ТВ буфере (20 mM Tris-HCl, pH 8,2; 0,02 % азид натрия) 3 раза;

(4) инкубировали с вторичным антителом, конъюгированным с частицами коллоидного золота, растворенном в ТВ буфере (разведение 1:50), содержащем 0,6 % бычий сывороточный альбумин, в течение 1,5 часов при комнатной температуре;

(5) промывали в ТВ буфере и дистиллированной воде;

(6) проводили усиление частиц золота серебром с использованием BB International Silver Enhancing Kit (Ted Pella) в течение 5 мин (Hainfield, Powell 2000).

(7) контрастировали 2 % водным раствором уранилацетата (Tandler, 1990) в течение 15 мин и цитратом свинца в течение 6 минут (Reynolds, 1963).

Образцы просматривали на трансмиссионном электронном микроскопе модели JEOL 1200 EX, при рабочем напряжении 80 кВ.

Для иммуноцитохимического анализа на полутонких срезах проводили следующие процедуры:

(1) проводили блокирование неспецифического связывания антител инкубацией в 3 % растворе бычьего сывороточного альбумина (БСА) в 0,1 М фосфатном буфере (pH 7,2) – 1 час, при комнатной температуре;

(2) инкубировали с первичным антителом в 0,1 М фосфатном буфере, содержащем 0,06 % БСА (разведение 1:2 для INRA-RU1 и 1:10 для LM19) в течение 1 часа, при комнатной температуре;

(3) промывали 3 раза в 0,1 М фосфатном буфере;

(4) инкубировали с вторичным антителом в 0,1 М фосфатном буфере, (pH 7,2) в течение 1 часа, при комнатной температуре в темноте.

Образцы просматривали с помощью лазерного конфокального флуоресцентного микроскопа (LSM 510 Meta; Carl Zeiss, Jena, Германия) с использованием аргонового лазера при длине волны возбуждения 488 нм и эмиссии 503 – 550 нм.

В качестве контроля сетки со срезами исследуемых образцов подвергали обработке только вторичными антителами.

2.14. Анализ фенольных соединений с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)

Выделение фенольных соединений проводили из фракций буфер-экстрагируемых полисахаридов стеблей контрольных (неинфицированных) и инфицированных *Pba* (двое суток после инфицирования) растений, а также фракций, полученных аналогичным способом из клеток *Pba*, выращенных *in vitro* (бактерии культивировали как описано в разделе 2.2). В качестве исходного материала использовали либо 3 г растительных тканей, либо около 3×10^{10} клеток *Pba* (это количество примерно в 5 раз превышает количество клеток патогена в 3 г инфицированного растения). Буфер-экстрагируемую

фракцию полисахаридов выделяли, как описано в разделе 2.12.

Полисахариды буфер-экстрагируемой фракции растворяли в деионизированной воде, после чего к раствору добавляли КОН до 4 N концентрации и инкубировали в течение 12 часов при комнатной температуре. Затем pH раствора доводили до pH 1,0 с помощью соляной кислоты. После высушивания образцов фенольные соединения экстрагировали 80 % метанолом в течение 30 минут при 80 °C. Далее образцы центрифугировали (12000 g, 15 мин); супернатант отбирали, высушивали при 30 °C; образцы растворяли в 80 % метаноле перед нанесением на колонку.

Анализ фенольных соединений проводили с помощью хроматографической системы BioLogic DuoFlow Pathfinder (Bio-Rad, США) на колонке SYNERGI 4u Polar-RP (Phenomenex Inc, США). Элюцию соединений проводили в градиенте метанола (10 – 60 %). Поглощение регистрировали при длине волны 260 нм. Скорость элюции составляла 0,5 мл/мин. В качестве стандартов использовали галловую кислоту, хлорогеновую кислоту, эпикатехин, феруловую кислоту, кумаровую кислоту, рутин, кверцитрин, кверцитин.

2.15. Детекция активных форм кислорода на срезах растений с помощью витального красителя 2',7'-дихлорофлуоресцин диацетата

Для детекции активных форм кислорода сделанные вручную срезы стеблей контрольных и инфицированных *Pba* растений (двое суток после инфицирования) обрабатывали 10^{-5} М раствором 2',7'-дихлорофлуоресцин диацетата (2',7'-Dichlorofluorescein diacetate, Sigma, США) в 0,1 М Na-фосфатном буфере, pH 7,4 в соответствии с рекомендациями производителя. Далее срезы трижды промывали тем же буфером, переносили на предметные стекла и анализировали с помощью лазерного конфокального флуоресцентного микроскопа (LSM 510 Meta; Carl Zeiss, Jena, Germany) при длине волны возбуждения 488 нм и эмиссии 503 – 550 нм.

Для проверки специфичности детекции АФК при помощи 2',7'-

дихлорофлуоресцин диацетата часть срезов растений перед окрашиванием течение 30 – 60 минут обрабатывали супероксиддисмутазой или каталазой (Sigma, США) в концентрациях 0,67 мг/мл и 0,038 мг/мкл, соответственно.

2.16. Статистическая обработка данных

Статистический анализ данных проводили с применением стандартных математических методов (расчет среднеквадратического отклонения, сравнение средних по критерию Стьюдента) средствами программ Microsoft Excel-2000. Критерий вероятности $P < 0,05$ принимали достаточным для достоверной разницы опытной и контрольной групп данных.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

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

В настоящей работе в качестве модели нами была использована патологическая система, включающая растения табака (*Nicotiana tabacum* сорт «Hawana») и фитопатогенную бактерию *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 (*Pba*). Этот штамм микроорганизма проявлял вирулентность в отношении растений табака. После нанесения бактериальных клеток на поверхность растения (пазуха листа в середине стебля) у хозяина происходило развитие симптомов заболевания. Через 1 – 2 суток после инфицирования в среднем у 70 % растений в области инфицирования морфологически выявлялась зона, в которой происходила мацерация тканей и некроз клеток (рис. 1Б). Размер этой зоны со временем увеличивался, и границы поврежденной ткани распространялись по стеблю в обоих направлениях. Через 4 – 5 суток растения погибали (рис. 1, В). Около 30 % растений не проявляли симптомов заболевания после инфицирования *Pba*; их анализ проводили дифференцировано от основной массы инфицированных растений (см. раздел 3.3.5).

Первым из охарактеризованных параметров при описании исследуемой патосистемы был учет титра клеток *Pba in planta*, а также в растительных остатках после гибели растения-хозяина. Для этого было использовано два подхода: подсчет титра колониеобразующих единиц (КОЕ) и титра геномных копий (ГК) с помощью количественного ПЦР-анализа. В качестве контроля при определении титров клеток *Pba in planta* были использованы неинфицированные растения табака; в этом случае титры КОЕ и ГК всегда были ниже детектируемых значений.

В первые трое суток после инокуляции количество клеток *Pba* в растениях табака, определяемое по показателям титров как КОЕ, так и ГК возрастало более чем на четыре порядка величин (рис. 2). Далее до девятих суток количество клеток бактерий не изменялось. Для того чтобы оценить



Рис. 1. Внешний вид растений табака (*Nicotiana tabacum*), инфицированных *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043. А – контрольное неинфицированное растение. Б, В – растения через двое и пять суток после инфицирования, соответственно.

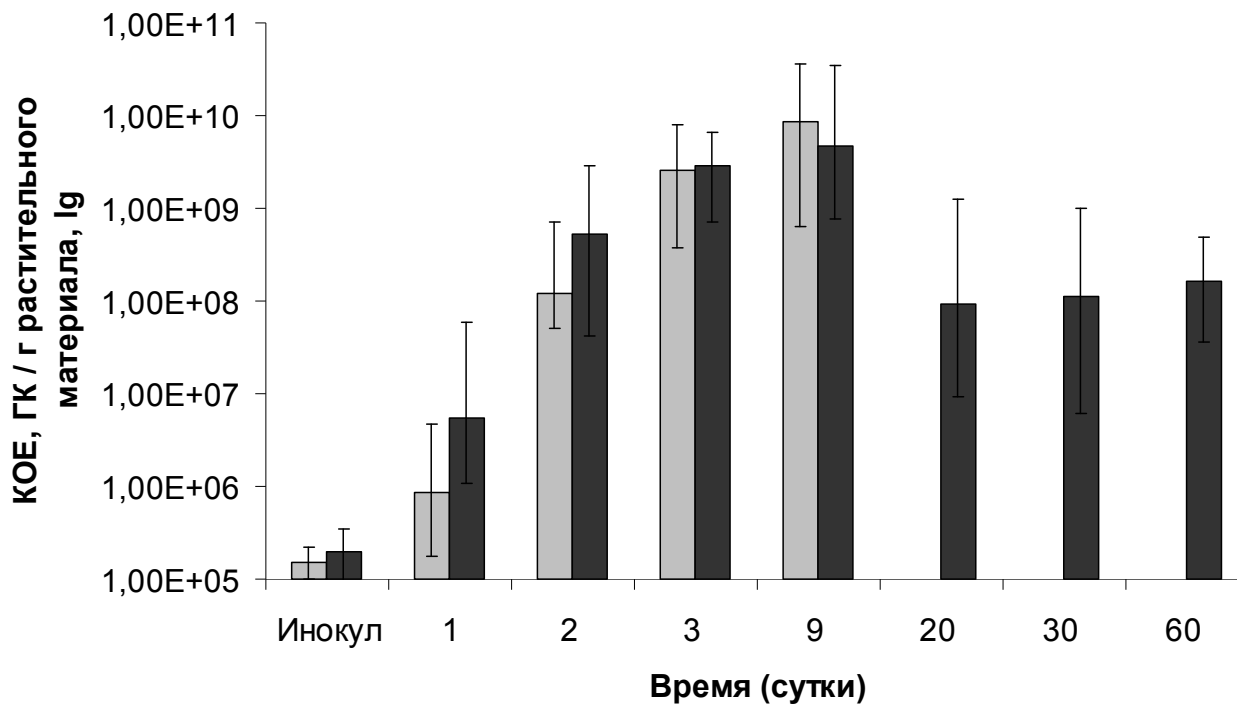


Рис. 2. Динамика титров КОЕ (серые столбцы) и геномных копий (черные столбцы) *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 в растении-хозяине (*Nicotiana tabacum*). Инокул – количество клеток в инокуляте (в 10 мкл). Представленные значения являются медианами, рассчитанными по четырем независимым экспериментам в четырех биологических повторностях. В качестве разбросов указаны 0,025 и 0,975 перцентили.

изменение титра клеток патогена в растительных остатках, определение показателей титров КОЕ и ГК проводили вплоть до 60-х суток после инфицирования. С 20-х до 60-х суток титр КОЕ снижался до недетектируемых значений. При этом титр ГК сохранялся на значительном уровне и составлял $9,4 \times 10^7 - 1,6 \times 10^8$ ГК/мл (рис. 2).

Сохранение высоких значений титра ГК при нулевом титре КОЕ может быть связано либо с гибелью популяции *Pba*, но сохранением бактериальной ДНК в растительных тканях, либо с переходом микробных клеток в жизнеспособное, но некультивируемое состояние. Первая причина представляется маловероятной в связи с тем, что 1) разрушение клеток растений и гибель бактериальных клеток привели бы к высвобождению большого количества нуклеаз, что способствовало бы разрушению ДНК и динамичному снижению титра ГК; 2) гибель бактериальной популяции после гибели хозяина противоречит представлениям об экологии патогенных бактерий, так как завершение популяционного цикла микробов в рамках онтогенетического развития организма хозяина связано с расселением микроорганизмов и/или их переходом в покоящееся состояние.

Одна из форм покоя бактериальных клеток сопряжена с их переходом в жизнеспособное, но некультивируемое состояние, в котором они теряют способность формировать колонии на стандартных питательных средах. После специальных процедур «оживления», т.е. выведения клеток из состояния покоя, эта способность восстанавливается (раздел 1.2). Поскольку некультивируемые формы *Pba* были ранее описаны *in vitro* (Горшков и др., 2009), мы предположили возможность перехода клеток *Pba* в это состояние *in vivo* после гибели растения-хозяина. Для проверки этого предположения нами был смоделирован ряд процедур «оживления» клеток на основе опубликованных ранее протоколов.

Первая процедура, которая была ранее продемонстрирована как эффективная для *Pba* (Горшков и др., 2009), заключалась в отмывке клеток (гомогената остатков инфицированных растений) в безуглеродной среде и

дальнейшем высеве на питательную среду. Согласно второй, гомогенат остатков инфицированных растений инкубировали в течение двух суток в жидкой питательной среде, после чего также проводили бактериальный высев (Шлеева и др., 2003). Третья процедура заключалась в инфицировании некультивируемыми клетками интактных растений: при этом гомогенаты остатков инфицированных растений наносили на стерильные растения (Grey, Steck, 2001). В рамках четвертой процедуры, остатки инфицированных растений замораживали и выдерживали при температуре -18°C в течение месяца. Затем образцы оттаивали при комнатной температуре. Одну часть образца рассевали на питательную среду через 2 часа после оттаивания, а другую – через двое суток. Перед проведением процедур «оживления» часть растительного дебриса от каждого из проанализированных образцов высевали на питательную среду и подтверждали отсутствие в них пролиферативно активных клеток *Pba* до этапа «оживления».

После проведения первого варианта «оживления» восстановление колониеобразующей способности клеток *Pba* происходило, но лишь в трех из 26 проанализированных образцов. Второй и третий варианты вовсе не приводили к ожидаемому эффекту.

Поскольку ареал распространения *Pba* включает зоны умеренного климата, природные популяции этого патогена подвержены сезонным циклам и воздействию отрицательных температур. Поэтому, мы предположили, что стресс при цикле замораживания-оттаивания клеток может имитировать естественную ситуацию и стимулировать выход клеток из покоящегося состояния. Действительно, после замораживания-оттаивания (четвертый вариант процедуры «оживления»), в 10-ти из 30-ти проанализированных образцов титр клеток восстанавливался с нулевых значений до $5,3 \times 10^3$ – $1,7 \times 10^6$ КОЕ/грамм. При этом для половины из этих образцов восстановление титра колониеобразующих единиц происходило в течение первых двух часов после оттаивания.

В случаях, когда процедура «оживления» приводила к восстановлению титра КОЕ в анализируемых образцах, 10 случайно выбранных колоний типировали при помощи ПЦР с праймерами и зондами, специфичными для ДНК *Pba* (Gorshkov *et al.*, 2014). Все проанализированные таким образом колонии соответствовали *Pba*.

Для проверки того, приводит ли обратимый переход клеток *Pba* в некультивируемое состояние к необратимому изменению вирулентности бактерий пять колоний, сформировавшихся после «оживления» некультивируемых клеток *Pba*, инокулировали в питательную среду, культивировали в течение 16 часов, и полученные культуры использовали для инфицирования растений. Все протестированные таким образом культуры проявляли вирулентность на уровне лабораторных культур, выращенных на полноценных питательных средах. Следовательно, после реверсии некультивируемых клеток *Pba* в пролиферативно активное состояние вирулентность бактерий сохранялась.

Таким образом, нами продемонстрировано, что завершение популяционного цикла *Pba* в организме растения сопряжено с переходом бактериальных клеток в жизнеспособное, но некультивируемое состояние. В пользу того, что восстановление титра КОЕ *Pba* в растительных остатках связано именно с «оживлением» покоящихся клеток, а не с делением единичных бактерий, сохранивших пролиферативную активность, свидетельствует ряд фактов. Во-первых, при процедуре «оживления» были использованы только образцы, для которых было экспериментально подтверждено отсутствие культивируемых клеток в начале эксперимента. Во-вторых, в ряде образцов восстановление титра КОЕ происходило очень динамично. Так, в некоторых вариантах титр КОЕ возрастал с нулевых значений до $5,3 \times 10^3$ – $1,7 \times 10^6$ / грамм за два часа. Такая динамика соответствует 12 – 20 делениям, или делению каждые 6 – 10 мин, что, безусловно, превышает физиологические возможности *Pba*. В-третьих, дополнительного субстрата, способствующего восстановлению

пролиферативной активности клеток, при процедурах «оживления» не добавляли (за исключением второго и третьего варианта, в результате которых восстановления пролиферативной активности бактериальных клеток не происходило).

Пектобактерии принадлежат к одним из наиболее интенсивно изучаемым фитопатогенам вследствие их значительной вредоносности. При этом большинство исследований сосредоточено на расшифровке механизмов регуляции их вирулентности. Способы выживания этих бактерий вне организма хозяина остаются наименее изученным аспектом их экологии (Charkowski *et al.*, 2012). Обнаруженное нами образование некультивируемых форм *Pba* в растительных остатках в рамках популяционного цикла в организме хозяина, по всей вероятности, отражает одну из стратегий переживания вневегетационного периода в естественных условиях, в том числе при воздействии отрицательных температур.

3.2. Фенотипическая разнородность клеток *Pba*: влияние условий культивирования на ультраструктуру бактерий

Одна из ключевых адаптивных стратегий микроорганизмов связана с формированием специализированных клеточных форм, приспособленных к определенным внешним условиям (раздел 1.2). Организм растения-хозяина, состоящий из множества клеток, различающихся по физико-химическим, трофическим и иммунным свойствам, представляет собой очень сложную и динамичную среду для эндофитных микроорганизмов. Поэтому мы предположили, что способность к формированию альтернативных клеточных форм, адаптированных к условиям разных «компарментов» растения-хозяина, может быть важным аспектом, обеспечивающим формирование растительно-микробных патосистем. Для того чтобы оценить потенциальную способность пектобактерий к формированию разнородных клеточных форм, мы сравнили ультраструктуру клеток *Pba* в ряде модельных культур *in vitro*.

В нашей лаборатории разработано несколько тестовых систем, в рамках которых охарактеризовано изменение различных физиологических параметров клеток *Pba* (продуктивности синтеза факторов вирулентности, устойчивости к различным стрессовым факторам, интенсивности экспрессии генов, определяющих вирулентность и стрессоустойчивость). В настоящем исследовании с использованием этих тест-систем мы проанализировали возможность модификации ультраструктуры клеток *Pba* при изменении их физиологического статуса. При этом оценивали морфологию клеток *Pba*, культивированных 1) в присутствии метаболитов растения-хозяина; 2) в условиях голодания при различных плотностях бактериальной популяции.

Известно, что присутствие в среде метаболитов растений влияет на сенсорно-регуляторные системы фитопатогенных бактерий, что приводит к активации продукции факторов вирулентности. Так, пектиновые вещества служат для пектобактерий не только ростовым субстратом, но и активаторами синтеза экстраклеточных ферментов, разрушающих клеточную стенку растений. Роль индукторов экстраклеточной пектатлиазной активности *Pba* также играют водорастворимые, низкомолекулярные метаболиты растений, химическая структура которых пока не расшифрована. Действие этих метаболитов и пектиновых веществ синергичное, поскольку максимальный уровень пектатлиазной активности был зафиксирован при культивировании бактерий на пектине в присутствии низкомолекулярной фракции водного экстракта растений (Tarasova *et al.*, 2013).

В наших исследованиях мы проанализировали, сопряжена ли подобная индукция синтеза ключевых факторов вирулентности с изменениями в ультраструктуре клеток *Pba*. В качестве контролей были использованы клетки *Pba*, выращенные в стандартных условиях: на полноценной питательной среде Luria-Bertani (LB), а также на минеральной среде IM, дополненной пектином (0,2 %; Sigma, США) в качестве источника углерода.

Клетки *Pba*, выращенные на среде LB, как и ожидалось, имели типичную ультраструктуру (Горшков и др., 2009; Petrova *et al.*, 2014):

палочковидную форму, размер $0.8-1.0 \times 2.3-2.5$ мкм, хорошо выраженную наружную и цитоплазматическую мембраны, диффузно расположенный нуклеоид и узкое периплазматическое пространство (рис. 3А). Такая же ультраструктура была характерна для клеток, выращенных на среде ИМ (данные не представлены).

Добавление в среду культивирования бактерий водорастворимых низкомолекулярных метаболитов растений приводило к изменениям в ультраструктуре клеток *Pba* (рис. 3Б). Цитоплазма клеток становилась менее электроноплотной; в ней в меньшей степени выявлялись конденсированные зоны в области нуклеоида, чем в клетках, выращенных на средах LB и ИМ. На периферии клеток, культивированных в присутствии растительного экстракта, выявлялись небольшие везикулярные образования (рис. 3Б, В). По ультраструктуре эти образования напоминали мембранные везикулы, широко описанные для многих представителей про- и эукариот. В литературе мембранные везикулы рассматриваются как многофункциональные структуры, ответственные за транспортировку белков, токсинов, нуклеиновых кислот, факторов вирулентности и т.д. (McBroom, Kuehn, 2007; Ellis, Kuehn, 2010; Deatherage, Cookson, 2012). Вероятно, что в случае, описываемом нами, подобные везикулы увеличивают интенсивность транспорта экстраклеточных ферментов при их сверхпродукции. Как указывалось выше, сверхпродукция экстраклеточных ферментов при культивировании *Pba* в присутствии низкомолекулярных метаболитов растения-хозяина была описана ранее (Tarasova *et al.*, 2013).

Другой особенностью клеток *Pba*, культивируемых в присутствии низкомолекулярных метаболитов хозяина, было увеличение размера периплазматического пространства. Эта особенность ультраструктуры, вероятно, также может быть связана с высокой продуктивностью синтеза пектатлиаз клетками *Pba*. Разложение пектиновых веществ пектобактериями происходит в несколько стадий. На первой стадии, ферменты, расщепляющие поли- и олигосахариды, транспортируются из цитоплазмы в

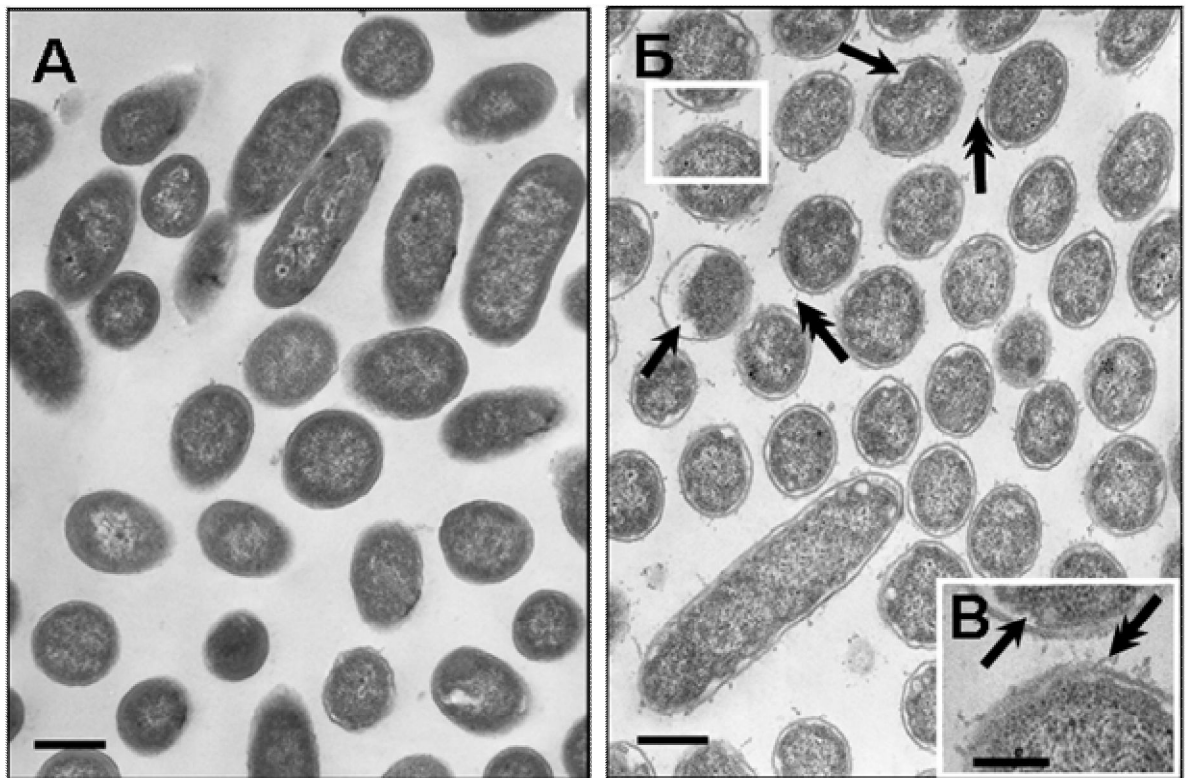


Рис. 3. Трансмиссивная микрография срезов клеток *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043. **А** – клетки, выращенные на среде LB; масштабная линейка 0,5 мкм. **Б** – клетки, выращенные на среде IM, содержащей 0,2% пектина (Sigma) и метаболиты низкомолекулярной фракции водного экстракта растительных тканей; масштабная линейка 0,5 мкм. **В** – увеличенный фрагмент, выделенный на рисунке Б; масштабная линейка 0,2 мкм. Стрелкой обозначено увеличенное периплазматическое пространство. Двойная стрелка указывает на везикулярные образования.

периплазматическое пространство с помощью основного секреторного пути. Часть этих ферментов из периплазмы секретируется в окружающую среду. Экстраклеточные ферменты микроорганизмов приводят к деполимеризации сложных полисахаридов растения и образованию олигомерных продуктов, которые транспортируются в периплазму бактериальных клеток. Олигомеры, в свою очередь, разрушаются до ди- и тримеров с помощью ферментов, локализованных в периплазматическом пространстве. После этого низкомолекулярные олигосахариды переносятся в цитоплазму и окисляются в процессе дыхания (Salmond, 1994; Lory, 1998; Corbett *et al.*, 2005; Davidsson *et al.*, 2013). Учитывая то, что добавление низкомолекулярных метаболитов растений приводит к максимальной индукции пектатлиазной активности в культурах *Pba* (Tarasova *et al.*, 2013), в среде культивирования должно накапливаться большое количество олигомерных продуктов распада пектиновых веществ. Поскольку олигомеры уроновых кислот активно транспортируются в периплазму, представляется вероятным, что увеличение объема этого компартмента способствует формированию «резервуара» для накопления промежуточных продуктов распада субстрата, которые запасаются для длительного поддержания метаболизма клеток.

Формирование «особых» клеточных морфотипов бактерий часто происходит при неблагоприятных условиях существования и рассматривается как один из аспектов стрессового ответа. Значительное количество исследований посвящено описанию ультраструктуры клеточных форм, образующихся в стрессовых условиях. К таким формам относятся цистоподобные клетки, микромумии, некультивируемые формы, протопласты и сферопласты (раздел 1.2).

Согласно традиционной концепции, одной из первых стадий стрессового ответа бактерий является остановка роста. Однако, как было показано на примере *Pba* (Gorshkov *et al.*, 2010) и ряде других микроорганизмов (неопубликованные данные), стресс, вызванный голоданием, может быть сопряжен с активацией клеточного деления. Такая

форма стрессового ответа характерна для популяций низкой плотности – 10^2 – 10^5 клеток/мл, которая ниже пороговой, необходимой для индукции системы межклеточной коммуникации.

В нашей работе мы проанализировали, сопряжены ли разные стратегии адаптации к недостатку субстрата, связанные с индукцией и с репрессией роста, с формированием разнородных клеток, различающихся по ультраструктурным характеристикам. Для решения этой задачи были проведены эксперименты, в которых клетки *Pba* инкубировали в безуглеродной среде с различным титром инокуляции (10^4 и 10^8 КОЕ/мл) в течение четырех суток, после чего анализировали их морфологию. В этот период титр клеток в культурах, инокулированных с высокой плотностью популяции снижался в 20 раз и составлял 5×10^6 КОЕ/мл. В свою очередь, в культурах низкой плотности популяции, титр клеток увеличивался за четверо суток в 100 раз до значений $1,1 \times 10^6$ КОЕ/мл.

Голодающие культуры высокой плотности инокуляции состояли из клеток различной морфологии. Они имели разную форму (палочковидную, сферическую). Их средний размер отличался от вегетативных клеток, культивируемых на богатой среде, и составлял $0,5 - 0,7 \times 1,0 - 2,0$ мкм. Цитоплазма у одного морфотипа голодающих клеток была более разрыхленная, менее электроноплотная и равномерно распределенная по всему объему клеток (рис. 4Б). Другой морфотип клеток имел более электроноплотную цитоплазму, сконденсированную в центральной части клетки и окруженную обширным периплазматическим пространством (рис. 4Б). Кроме того, в культурах высокой плотности присутствовали «клетки-призраки», не содержащие цитоплазму и, по всей вероятности, являющиеся мертвыми, а так же клеточный дебрис (рис. 4Б).

Культуры, голодающие при низком начальном титре, так же содержали несколько клеточных морфотипов, различающихся по ультраструктуре (рис. 4В). Размер клеток составлял $0.4 - 0.5 \times 0.7 - 1.2$ мкм. У части клеток цитоплазма располагалась равномерно в клеточном объеме и

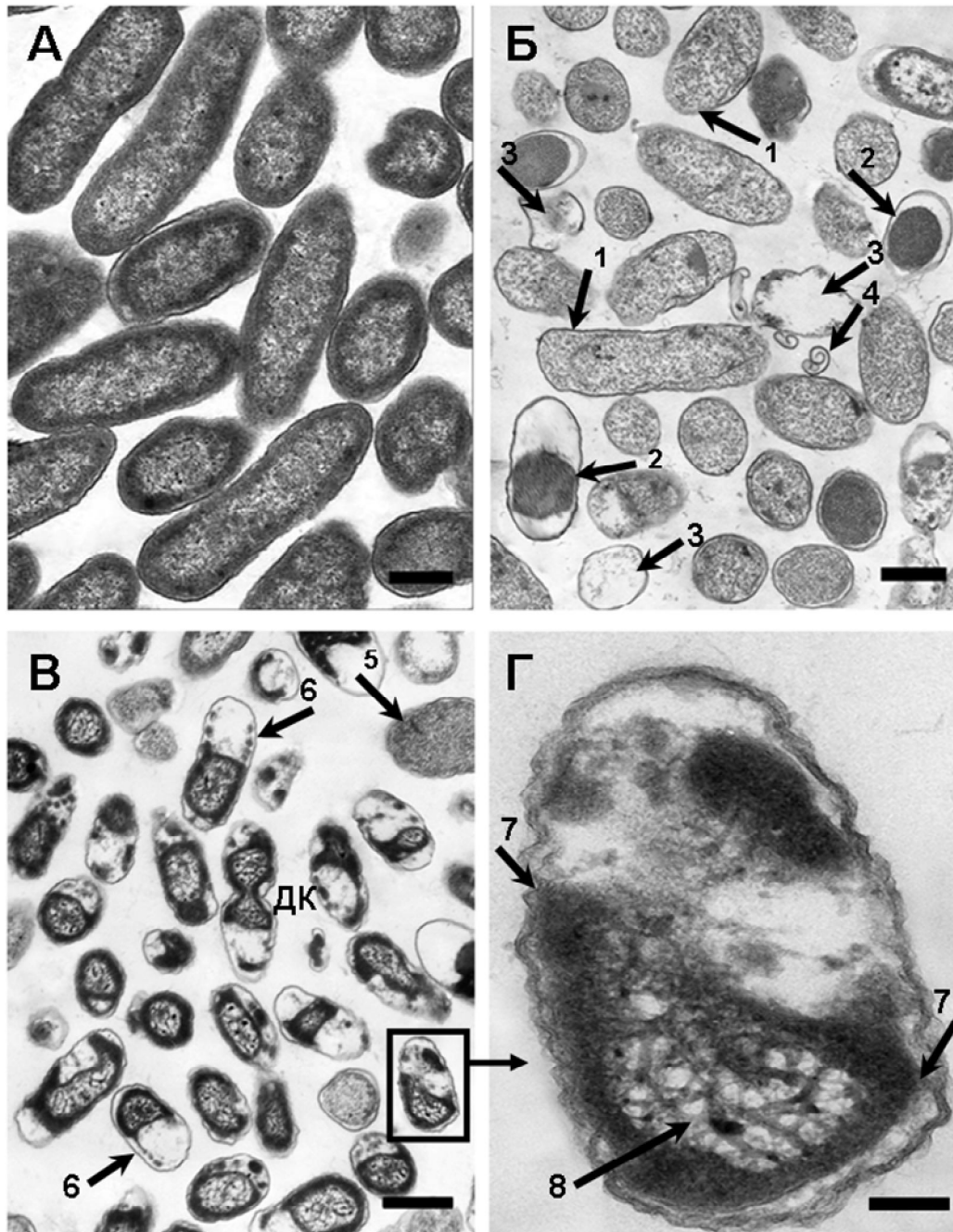


Рис. 4. Трансмиссивная микрография срезов клеток *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043. А – вегетативные клетки, выращенные на среде LB; масштабная линейка 0,5 мкм. Б – клетки, инкубированные в течение четырех суток в безуглеродной среде АВ при высоком титре инокуляции (10^8 КОЕ/мл): 1 – клетки с гранулярной и менее электроплотной цитоплазмой; 2 – клетки с более электроплотной цитоплазмой и увеличенным периплазматическим пространством; 3 – «клетки-призраки»; 4 – клеточный дебрис; масштабная

линейка 0,5 мкм. **В** – клетки, инкубированные в течение четырех суток в среде АВ при титре инокуляции 10^4 (КОЕ/мл): **5** – клетки с гранулированной и менее электроноплотной цитоплазмой; **6** – клетки с расширенным периплазматическим пространством, электроноплотной цитоплазмой и конденсированным нуклеоидом; **ДК** – делящаяся клетка; масштабная линейка 0,5 мкм. **Г** – увеличенный фрагмент, выделенный на рисунке В: **7** – зона мембранной адгезии; **8** – нуклеоид; масштабная линейка 0,1 мкм.

характеризовалась небольшой электронной плотностью (рис. 4В). Эта фракция клеток была сходна по ультраструктуре с клетками культур, голодающих при высокой плотности популяции. Однако доминирующий морфотип имел существенные морфологические отличия и от вегетативных клеток, и от клеток голодающих культур высокого титра инокуляции. Цитоплазма таких клеток состояла из электроноплотной периферийной области и полупрозрачной центральной зоны, в которой располагался конденсированный нуклеоид (рис. 4В, Г). В большинстве клеток цитоплазма располагалась полярно, перемещаясь к одному из клеточных полюсов (рис. 4Г). Периплазма занимала около половины клеточного объема. Несмотря на значительное увеличение объема периплазмы, относительно объема цитоплазмы, в клетках подобной морфологии сохранялись зоны адгезии мембран – то есть области контакта наружной и цитоплазматической мембран (рис. 4Г).

В голодающих культурах низкой плотности популяции не были обнаружены «клетки-призраки», а так же клеточный дебрис, что свидетельствует об отсутствии интенсивного клеточного лизиса. Клетки этих культур, несмотря на отсутствие питательного субстрата в среде, сохраняли значительный уровень метаболической активности, о чем свидетельствует ряд фактов. Во-первых, в культурах низкой плотности происходило значительное увеличение титра культивируемых клеток (в сто раз). Во-вторых, на электронограмме этих культур нам удавалось обнаружить клетки

доминантного в этих условиях морфотипа (описанного выше) в состоянии деления (рис. 4B). И, в-третьих, наличие зон адгезии мембран, наблюдаемое нами у клеток культур низкого титра даже при условии значительного увеличения относительного объема периплазматического пространства (рис. 4Г), свидетельствует о метаболической активности клеток.

Сохранение зон «стыковки» наружной и внутренней мембран у грамотрицательных бактерий необходимо для поддержания многих метаболических процессов, в частности, транспорта белков и липополисахаридов, деления клеток и т.д. (Lopez, Webster 1985; Joseleau-Petit *et al.*, 1990; Lee, Schneewind, 2001). Следует отметить, что в клетках голодающих культур *Pba*, инокулированных с высокой плотностью, зоны адгезии мембран были выражены в значительно меньшей степени, чем у голодающих культур низкой начальной плотности. Это хорошо согласуется с различиями клеток голодающих культур высокой и низкой плотности по физиологическим параметрам. У первых формирование стрессового ответа осуществляется согласно общепризнанной схеме: происходит остановка роста, лизис части популяции, снижение метаболической активности клеток и образование покоящихся форм (Petrova *et al.*, 2014). Эти процессы регулируются на популяционном уровне при участии межклеточной коммуникации, и поэтому для их запуска требуется высокая концентрация клеток.

В голодающих культурах низкого титра инокуляции плотность популяции недостаточна для осуществления межклеточной коммуникации и запуска стрессового ответа. Поэтому, вероятно, инициация адаптивного ответа у таких культур связана с «воссозданием» популяции, а именно делением клеток до достижения определенной их концентрации, которая соответствует пороговой для индукции системы межклеточной коммуникации (Gorshkov *et al.*, 2010). Не вызывает сомнения, что клеточное деление сопровождается активным метаболизмом, о чем, в частности, свидетельствует проведенный нами анализ их ультраструктуры. Однако до

сих пор остается открытым вопрос о субстрате(ах), поддерживающем активный метаболизм клеток в условиях голодания. По всей вероятности, в качестве источников энергии в этом процессе служат запасные вещества и другие компоненты цитоплазмы и клеточной оболочки.

Наблюдаемые нами изменения в ультраструктуре клеток, как при голодании, так и в условиях, индуцирующих синтез факторов вирулентности, сопровождались модификацией клеточной оболочки, а именно увеличением объема периплазматического пространства относительно цитоплазмы. Это свидетельствует о важной роли модификации этого клеточного компартмента в приспособительном ответе клеток к внешним условиям. Непропорциональное изменение объема протопласта и клеточной оболочки в условиях голодания сопряжено с увеличением относительного объема периплазмы. Это может обеспечить, с одной стороны, большую «изоляцию» протопласта от неблагоприятных факторов. С другой стороны, это позволяет клеткам сохранить значительный объем и, как следствие, функциональную поверхность для информационного обмена с окружающей средой.

Клеточная оболочка представляет собой не только механический барьер, защищающий клетку от неблагоприятных факторов, но и служит сенсорной поверхностью, передающей сигналы из внешней среды внутрь клетки. Вполне вероятно, что при интенсивной утилизации компонентов цитоплазмы (в том числе для обеспечения клеточного деления в условиях дефицита субстрата), вызывающей уменьшение ее объема, пропорциональное изменение клеточной оболочки может привести к чрезмерному уменьшению общего функционального объема клетки и сокращению сенсорной поверхности. «Набухание» периплазмы, по всей видимости, позволяет клеткам сохранять эффективный объем, независимо от объема протопласта, что способствует выживанию клеток при голодании.

Таким образом, *Pba* обладает способностью к формированию дифференцированных клеточных морфотипов, различающихся по строению клеточной оболочки, цитоплазмы и нуклеоида. Морфофизиологический

состав популяции *Pba* определяется внешними условиями. Особенности ультраструктуры клеток различных морфотипов *Pba* согласуются с их особыми физиологическими характеристиками. В результате дифференцировки бактериальных клеток, формируется структура популяции, определяемая качественным составом морфотипов и их количественным соотношением.

3.3. Изменения в ультраструктуре клеток табака и *P. atrosepticum*

SCRI1043 при взаимодействии двух организмов

3.3.1. Ранние стадии взаимодействия *P. atrosepticum* SCRI1043 и табака

При постановке экспериментов для характеристики изменений в ультраструктуре клеток табака и *Pba* во избежание возможных артефактов, связанных со способом инокуляции клеток патогена в организм хозяина, процедура инфицирования не включала механического повреждения тканей растения. Бактериальные клетки в объеме 10 мкл наносили на поверхность стерильных растений (в пазуху листа в середине стебля) с помощью автоматической пипетки. Через 18 часов после инфицирования клетки *Pba* можно было обнаружить во внутренней среде растений в зоне инфицирования (рис. 5А-Е). При этом клетки патогена были локализованы в сосудах ксилемы (рис. 5А) и в паренхиме (рис. 5Б-Е). Клетки *Pba* на этой стадии инфекции, независимо от их локализации, имели одинаковую ультраструктуру, сходную с вегетативными клетками, культивируемыми *in vitro*.

Несмотря на то, что *Pba* считается внеклеточным патогеном, неспособным проникать внутрь растительных клеток, бактерии были обнаружены, помимо апопласта (рис 5Б), также внутри паренхимных клеток (рис. 5В-Е). Паренхимные клетки, в которых были обнаружены клетки патогена, имели различную ультраструктуру. В некоторых клетках инвазия патогена не была сопряжена с существенными изменениями в ультраструктуре цитоплазмы и клеточных органелл, за исключением

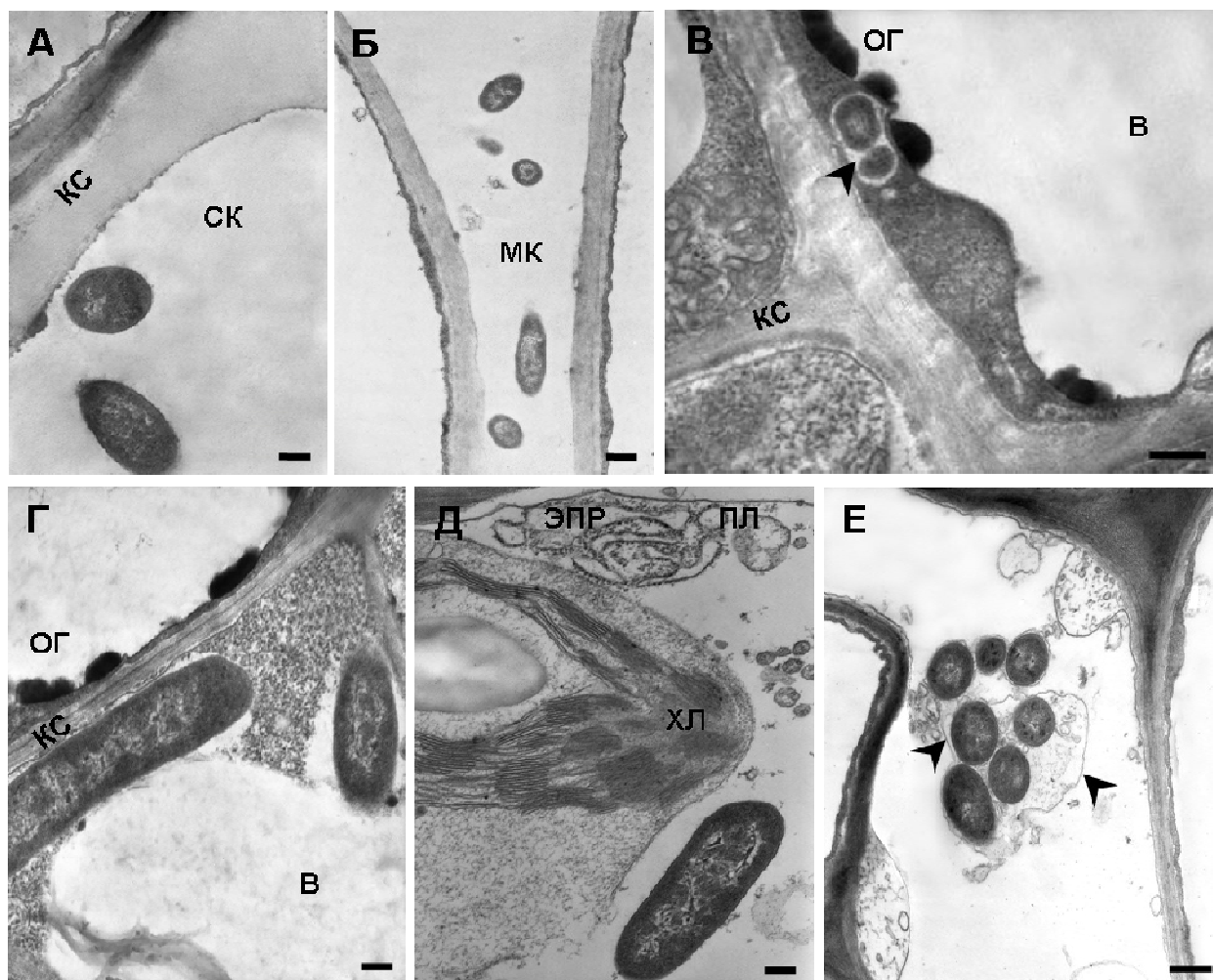


Рис. 5. Ультраструктура клеток *Nicotiana tabacum* и *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 (*Pba*) при взаимодействии двух организмов (ранняя стадия инфекции). На фотографиях представлены срезы стеблей инфицированных растений (18 часов после инфицирования) в зоне инокуляции бактерий. **А** – *Pba* в ксилемном сосуде, масштабная линейка 0,2 мкм. **Б** – *Pba* в межклетнике паренхимы; масштабная линейка 0,5 мкм. **В-Е** – *Pba* внутри паренхимных клеток табака. **В** – формирование осмиофильных глобул (ОГ); стрелкой обозначены бактериальные клетки; масштабная линейка 0,2 мкм. **Г** – разрушение тонопласта; масштабная линейка 0,2 мкм. **Д** – повреждение клеточных органоидов и компатментов; масштабная линейка 0,2 мкм. **Е** – окружение бактериальных клеток мембранными структурами (стрелка); масштабная линейка 0,5 мкм. КС – растительная клеточная стенка; СК – сосуд ксилемы; МК – межклетник; ОГ – осмиофильные глобулы; ПЛ – плазмалемма; В – вакуоль; ХЛ – хлоропласт.

формирования осмиофильных глобул в вакуолях (рис. 5В). В других клетках цитоплазма становилась более разрыхленной, и изменялась структура тонопласта (рис. 5Г). Встречались также клетки, в которых тонопласт не выявлялся, что, по всей вероятности, связано с его разрывом, а клеточные органеллы и компартменты были повреждены: происходило набухание ЭПР, разрушение митохондрий, набухание тилакоидов хлоропластов; был так же выражен плазмолиз (рис. 5Д). В ряде паренхимных клеток цитоплазма и органоиды полностью разрушались, происходила инвагинация и разрыв плазмалеммы. Разрушение плазматической мембраны приводило к образованию везикулярных структур, в которых располагались бактериальные клетки (рис. 5Е). В контрольных неинфицированных растениях описанные ультраструктурные особенности не выявляли.

Формирование обнаруженных везикулярных структур (рис. 5Е), по всей вероятности, представляет собой защитную реакцию макроорганизма, обеспечивающую «изоляцию» клеток патогена. Патоген-индуцируемое образование осмиофильных глобул в вакуолях паренхимных клеток (рис. 5В) также может быть нацелено на подавление патогенного организма. Образование подобных структур в вакуолях, а также в цитоплазме клеток ранее было описано как патоген-индуцируемая защитная реакция растений (Benhamou, 1996; Daayf *et al.*, 1997a). Показано, что взаимодействие осмиофильных глобул со стенками гиф патогенных грибов приводит к разрушению клеток патогена (Cherif *et al.*, 1992). На примере ряда патологических систем с помощью мечения лакказой, конъюгированной с золотом, было продемонстрировано, что компоненты, входящие в состав подобных осмиофильных глобул имеют фенольную природу (Benhamou, 1996; Daayf *et al.*, 1997b). Известно, что вакуоль является «хранилищем» множества вторичных метаболитов, многие из которых выполняют защитную функцию. Развитие инфекции, в свою очередь, может приводить к «активации» (например, окислению), этих метаболитов вследствие изменения их компартментализации, индукции соответствующих ферментов и т.д.

В отличие от клеток паренхимы в сосудах ксилемы в этот период существенных ультраструктурных изменений отмечено не было. Поскольку ксилемные сосуды являются мертвыми клетками, диапазон протекающих в них защитных реакций, значительно уже, чем в физиологически активных паренхимных клетках. В связи с этим, клетки *Pba*, локализованные в сосудах ксилемы и в паренхиме, подвергаются разному по интенсивности воздействию со стороны хозяина. По всей видимости, это и является причиной того, что колонизация клетками *Pba* сосудов ксилемы проходила быстрее, чем паренхимы.

3.3.2. Острая стадия инфекции, вызываемой *P. atrosepticum* SCRI1043, у табака. Формирование бактериальных эмболов

Острая стадия инфекции наступала через двое-трое суток после инфицирования. На этой стадии на растениях появлялась выраженная зона некроза (рис. 1Б). Эта область была интенсивно колонизирована клетками *Pba*. В коровой паренхиме клетки патогена преимущественно заселяли межклетники, однако присутствовали и внутри разрушенных клеток (рис. 6А). Бактериальные клетки, колонизировавшие паренхиму, по ультраструктуре были сходны с вегетативными клетками *Pba* (культивируемыми *in vitro* на полноценных питательных средах) (рис. 6Б). Структура коровой паренхимы была нарушена: полностью разрушались клеточные органоиды и компартменты, а также была выражена мацерация тканей.

В сосудах ксилемы на острой стадии инфекции клетки *Pba* формировали особые структуры, которые были названы нами «бактериальные эмболы» (рис. 6В). 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 клеток: цитоплазма клеток была дифференцирована на электроноплотную

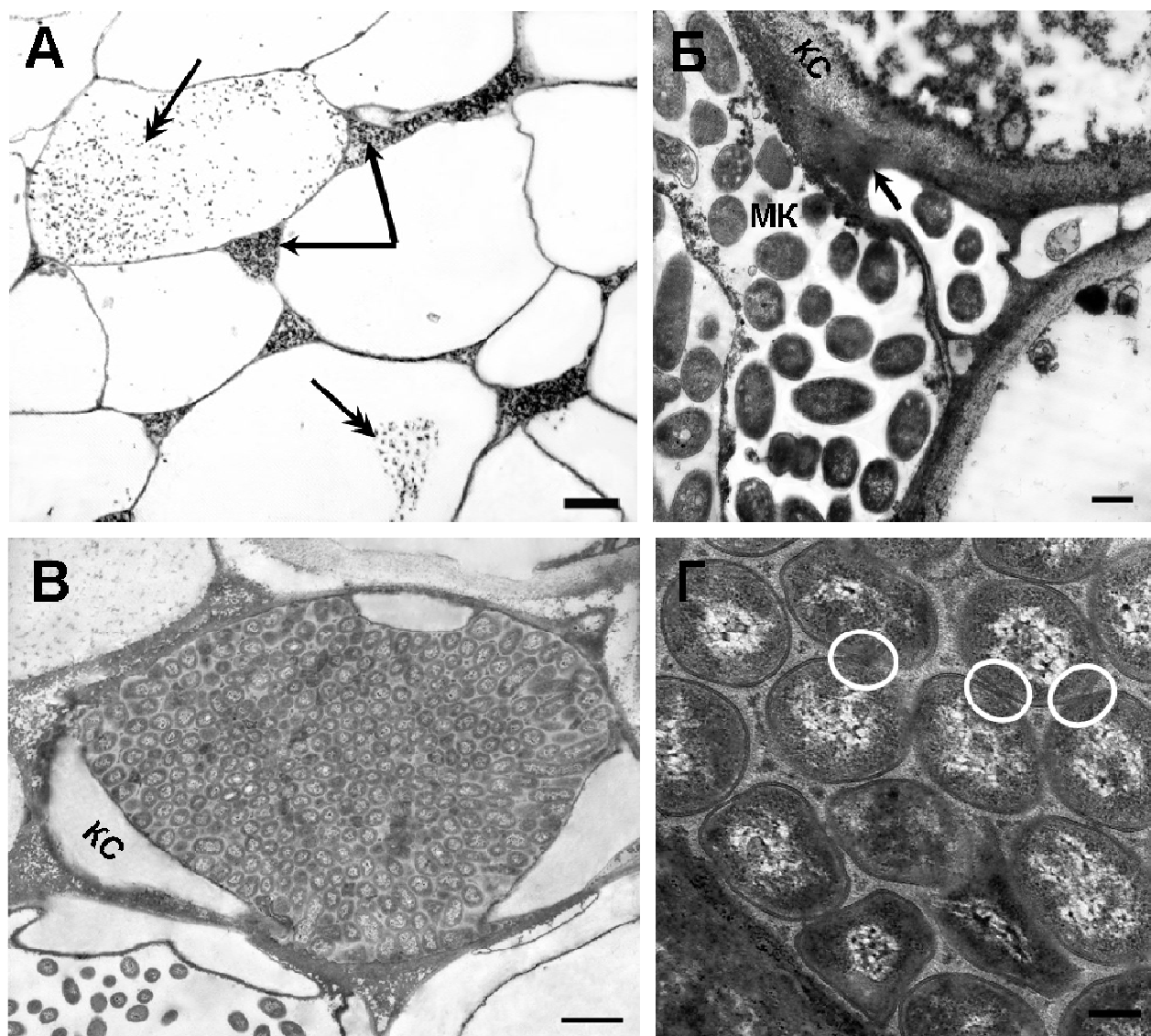


Рис. 6. Ультраструктура клеток *Nicotiana tabacum* и *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 (*Pba*) при взаимодействии двух организмов (острая стадия инфекции). На фотографиях представлены срезы стеблей инфицированных растений (двое суток после инфицирования) в зоне проявления симптомов заболевания. **А** – *Pba* в клетках (двойная стрелка) и межклетниках (стрелка) паренхимы табака; масштабная линейка 20 мкм. **Б** – *Pba* в межклетнике паренхимы, масштабная линейка 0,5 мкм. **В** – бактериальный эмбол из клеток *Pba* в ксилемном сосуде табака; масштабная линейка 2 мкм. **Г** – клетки *Pba* в составе бактериального эмбола, белым овалом выделена зона контакта бактериальных клеток; масштабная линейка 0,2 мкм. КС – растительная клеточная стенка; МК – межклетник.

периферийную зону и менее электроноплотную центральную зону с конденсированным нуклеоидом (рис. 6Г). Были также выражены зоны контактов между соседними клетками, что не было характерно для субпопуляции клеток, колонизировавших паренхиму.

Бактериальные эмболы имеют сходство с микробными биопленками, описанными для многих представителей прокариот, в том числе, для различных фитопатогенных бактерий (раздел 1.2). В то же время, эти два типа структур имеют существенные различия. Во-первых, для биопленок характерно наличие каналов, по которым циркулируют водные растворы, в то время как в бактериальных эмболах подобных каналов нами не обнаружено. Во-вторых, для клеток, формирующих биопленку, не характерна единая простраивенная ориентация, в то время как в составе бактериальных эмболов отдельные клетки бактерий расположены упорядоченно (вдоль продольной оси сосуда) (рис. 7). В-третьих, принципы формирования бактериальных эмболов и биопленок различаются. Начальной и ключевой стадией формирования бактериальных биопленок в сосудах ксилемы является прикрепление микробных клеток к растительной клеточной стенке. Однако на начальных стадиях колонизации сосуда (до сборки бактериального эмбола) клеток *Pba*, прикрепленных к стенке сосуда, выявлено не было.

На начальном этапе колонизации сосудов, когда в люмене присутствовали лишь единичные клетки *Pba*, на внутренней поверхности растительной клеточной стенки накапливалась гранулярная субстанция (рис. 7А). По всей вероятности, эта субстанция не обладала бактерицидным, либо бактериостатическим действием, поскольку не сдерживала размножения бактерий, а также не вызывала изменений в ультраструктуре бактериальных клеток, свидетельствующих об их повреждении. Наряду с увеличением количества бактерий в сосуде, происходило «разрыхление» этой субстанции (рис. 7Б), что в итоге приводило к образованию гелеподобного матрикса (рис. 7В), в котором закреплялись бактерии. Затем происходило «выстраивание» бактериальных клеток вдоль продольной оси ксилемного сосуда (рис. 7Г),

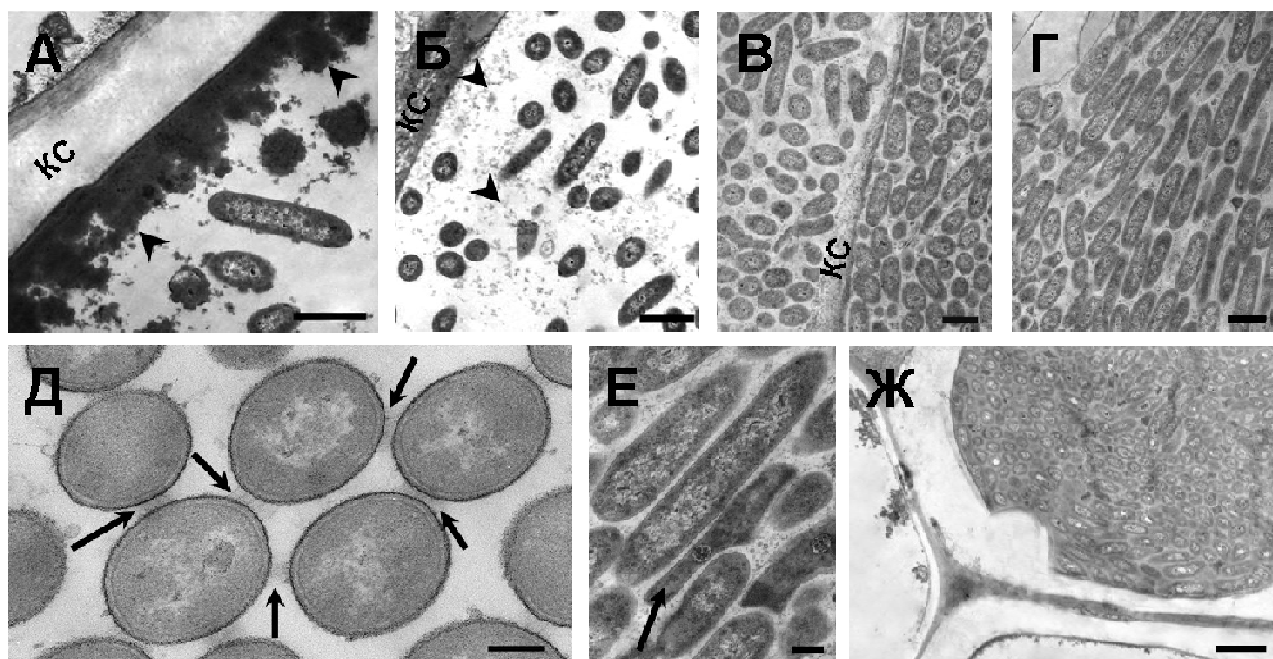


Рис. 7. Стадии колонизации сосудов ксилемы табака (*Nicotiana tabacum*) клетками *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 (*Pba*). На фотографиях представлены срезы стеблей инфицированных растений (двое суток после инфицирования) в зоне проявления симптомов заболевания. **А** – накопление гранулярной субстанции (стрелка) на внутренней поверхности стенок ксилемных сосудов, колонизированных *Pba*; масштабная линейка 1 мкм. **Б** – «разрыхление» гранулярной субстанции (стрелка); масштабная линейка 1 мкм. **В** – образование гелеподобного матрикса в ксилемных сосудах, колонизированных *Pba*; масштабная линейка 1 мкм. **Г** – «выстраивание» клеток *Pba* по продольной оси ксилемного сосуда; масштабная линейка 1 мкм. **Д** – формирование пилеподобных структур (стрелка) на поверхности клеток *Pba*; образец был окрашен по методу Тиери, масштабная линейка 0,2 мкм. **Е** – деформация отдельных клеток *Pba* (стрелка) при формировании бактериального эмбола; масштабная линейка 0,2 мкм. **Ж** – бактериальный эмбол в ксилемном сосуде табака; масштабная линейка 2 мкм. КС – растительная клеточная стенка.

благодаря чему большинство клеток в составе эмбола имело преимущественную пространственную ориентацию.

Помимо общего экстраклеточного матрикса, сформированного, по-видимому, из компонентов растительной клеточной стенки, целостность формирующегося бактериального эмбола обеспечивалась пилеподобными структурами, образующимися на поверхности бактериальных клеток (рис. 7Д). Образование пилеподобных структур происходило не по всей поверхности бактериальных клеток, а локально в области наименьшего расстояния между соседними клетками. С точки зрения анализа их ультраструктуры не вызывает сомнения, что пилеподобные структуры обеспечивают контакт отдельных клеток друг с другом. Однако возможно, что функция этих структур также связана с обменом метаболитами (белками, нуклеиновыми кислотами, сигнальными соединениями) между соседними клетками. Дальнейшее «уплотнение» клеток в ксилемном сосуде, вызывающее даже деформацию отдельных бактерий (рис. 7Е), приводило к полной закупорке люмена сосуда (рис. 7Ж).

Таким образом, нами впервые описаны бактериальные эмболы – структуры, образующиеся в сосудах ксилемы и приводящие к их закупорке. Бактериальные эмболы состоят из плотно расположенных, пространственно ориентированных клеток, имеющих области межклеточных контактов. Формирование бактериальных эмболов не включает стадию прикрепления клеток к поверхности стенки ксилемного сосуда, как в случае бактериальных биопленок, описанных для ряда других фитопатогенных бактерий. «Закрепление» бактериальных клеток в люмене сосуда происходит благодаря формированию гелеподобного матрикса, который образуется из субстанций, высвобождающихся из клеточной стенки растения (рис 7).

Высвобождение субстанций из растительной клеточной стенки в ходе инфекционного процесса обычно связывают с процессом иммобилизации бактерий *in planta* (Huang *et al.*, 1975; Sequeira, Graham, 1977; Goodman, 1978). Изначально иммобилизация рассматривалась как защитная реакция растения

на инокуляцию авирулентными или сапрофитными бактериями (Goodman *et al.*, 1976; Sing, Schroth, 1977; Sequeira *et al.*, 1977; Morgham *et al.*, 1988). Однако оказалось, что этот процесс не всегда связан с устойчивостью растения, поскольку может происходить и в случаях, когда патогенный организм активно размножается в тканях хозяина (Fett, Jones, 1982; Al-Mousawi *et al.*, 1983; Dienelt, Lawson, 1989, Lee *et al.*, 2009).

То, что в разных исследованиях процесс иммобилизации был сопряжен с разным исходом взаимодействия, может быть вызвано рядом причин. Во-первых, иммобилизирующие субстанции растительного происхождения, обнаруженные в ходе разных исследований, могут различаться по своей природе и по-разному влиять на бактерий. Во-вторых, защитное действие этих субстанций может выражаться только при наличии дополнительных факторов. Например, иммобилизация сама по себе не ограничивала распространение *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* в растениях хлопка; но ингибирование роста бактерий в растении происходило, когда иммобилизация была сопряжена с синтезом фитоалексинов (Morgham *et al.*, 1988). В-третьих, влияние иммобилизирующих субстанций на разные виды бактерий может различаться. Например, взаимодействие авирулентных штаммов, дефектных по продукции экзополисахаридов (ЭПС), с иммобилизирующими субстанциями приводит к агглютинации клеток патогена и их элиминации. В то же время, штаммы с нормальной продукцией ЭПС, несмотря на наличие иммобилизирующих субстанций в инфицированном растении, не подвергаются процессу агглютинации, благодаря наличию протекторного слоя на поверхности клетки (Goodman *et al.*, 1976; Benhamou *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 2009).

Особое значение процесс иммобилизации бактериальных клеток *in planta* имеет в сосудах ксилемы, поскольку именно по сосудам, как правило, осуществляется системное распространение бактерий по растению. Считается, что образование гелей в сосудах, а также формирование тилл (выростов клеток ксилемной паренхимы в полость сосуда) создают своего

рода «сито», задерживающее инфекционные единицы (Wallis, Truter 1978; Hilaire *et al.*, 2001). Однако наличие тилл и гелей далеко не всегда ограничивает распространение патогенных организмов (VanderMolen *et al.*, 1977; Boher *et al.*, 1995; James *et al.*, 2002; Baccari, Lindow, 2011). Важно отметить, что, поскольку колонизация сосудов микроорганизмами затруднена интенсивным транспортом воды, образование гелей и тилл может привести к преобразованию этой сложной среды и сделать ее более пригодной экологической нишей для бактерий. Поэтому, описанные выше изменения, происходящие в сосудах, могут являться одной из причин восприимчивости растений к инфекционным заболеваниям, вызываемым определенными патогенами.

В случае взаимодействия *Pba* и табака, появление гранулярных субстанций на внутренней поверхности клеточной стенки сосуда и последующее образование гелеподобного матрикса, по всей видимости, способствует колонизации растения, а не подавляет развитие патогена *in planta*. Это предположение аргументируется тем, что, во-первых, нами не обнаружено никаких подтверждений того, что гранулярные субстанции оказывают негативное влияние на клетки *Pba*. Во-вторых, эти субстанции, по-видимому, обеспечивают формирование бактериальных эмболов, которые приводят к закупорке сосуда ксилемы. В свою очередь, блокировка водного транспорта может быть важным условием прохождения популяционного цикла бактериями в организме хозяина. Снижение интенсивности транспирационного тока может создать водный дефицит в растении, увеличив тем самым его восприимчивость, и/или обеспечить нисходящую миграцию бактерий по ксилемным сосудам к подземным органам.

3.3.3. Миграция клеток *P. atrosepticum* SCRI1043 в растениях табака

Известно, что ряд фитопатогенных бактерий переживает условия вневегетационного периода в подземных органах растений, в которые они попадают вследствие нисходящей миграции по ксилемным сосудам.

Интересно, что элементы флоэмы, по неизвестным в настоящее время причинам, оказываются непригодным местообитанием для большинства фитопатогенных бактерий, и лишь ограниченный круг микроорганизмов, переносимых насекомыми, питающимися флоэмным соком, колонизирует эту ткань. Колонизация элементов флоэмы растения-хозяина пектобактериями не описана. Нами клетки *Pba* во флоэме табака также обнаружены не были.

Нисходящая миграция бактериальных клеток по ксилемным сосудам является достаточно распространенным явлением. Однако до сих пор остается не до конца выясненным, каким образом бактериальные клетки способны перемещаться «против течения», учитывая, что скорость их миграции (25 – 30 мкм /мин (Skerker, Berg, 2001; Meng *et al.*, 2005)) значительно меньше скорости транспирационного тока (90-300 мм/мин (Windt *et al.*, 2006)). Для одного из фитопатогенов, колонизирующего исключительно ксилемные сосуды – *Xylella fastidiosa*, показано, что нисходящая миграция клеток по сосудам обеспечивается особым типом подвижности (twitching motility) (Meng *et al.*, 2005). При этом микроорганизмы «заякориваются» на поверхности смоделированного ксилемного сосуда и постепенно перемещаются против тока жидкости за счет пилей четвертого типа. Однако наличие подобного типа подвижности для *Pba* не продемонстрировано. Кроме того, нами не отмечено прикрепления клеток *Pba* к стенкам сосудов, что необходимо для реализации «twitching motility». Хотя нисходящая миграция пектобактерий по ксилеме ранее не была зафиксирована, мы предположили, что бактериальные эмболы, блокируя водный транспорт, могут обеспечить передвижение микроорганизмов по сосудам из надземной части растений к подземным органам. В связи с этим, нами была предпринята попытка выявления нисходящей миграции клеток *Pba* в растениях.

Для того чтобы охарактеризовать распространение клеток в растениях табака, после появления симптомов заболевания (через двое суток после инокуляции бактерий в пазуху листа в середине стебля), мы проанализировали отдельные секции инфицированных растений на разном

расстоянии от зоны некроза. Хотя в зоне некроза паренхима была активно колонизирована бактериями (рис. 6 А, Б), на расстоянии ниже 3 – 5 мм от этой зоны в паренхиме мы обнаруживали лишь единичные клетки *Pba*. Еще ниже этой области (более 5 мм от зоны некроза) клетки *Pba* в паренхиме практически не встречались. В редких случаях скопления бактерий обнаруживали, но только в клетках, прилегающих к сосудам ксилемы (рис. 8Б). В вакуолях паренхимных клеток ниже зоны некроза формировалось большое количество осмиофильных глобул (рис. 8А), описанных выше (раздел 3.1.1.). Таким образом, зона активной колонизации паренхимы клетками *Pba* совпадает с областью проявления симптомов заболевания (мацерация тканей и некроз клеток). Ниже этой области коровая паренхима не колонизирована, а в паренхимных клетках индуцируется ответная реакция, связанная с формированием осмиофильных глобул.

В то же время, сосуды ксилемы были активно колонизированы клетками *Pba* даже на расстоянии ниже 10 мм от зоны некроза (рис. 8Б). В некоторых сосудах в этой области были обнаружены бактериальные эмболы. Это указывает на то, что скорость нисходящей миграции клеток *Pba* по сосудам значительно опережает скорость их перемещения по паренхиме. С этим также согласуются данные высева клеток *Pba* из корневой системы инфицированных растений. Через сутки после инфицирования, когда симптомы заболевания были практически не заметны даже в зоне инфицирования, клетки *Pba* уже высевались из корневой системы 50 % растений. Средний титр клеток *Pba* на грамм корней при этом составлял $7,4 \times 10^2$ КОЕ. На второй день 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 клеток *Pba* при этом составлял $1,5 \times 10^7$ КОЕ/грамм.

После перемещения части популяции *Pba* из надземной части в корневую систему (2 – 3 суток после инфицирования), бактериальные клетки

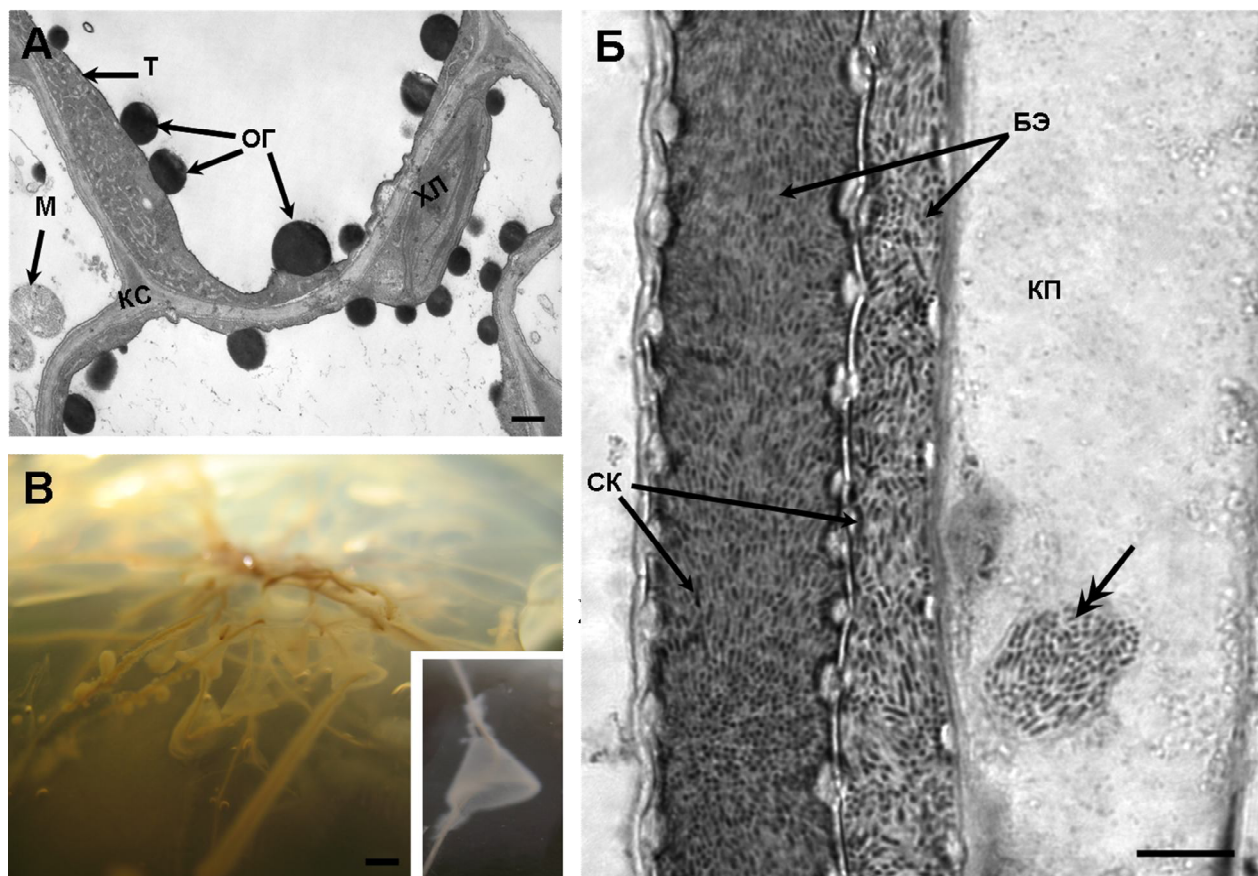


Рис. 8. Нисходящая миграция клеток *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 по сосудам ксилемы растений *Nicotiana tabacum*. На фотографиях представлены срезы стеблей инфицированных растений (двое суток после инфицирования) в бессимптомной области, располагающейся на 10 мм ниже зоны проявления симптомов заболевания (мацерации тканей, некроз клеток) (А, Б) и общий вид корневой системы инфицированного растения (В). А – формирование осмиофильных глобул в вакуолях паренхимных клеток; масштабная линейка 0,5 мкм. Б – бактериальные эмболы в сосудах ксилемы; двойной стрелкой обозначено скопление бактериальных клеток в смежной с сосудом ксилемы клетке паренхимы, масштабная линейка 10 мкм. В – воронковидные скопления бактериальных клеток в ризосфере инфицированных растений; масштабная линейка 2 мм. КС – растительная клеточная стенка; Т – тонопласт; ОГ – осмиофильные глобулы; ХЛ – хлоропласт; М – митохондрия; СК – сосуд ксилемы; БЭ – бактериальный эмбол; КП – клетка паренхимы.

мигрировали из внутренних тканей хозяина в окружающую среду. При этом на корнях растения формировались воронковидные скопления бактериальных клеток (рис. 8В). По-видимому, такое «поведение» обеспечивает колонизацию ризосферы и расселение микроорганизмов в почве.

Полученные результаты хорошо согласуются с данными, которые были получены нашими коллегами в исследованиях, проводимых параллельно с нашими экспериментами (Kubheka *et al.*, 2013). Этой группой в полевых условиях на растениях картофеля была также продемонстрирована нисходящая миграция клеток родственного *Pba* вида *Pectobacterium brasiliense* по ксилемным сосудам до дочерних клубней. Однако, хотя этими исследователями обнаружены крупные скопления клеток *P. brasiliense*, блокирующие полость ксилемных сосудов, используемый ими подход, основанный на использовании флуоресцентно меченого штамма и применении конфокальной микроскопии на живых тканях, не имел достаточной разрешающей способности для выявления особенностей ультраструктуры бактериальных клеток, колонизировавших сосуды.

Таким образом, для клеток *Pba* характерна нисходящая миграция в организме хозяина по ксилемным сосудам. По всей вероятности, эту способность обеспечивают бактериальные эмболы, блокирующие восходящий ток жидкости по сосудам.

3.3.4. Изменения в ультраструктуре клеток *P. atrosepticum* SCRI1043 после гибели растения-хозяина

Гибель растения-хозяина была сопряжена с изменениями в ультраструктуре клеток *Pba*. В сосудах ксилемы происходила постепенная дезинтеграция бактериальных эмболов (рис. 9А). Матрикс бактериальных эмболов разрушался (рис. 9Б, В). Клетки, которые в составе бактериальных эмболов были плотно прижаты друг к другу, разъединялись (рис. 9Б, В). Цитоплазма этих клеток уже не была дифференцирована на электроноплотную и электронопрозрачную области, а становилась более

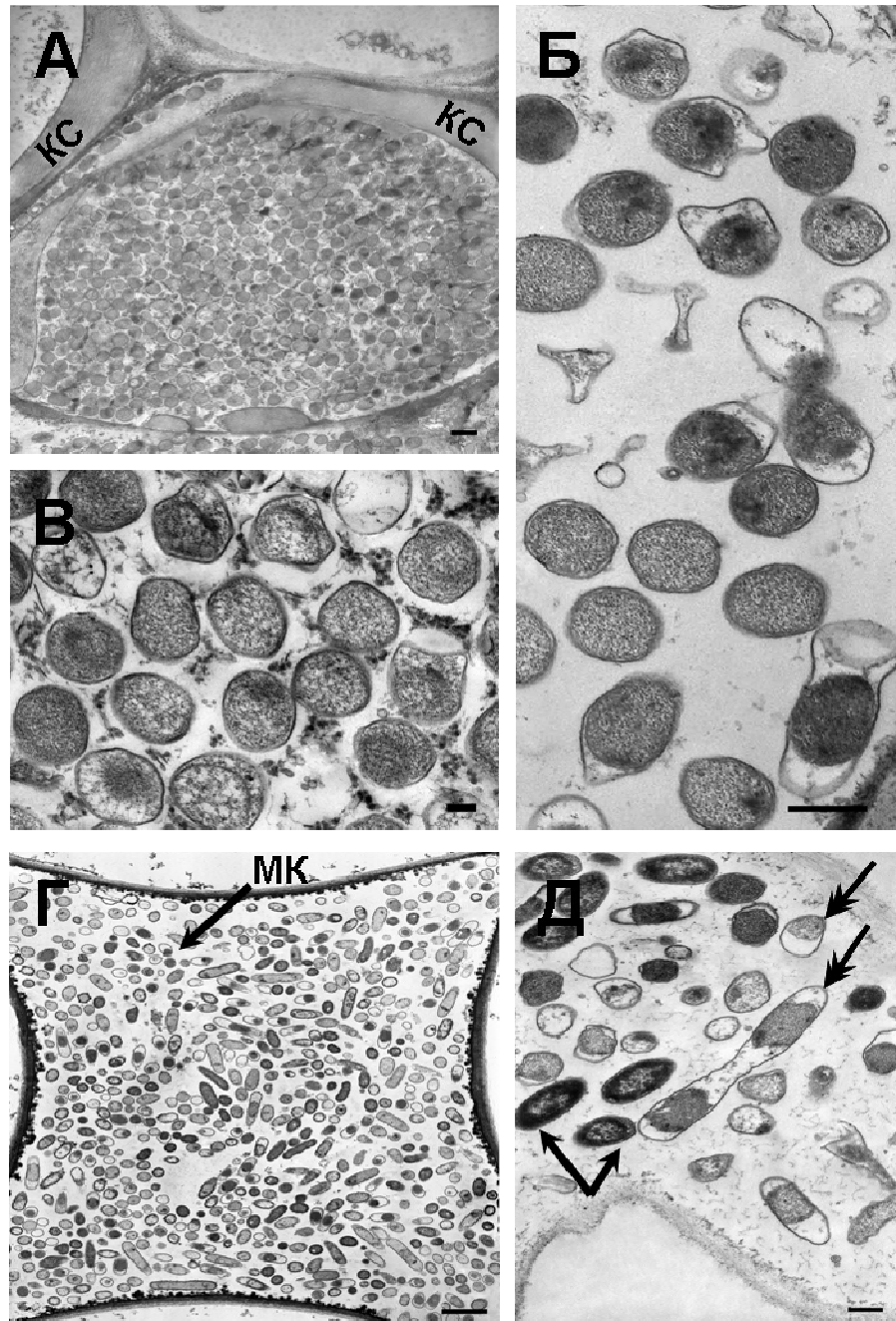


Рис. 9. Ультраструктура клеток *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 (*Pba*) после гибели растения-хозяина (*Nicotiana tabacum*). На фотографиях представлены срезы стеблей инфицированных растений через пять (А – В) и девять (Г, Д) суток после инфицирования. А – дезинтеграция бактериальных эмболов в сосудах ксилемы; масштабная линейка 2 мкм. Б – разрушение матрикса бактериальных эмболов, масштабная линейка 0,5 мкм. В – изменения в ультраструктуре клеток *Pba* после дезинтеграции бактериальных эмболов; масштабная линейка 0,5 мкм. Г – общий вид межклетника. Д – детали бактериальных клеток; стрелки указывают на конкретные структуры; масштабная линейка 0,5 мкм.

паренхимы, колонизированного *Pba*; масштабная линейка 2 мкм. Д – клетки *Pba* в межклетнике паренхимы; двойными и одинарными стрелками обозначены клетки *Pba*, различающиеся по ультраструктуре, масштабная линейка 0,5 мкм. КС – растительная клеточная стенка; МК – межклетник.

разрыхленной и однородной. Некоторые клетки были плазмолизированы (рис. 9 Б, В).

Через девять суток после инфицирования растений субпопуляция клеток *Pba*, колонизирующая область коровой паренхимы на растительных остатках, становилась гетерогенной (рис. 9А, Б). Часть клеток имела неоднородную цитоплазму с электроноплотной периферийной областью и с более электропрозрачной внутренней зоной, в которой был локализован нуклеоид (рис. 9Б). Клетки второго типа были в разной степени плазмолизированы, имели разрыхленную цитоплазму невысокой электронной плотности, в которой нуклеоид плохо выявлялся (рис. 9Б). Эти клетки были сходны по ультраструктуре с жизнеспособными, но некультивируемыми клетками *Pba*, ранее охарактеризованными *in vitro* (Горшков и др., 2009). Выявление в растительных остатках клеток *Pba* подобной морфологии согласуется с данными микробиологических высевок, количественного ПЦР-анализа и экспериментов по «оживлению» *Pba*, описанными выше (раздел 3. 1).

Таким образом, после гибели растения-хозяина сформированные на ранней и острой стадиях инфекции бактериальные эмболы дезинтегрируют. Субпопуляция клеток *Pba*, колонизирующих паренхиму, становится гетерогенной. Некоторые клетки при этом имеют ультраструктуру, характерную для покоящихся форм. Подобные изменения, по всей вероятности, обеспечивают более эффективное сохранение микроорганизмов на растительных остатках в ходе вневегетационного периода.

3.3.5. Ультроструктура клеток *P. atrosepticum* SCRI1043 и табака при бессимптомной инфекции

После инфицирования растений табака клетками *Pba*, около 30 % растений не проявляло симптомов заболевания (раздел 3.1.). Однако у некоторых растений этой «бессимптомной» группы через 5 – 20 суток после инфицирования, несмотря на отсутствие видимых симптомов в надземной части, в корневой системе формировались воронковидные скопления бактериальных клеток (описанные в разделе 3.3.3). Это, по всей видимости, свидетельствовало в пользу того, что, несмотря на отсутствие морфологических признаков заболевания, микробные клетки активно размножались *in planta* и мигрировали по растению из надземной части в корневую систему. Для проверки этого мы проанализировали изменение титра клеток *Pba* в растениях, не проявивших симптомы заболевания, через 9 и 20 суток после инфицирования.

Через девять суток после инфицирования у половины растений, не проявивших симптомы заболевания, титр клеток *Pba* либо понижался, либо существенно не изменялся по сравнению с количеством инокулированных клеток микроорганизма (около 10^5 КОЕ). У второй половины растений плотность популяции бактерий увеличивалась и составляла от 5×10^5 до 2×10^8 КОЕ/грамм сырой массы. Через 20 суток после инфицирования в половине проанализированных бессимптомных растений титр клеток патогена увеличивался и составлял от 2×10^6 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.

Для характеристики особенностей морфологии клеток *Pba* и растений табака, а также определения локализации бактерий в организме хозяина при бессимптомной инфекции были использованы растения, в которых титр клеток патогена увеличивался по сравнению с количеством клеток в

инокуляте, а симптомы заболевания при этом не проявлялись. В структуре клеток и тканей стеблей таких растений не было выявлено явных повреждений (рис.10), что согласуется с отсутствием морфологических признаков заболевания. Хотя в паренхиме иногда обнаруживали единичные клетки *Pba*, их количество кардинальным образом отличалось от количества бактериальных клеток в зоне некроза у растений, проявивших симптомы заболевания. Клетки паренхимы содержали в вакуолях большое количество осмиофильных глобул (описанных в разделах 3.3.1 и 3.3.3), по-видимому, ограничивающих интенсивную колонизацию паренхимы бактериями (рис. 10А).

В то же время, некоторые ксилемные сосуды были интенсивно колонизированы бактериями (рис. 10Б). При этом полость некоторых сосудов была полностью закупорена либо клетками *Pba*, погруженными в гелеподобную субстанцию, описанную выше (см. раздел 3.3.2) (рис. 10Б), либо бактериальными эмболами.

Таким образом, формирование патологической системы, включающей *Pba* и табак, может проходить, как минимум, по двум сценариям: с проявлением и без проявления симптомов заболевания. Общим для этих двух стратегий является процесс закупорки ксилемных сосудов растений, связанный с образованием бактериальных эмболов, которые, блокируя транспирационный ток, обеспечивают нисходящую миграцию бактерий по сосудам к подземным органам. Основное отличие заключается в том, что при бессимптомном развитии инфекции угнетается развитие «паренхимной субпопуляции» *Pba*, определяющей симптомы заболевания (некроз клеток и мацерация тканей). Несмотря на отсутствие морфологических признаков заболевания у хозяина, популяция микроорганизмов *in planta* может развиваться: увеличивается ее плотность, бактериальные клетки системно распространяются по растению и за его пределы (ризосфера). Следовательно, «агрессивное поведение» микроорганизмов, приводящее к гибели растения-хозяина является, по всей видимости, «факультативным», то есть

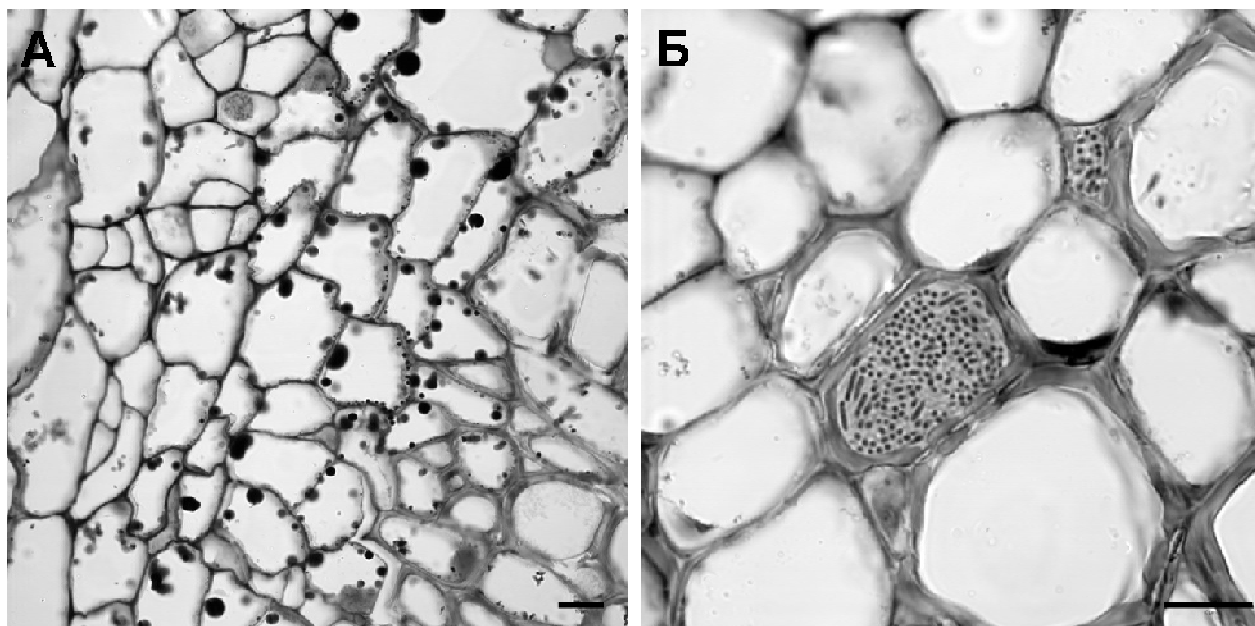


Рис. 10. Структура тканей растений *Nicotiana tabacum*, не проявивших симптомов заболевания (мацерация тканей, некроз клеток) после инфицирования клетками *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 (*Pba*). На фотографиях представлены срезы стеблей инфицированных растений (девять суток после инфицирования). **А** – осмиофильные глобулы в вакуолях паренхимных клеток табака при бессимптомной инфекции, вызванной *Pba*; масштабная линейка 10 мкм. **Б** – сосуды ксилемы, колонизированные клетками *Pba*, в ходе бессимптомной инфекции, масштабная линейка 10 мкм.

необязательной стадией для прохождения популяционного цикла микробов. Эти результаты хорошо согласуются с многочисленными данными о бессимптомных инфекциях, вызываемых бактериями рода *Pectobacterium* у картофеля (Hayward, 1974; Perombelon, 2002; Marquez-Villavicencio *et al.*, 2011; Toth *et al.*, 2011; Czajkowski *et al.*, 2011). При этом независимо от выраженности симптомов заболевания, бактерии эффективно передаются от одного вегетативного поколения растений другому (через клубни).

Описанные в этом разделе результаты демонстрируют, что бактериальная популяция внутри растительного организма не является совокупностью однородных клеток, а представляет собой динамичную развивающую систему. Одной из движущих сил, приводящих к формированию гетерогенности в микробной популяции, по всей видимости, является неоднородность условий в различных клетках и тканях хозяина, в том числе разнотипность протекающих в них физиологических процессов. Разные субпопуляции бактерий, адаптируясь к различным «компартаментам» своего хозяина, формируют отдельные функциональные единицы, которые в совокупности обеспечивают прохождение популяционного цикла в организме растения-хозяина. Соотношение разных субпопуляций может определять морфологические признаки взаимодействия растений и микроорганизмов.

3.4. Экспрессия жасмонат- и салицилат-индуцируемых маркерных генов в растениях табака при различных типах ответных реакций на инфицирование *P. atrosepticum* SCRI1043

Разнообразные способы взаимодействия *Pba* и растений табака (типичные и бессимптомные инфекции, описанные выше), могут определяться дифференцированной работой гормональных систем макроорганизма, которые регулируют патоген-индуцируемые ответные реакции. К таким системам, в первую очередь, относят жасмонат- и салицилат-зависимые. Для выявления физиологических параметров растительного организма, различающих разные типы инфекционного

процесса, мы оценили особенности функционирования этих систем у растений табака при типичной и бессимптомной инфекциях, вызванных *Pba*, а также в рамках локального и системного ответов макроорганизма на инвазию патогена. В качестве методического подхода при этом был выбран анализ уровня транскриптов маркерных генов, характер экспрессия которых соответствует изменениям в работе жасмонат- и салицилат-зависимых гормональных систем.

В качестве маркеров жасмонат-зависимого пути были выбраны следующие гены табака: 1) NtAOC (AJ308487.1), кодирующий алленоксидциклазу (АОЦ); 2) NtLOX2 (X84040.1), кодирующий липоксигеназу (ЛОГ); 3) NtJAZ3 (AB433898.1), кодирующий регуляторный белок JAZ3. Для этих генов ранее был подтвержден жасмонат-зависимый характер экспрессии, в том числе у растений табака (Véronési *et al.*, 1996; Kumar, Klessig, 2000; Lannoo *et al.*, 2007; Han *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2014). Маркером салицилат-зависимого гормонального пути был выбран ген NtPR1 (X06930.1), кодирующий патоген-индуцируемый белок PR-1, который часто используется для мониторинга ответов, координируемых этим фитогормоном (Palva *et al.*, 1994; Vidal *et al.*, 1997; Po-Wen *et al.*, 2013).

Для определения особенностей функционирования целевых гормональных систем при локальном и системном ответах в процессе типичной и бессимптомной инфекций в анализ были взяты следующие образцы.

1. Лист контрольного растения через 24 часа после нанесения 0,4 % NaCl (контроль).

2. Лист инфицированного растения, на который непосредственно наносили суспензию клеток *Pba* и на котором проявлялись симптомы заболевания (локальный ответ).

3. Лист инфицированного растения, на котором симптомы заболевания не проявлялись, располагавшийся под листом, инокулированным клетками *Pba* (системный ответ).

Второй и третий образцы были взяты через 24 часа после инфицирования с растений, на которых к этому времени проявлялись симптомы заболевания (небольшая зона мацерации в зоне инокуляции диаметром 2 – 3 мм).

4. Лист инфицированного растения, не проявившего симптомы заболевания, на который непосредственно наносили суспензию клеток *Pba*. В анализ были включены инфицированные растения через 9 суток после инокуляции, которые к этому времени симптомов заболевания не проявили, но титр клеток *Pba*, в которых увеличивался по сравнению с количеством клеток в инокуляте (латентная инфекция).

При типичной инфекции уровень экспрессии жасмонат-индуцируемых маркерных генов (АОЦ, ЛОГ, JAZ) возрастал по сравнению с таковым для интактных растений. При этом содержание транскриптов увеличивалось как при локальном, так и при системном ответах (рис. 11). При бессимптомной инфекции у инокулированных клетками *Pba* растений уровень транскриптов жасмонат-индуцируемых маркерных генов не отличался от контроля (рис. 11).

Уровень экспрессии салицилат-индуцируемого маркерного 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. 12). При бессимптомной инфекции уровень экспрессии этого гена возрастал. Таким образом, при взаимодействии табака и *Pba*, сопряженном с развитием симптомов заболеваний у растения-хозяина, происходит индукция жасмонат-зависимого ответа, а салицилат-зависимый ответ не активируется. При бессимптомной инфекции, наоборот, индуцируется салицилат-зависимый ответ, а индукции жасмонат-зависимого не происходит.

Эти данные согласуются с результатами, полученными ранее на растениях резуховидки (*Arabidopsis thaliana*) и табака, инфицированных близкородственным *Pba* патогеном *Erwinia carotovora* (*Pectobacterium carotovorum* (*Pbc*)) (Palva *et al.*, 1994; Vidal *et al.*, 1997; Norman-Setterblad *et*

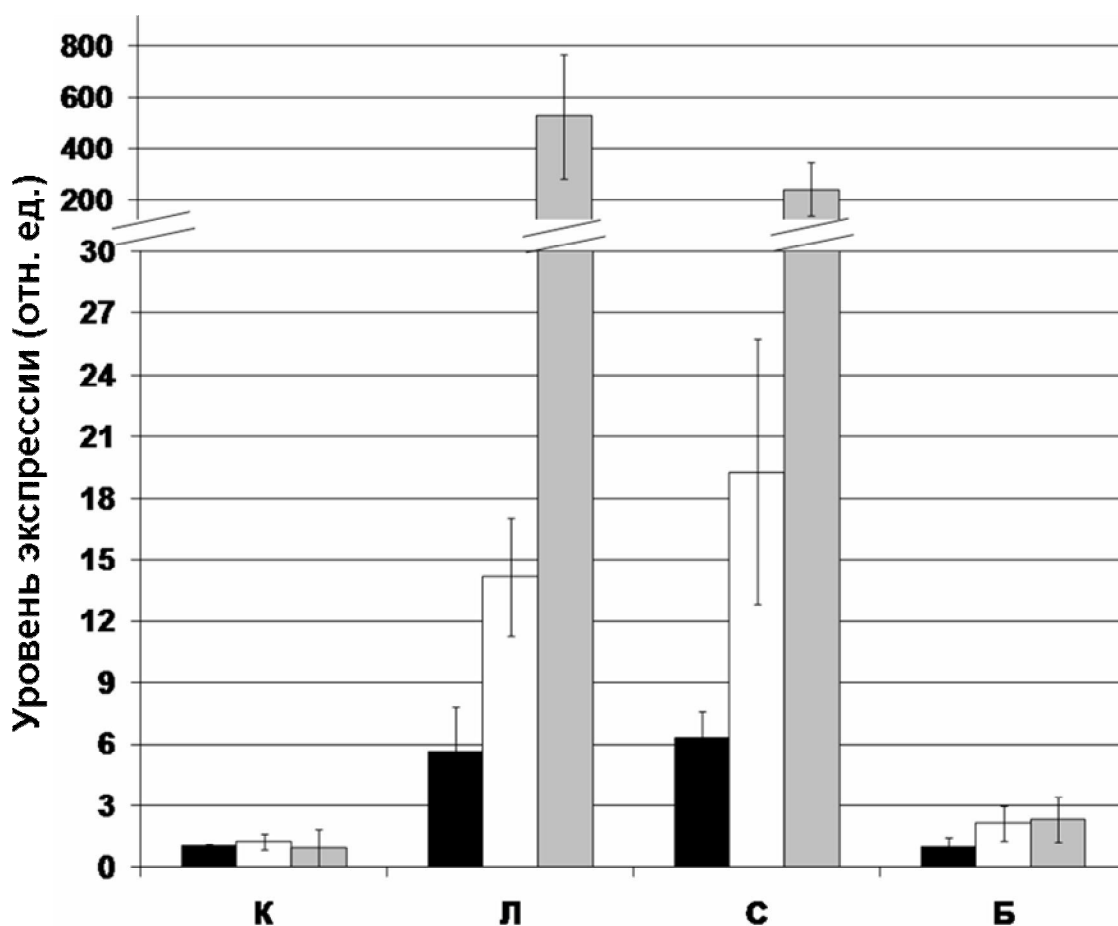


Рис. 11. Экспрессия жасмонат-индуцируемых генов, кодирующих регуляторный белок JAZ3 (черные столбцы), алленоксидциклазу NtAOC (белые столбцы) и липоксигеназу NtLOX2 (серые столбцы) в листьях контрольных (К) и инфицированных *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 (Л, С, Б) растениях табака. Л – листья, на которые непосредственно наносили клетки патогена (локальный ответ), взятые с инфицированных растений, проявивших симптомы заболевания (24 часа после инфицирования); С – листья, располагавшиеся под листьями, инокулированными патогеном (системный ответ), взятые с инфицированных растений, проявивших симптомы заболевания (24 часа после инфицирования); Б – листья, на которые непосредственно наносили клетки патогена, взятые с инфицированных растений, не проявивших симптомы заболевания (бессимптомная инфекция, 9 суток после инфицирования). Представленные значения соответствуют средним для четырех биологических повторностей. В качестве разбросов указано стандартное отклонение.

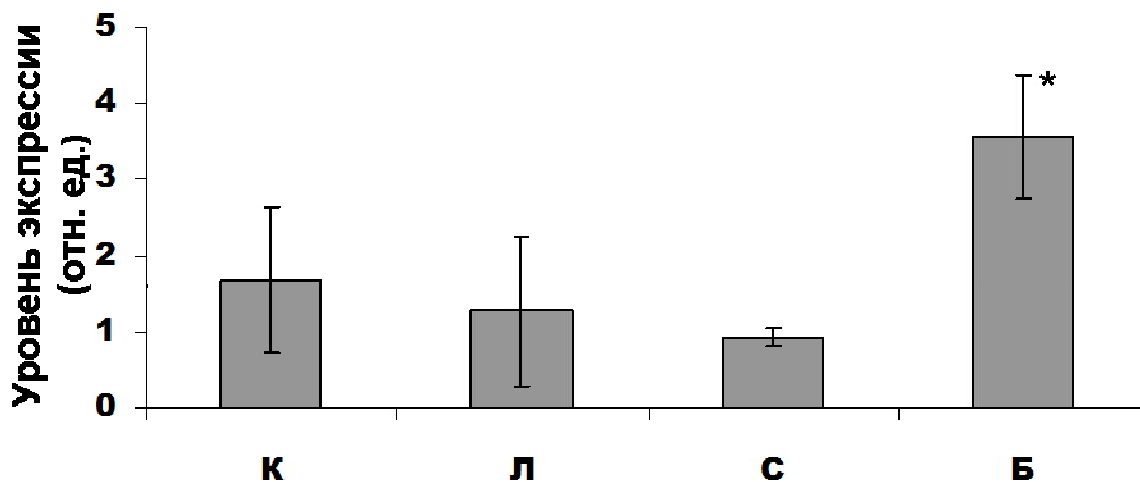


Рис. 12. Экспрессия салицилат-индуцируемого гена PR-1 в листьях контрольных (К) и инфицированных *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 (Л, С, Б) растениях табака. Л – листья, на которые непосредственно наносили клетки патогена (локальный ответ), взятые с инфицированных растений, проявивших симптомы заболевания (24 часа после инфицирования); С – листья, располагавшиеся под листьями, инокулированными патогеном (системный ответ), взятые с инфицированных растений, проявивших симптомы заболевания (24 часа после инфицирования); Б – листья, на которые непосредственно наносили клетки патогена, взятые с инфицированных растений, не проявивших симптомы заболевания (бессимптомная инфекция) (9 суток после инфицирования). Представленные значения соответствуют средним для четырех биологических повторностей. В качестве разбросов указано стандартное отклонение. * – различия достоверны при $p \leq 0,05$.

al., 2000). По результатам этих исследований авторами сделано предположение, что определяющую роль в формировании защитного ответа растений на пектобактерий играет активация жасмонат-зависимого гормонального пути, но не салицилат-зависимого. Это предположение было аргументировано тем, что 1) ответные реакции растений на *Pbc* не зависят от салицилат-зависимого пути: в трансгенных растениях с пониженным уровнем этого фитогормона характер экспрессии *Pbc*-индуцируемых генов, а также устойчивость растений, не отличались от дикого типа; 2) инокуляция растений либо клетками *Pbc*, либо супернатантами культур этой бактерии приводила к активации экспрессии жасмонат-индуцируемых генов, но не салицилат-индуцируемых; 3) предобработка растений супернатантами культур, сопряженная с активацией жасмонат-зависимого пути, формировала устойчивость растений к этому патогену.

Однако, ряд экспериментальных данных, описанных в литературе, ставит под сомнение определяющую роль жасмонат-зависимого гормонального пути в формировании устойчивости к пектобактериям и указывает на больший защитный потенциал салицилат-зависимого при взаимодействии растений с этими патогенами. Во-первых, несмотря на то, что при взаимодействии пектобактерий с растениями происходит активация экспрессии жасмонат-индуцируемых генов, это не препятствует развитию инфекции (наше исследование; Vidal *et al.*, 1997; Norman-Setterblad *et al.*, 2000). По всей вероятности, это связано с тем, что пектобактерии проявляют устойчивость к ответным реакциям хозяина, активируемым жасмонатами. Во-вторых, предобработка растений салициловой кислотой, приводящая к активации салицилат-зависимого ответа, делает растения устойчивыми к *Pbc*. Причем эта устойчивость сопряжена с защитной реакцией, напоминающей сверхчувствительность (РСЧ), которая индуцируется салициловой кислотой (Palva *et al.*, 1994). В-третьих, устойчивость растений к *Pbc*, формирующаяся вследствие обработки салициловой кислотой, сопряжена с репрессией жасмонат-индуцируемых реакций макроорганизма, которые являются

типичными для инфекционного процесса, вызванного пектобактериями (Vidal *et al.*, 1997). В-четвертых, секретируемые *Pbc* метаболиты подавляют экспрессию салицилат-индуцируемых генов у растений. Другими словами, этот патоген способен подавлять работу салицилат-зависимого пути и репрессировать системную приобретенную устойчивость (Vidal *et al.*, 1997).

В-пятых, как было выяснено уже после проведения исследований, процитированных выше (Palva *et al.*, 1994; Vidal *et al.*, 1997; Norman-Setterblad *et al.*, 2000), в геноме *Pba* существуют гены, продукты которых, по всей вероятности, могут влиять на функционирование жасмонат- и салицилат-зависимых систем растения-хозяина (Bell *et al.*, 2004). Так ген, *cfa* у *Pba* кодирует фермент биосинтеза одного из компонентов описанного на примере *Pseudomonas syringae* фитотоксина коронатина, который служит функциональным аналогом жасмоновой кислоты (раздел 1.4). Хотя существование этого фитотоксина у пектобактерий пока не было доказано, мутация по гену *cfa* у *Pba* снижает вирулентность бактерий (Toth *et al.*, 2008). В результате биосинтеза коронатина *in planta* у хозяина активируется жасмонат-зависимый путь, а салицилат-зависимый – репрессируется (Zheng *et al.*, 2012). Это связано с антагонистическим взаимодействием жасмонат- и салицилат-зависимых систем передачи сигнала (Kunkel, Brooks, 2002). Синтез коронатина представляет собой тактику «обмана», используемую псевдомонадами при колонизации растения-хозяина. Эти бактерии восприимчивы к салицилат-индуцируемым ответам хозяина, а синтез коронатина позволяет подавить эти ответы за счет активации жасмонат-зависимого гормонального пути, что благоприятствует развитию инфекции. Вышеупомянутые данные позволяют предполагать, что сходную тактику используют и пектобактерии.

В пользу этого свидетельствуют и полученные нами результаты. При развитии заболевания, сопряженного с динамичным развитием симптомов, у табака индуцируются жасмонат-зависимые ответы, но не салицилат-зависимые. При бессимптомном развитии популяции патогена, которое,

вероятно, определяется повышенной иммунностью хозяина, жасмонат-зависимый гормональный путь находится в неиндуцированном состоянии, в то время как экспрессия маркерного гена салицилатного пути возрастает. Таким образом, при различном течении заболевания (типичное и бессимптомное), вызванного *Pba*, в растениях табака индуцируются разные защитные системы.

3.5. Роль полисахаридов растительной клеточной стенки в формировании бактериальных эмболов клетками *P. atrosepticum* SCRI1043 в сосудах ксилемы табака

Бактериальные эмболы, образуемые клетками *Pba* в сосудах ксилемы растения-хозяина, были описаны в нашем исследовании впервые, поэтому принципы формирования таких структур неизвестны. Начальной стадией образования бактериальных эмболов, описанной в нашем исследовании, было накопление гранулярной субстанции на внутренней поверхности растительных клеточных стенок и формирование из нее гелеподобного матрикса (раздел 3.3.2.). Известно, что инфекционный процесс, вызванный как бактериальными, так и грибными патогенами, сопряжен с накоплением пектиновых веществ в люмене ксилемных сосудов (Benhamou *et al.*, 1991; Kremona *et al.*, 1996; Rioux *et al.*, 1998; Ouellette *et al.*, 1999; Clérivet *et al.*, 2000). Однако на примере инфекций, вызванных пектобактериями, этого продемонстрировано не было. Мы предположили, что сборка бактериальных эмболов связана с модификацией пектиновых веществ растительной клеточной стенки, которые, попадая в люмен сосудов, приводят к желированию ксилемного сока. Для проверки этого предположения на первом этапе было проведено сравнение слабосвязанных (либо не связанных) с клеточной стенкой полисахаридов, вымывающихся в буфер при гомогенизации тканей (буфер-экстрагируемая фракция), и ионносвязанных пектиновых полисахаридов клеточной стенки (оксалат-экстрагируемая фракция) контрольных и инфицированных *Pba* растений табака.

У контрольных растений профиль элюции пектиновых веществ, экстрагируемых оксалатом аммония, имел выраженный пик в области 700 – 2000 кДа. Во фракции, полученной аналогичным образом из инфицированных растений, высокомолекулярные полисахариды практически отсутствовали (рис. 13). Это свидетельствует о разрушении пектиновых веществ клеточной стенки растения в ходе инфекционного процесса. Полученные данные согласуются с общепринятой точкой зрения, что пектины являются основным питательным субстратом пектобактерий.

Содержание буфер-экстрагируемых полисахаридов клеточной стенки в инфицированных растениях было значительно выше, чем в контрольных (рис. 14). На профиле элюции соединений этой фракции, выделенной из инфицированных растений, присутствовали два пика с максимумами, приходящимися на 100 и <50 кДа. На хроматограммах фракции, полученной аналогичным способом из контрольных растений, выраженные пики на профиле элюции отсутствовали, а общее содержание углеводов было в 4 раза меньше, чем в буфер-экстрагируемой фракции полисахаридов клеточной стенки инфицированных растений (рис. 14). Для подтверждения растительного, а не микробного происхождения полимеров буфер-экстрагируемой фракции инфицированных растений в качестве контроля была также проанализирована буфер-экстрагируемая фракция гомогенатов клеток *Pba*, выращенных *in vitro*. Несмотря на то, что для анализа этой фракции было взято количество клеток *Pba* в несколько раз превышающее количество бактерий в навесках инфицированных растений, использованных для аналогичного анализа, содержание полисахаридов в буфер-экстрагируемой фракции гомогенатов бактериальных клеток было незначительным (рис. 14).

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 галактуронозная

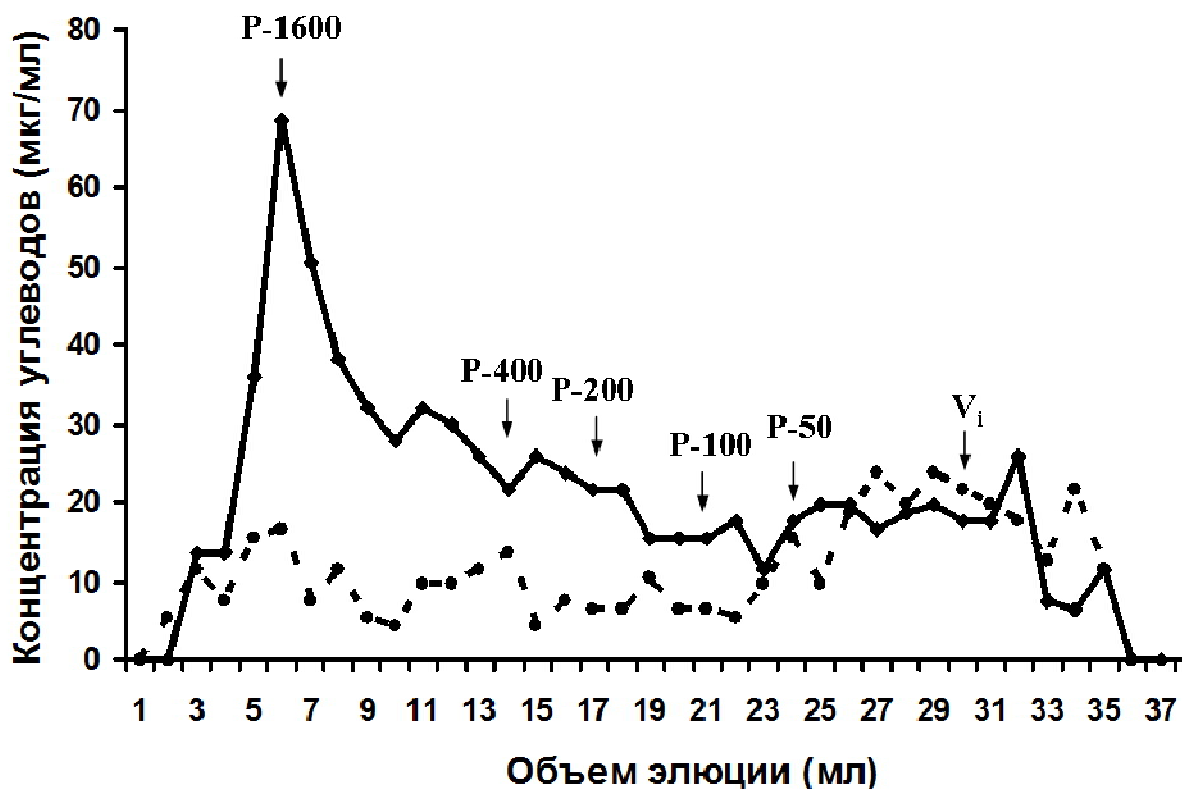


Рис. 13. Профили элюции полисахаридов оксалат-экстрагируемой фракции контрольных (сплошная линия) и инфицированных *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 (прерывистая линия) растений табака. Разделение проводили на колонке с сефарозой CL-4В. В качестве маркеров молекулярной массы использованы пуллуланы. Образцы контрольных и инфицированных растений выровнены по сырой массе исходного материала.

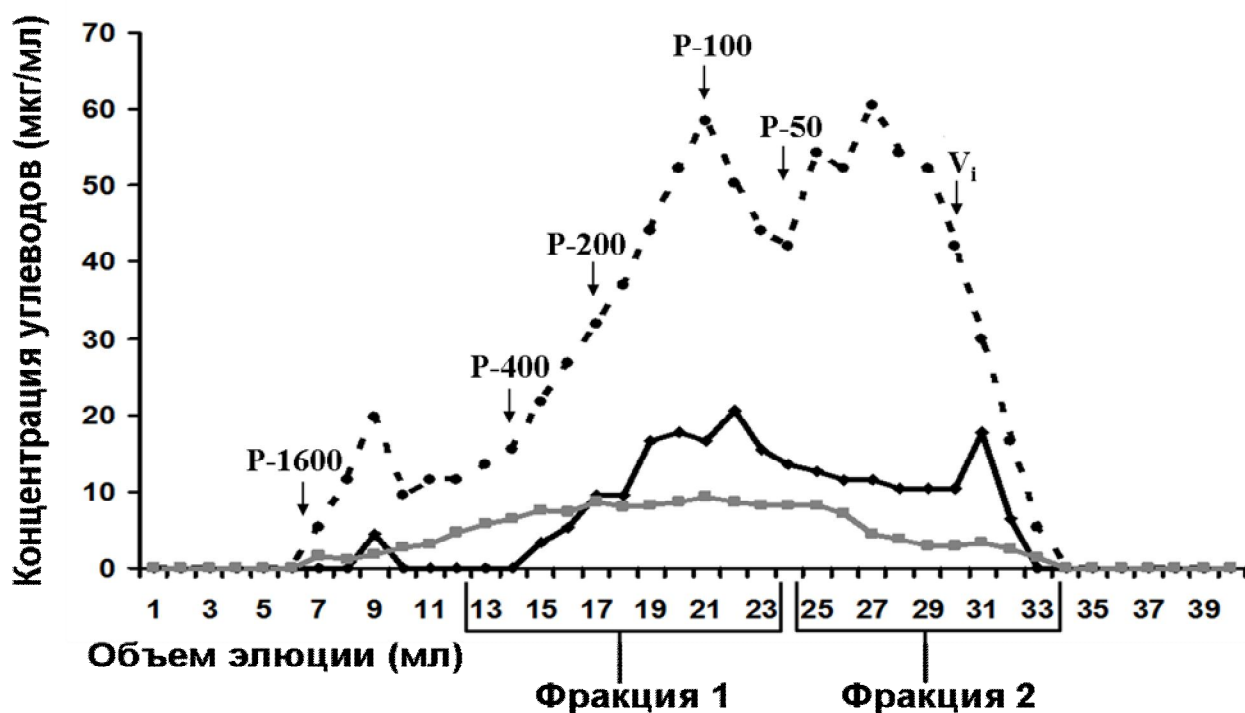


Рис. 14. Профили элюции полисахаридов буфер-экстрагируемой фракции контрольных (сплошная линия) и инфицированных *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 (прерывистая линия) растений табака, а также бактерий, выращенных *in vitro* (серая линия). Разделение проводили на колонке с сефарозой CL-4В. В качестве маркеров молекулярной массы использованы пуллуланы. Фракции 1 и 2 отбирали для моносахаридного анализа. Образцы контрольных и инфицированных растений выровнены по сырой массе исходного материала.

кислота (35,6 %), а также нейтральные моносахариды – галактоза (26,9 %), арабиноза (14,2 %) и рамноза (13,7 %) (рис 15А). Соединения более низкомолекулярного пика (менее 50 кДа) на 80 % состояли из галактуроновой кислоты (рис. 15Б). Таким образом, соединения, входящие в состав более низкомолекулярного пика, были преимущественно представлены фрагментами полигалактуроновой кислоты. Присутствие значительного количества нейтральных моносахаридов в полимерах более высокомолекулярного пика свидетельствует о наличии в составе этой фракции фрагментов рамногалактуронана I.

Проведенный анализ свидетельствует о том, что не все пектиновые вещества растения-хозяина разрушались *Pba* до низкомолекулярных соединений. Часть пектиновых веществ в инфицированных растениях сохранялась в виде высокомолекулярных соединений, которые экстрагировались буфером, а значит, изменяли характер связывания с клеточной стенкой или выходили из ее состава (рис. 14, 15).

Изменение характера связывания высокомолекулярных фрагментов полигалактуроной кислоты и рамногалактуронана I с клеточной стенкой в инфицированных растениях может обеспечить вымывание пектиновых веществ в полость ксилемных сосудов и желирование ксилемного сока при формировании бактериальных эмболов. Для проверки этого предположения нами был проведен иммуноцитохимический анализ с использованием антител RUI и LM19, специфичных к эпитопам рамногалактуронана I и неэтерифицированного гомогалактуронана.

В контрольных неинфицированных растениях эпитопы рамногалактуронана I и гомогалактуронана, как и ожидалось, были выявлены в области срединной пластинки (рис. 16А), поскольку именно эта структура характеризуется наибольшей концентрацией пектиновых веществ. В инфицированных растениях эпитопы рамногалактуронана I обнаруживали не только в срединной пластинке, но и на внутренней поверхности клеточных стенок сосудов ксилемы на начальной стадии их колонизации клетками *Pba*

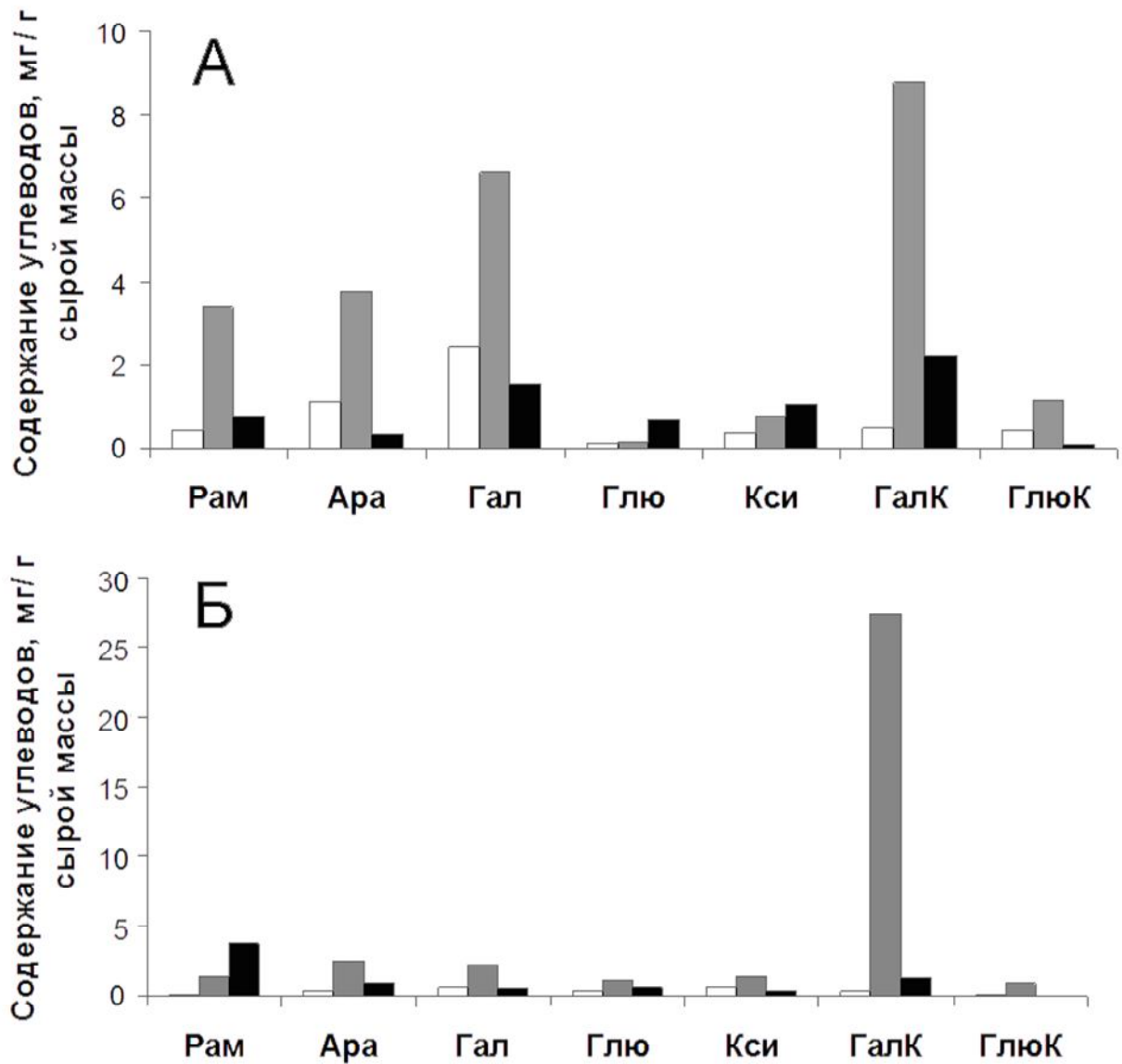


Рис. 15. Моносахаридный состав фракции 1 (А) и фракции 2 (Б) буфер-экстрагируемых полисахаридов контрольных (белые столбцы) и инфицированных *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 (серые столбцы) растений табака, а также клеток *P. atrosepticum* SCRI1043, выращенных *in vitro* (черные столбцы). Обозначение фракций 1 и 2 представлено на рисунке 14.

(рис. 16В, Д, Е). Характер распределения метки при этом соответствовал расположению гранулярных субстанций, накапливающихся на внутренней поверхности растительной клеточной стенки при колонизации сосудов ксилемы патогеном, которые были описаны выше (раздел 3.3.2). Эпитопы полигалактурановой кислоты были выявлены в полости ксилемных сосудов на более поздних стадиях их колонизации микроорганизмами (рис. 16Ж, З).

Таким образом, нами показано, что для построения матрикса бактериальных эмболов микроорганизмы могут использовать растительные полимеры, а именно пектиновые вещества, которые изменяют характер связывания с клеточной стенкой (рис. 14, 15). Особый интерес представило обнаружение фрагментов рамногалактуронана I в полости сосудов инфицированных растений. Нейтральные моносахариды, входящие в состав боковых цепей рамногалактуронана I (галактоза, арабиноза), могут быть ковалентно связаны с ароматическими соединениями (в первую очередь с фенольными соединениями). Окисление ароматических соединений может приводить к их взаимодействию друг с другом по свободнорадикальному механизму и, как следствие, обеспечивать сшивку отдельных полимеров (Горшкова, 2007).

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 затем экстрагировали метанолом (80 %) и

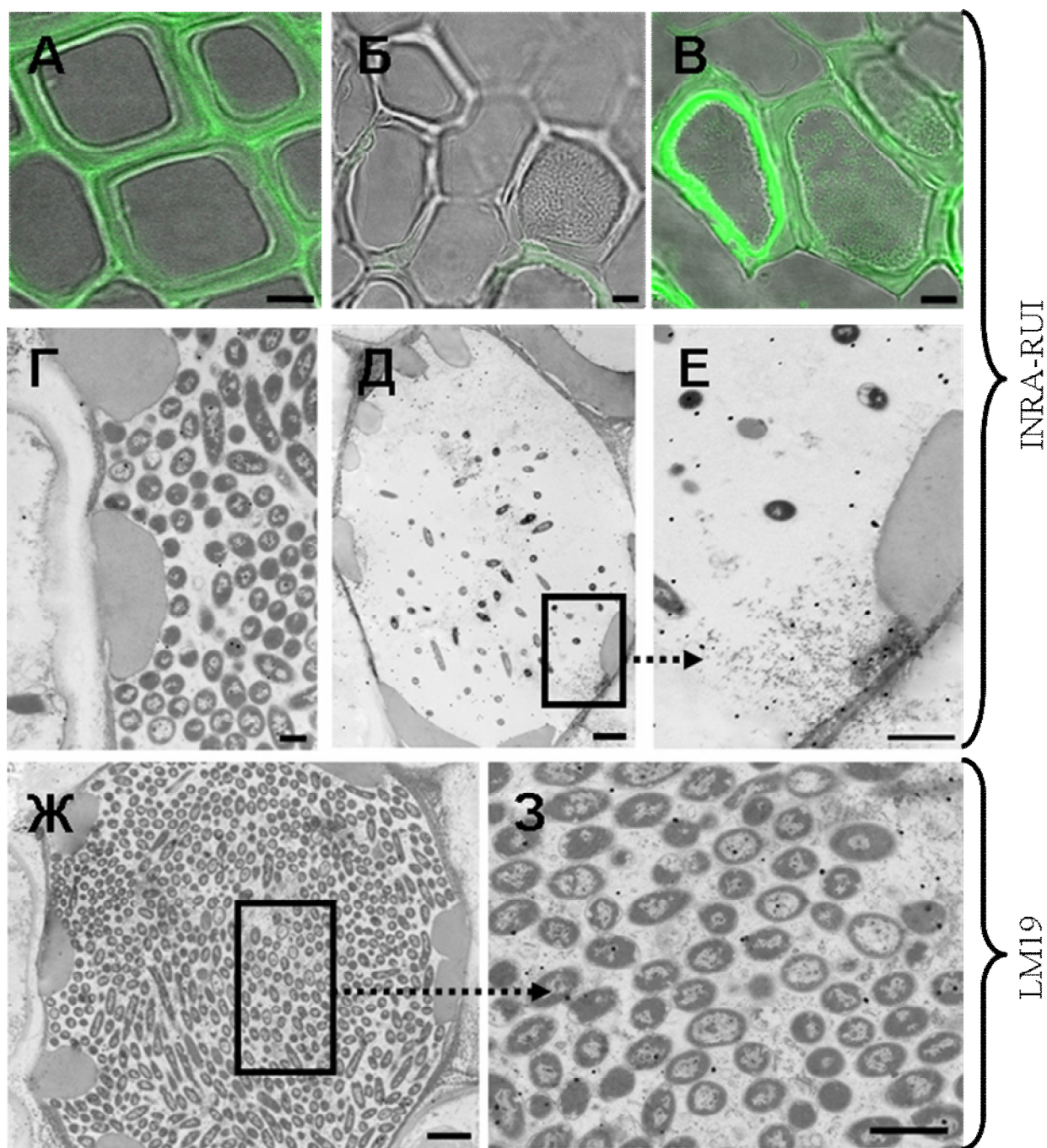


Рис. 16. Иммуноцитохимическая реакция с антителами INRA-RUI и LM19 на остов рамногалактуронана I и неэтерифицированного гомогалактуронана, соответственно, в полости сосудов ксилемы стебля неинфицированного растения табака (А), и растений через двое суток после инфицирования *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 (Б – З). А-В – конфокальная микроскопия; Г-З – электронная микроскопия. Б, Г – срезы, обработанные только вторичными антителами (контроль); А, В, Д, Е –

антителом INRA-RUI; **Ж, 3** – антителом LM19. **Е, 3** – увеличенные фрагменты, выделенные на рисунках **Д** и **Ж**, соответственно. Масштабная линейка соответствует 5 мкм для **А-В**; 500 нм, 2 мкм, 1 мкм, 2 мкм, 1 мкм для **Г-З**, соответственно.

подвергали хроматографическому разделению на колонке SINERGI 4u Polar-RP 80A в градиенте метанола (10-60%).

При сравнении хроматограмм образцов от контрольных и инфицированных растений (рис. 17А и Б) в последних было выявлено появление новых гидрофобных соединений (пики при 35, 41, 47 и 52 % метанола). Сопоставление времени выхода этих соединений с временами выхода стандартов позволяет предположить, что пик, регистрируемый при 52 % метанола принадлежал феруловой кислоте. Без проведения этапа щелочного и кислотного гидролиза при подготовке образцов эти соединения в метанольном экстракте отсутствовали (рис. 17Г). Их не было обнаружено и в метанольном экстракте гомогената выращенных *in vitro* бактериальных клеток, подвергнутого щелочному и кислотному гидролизу (рис. 17В).

Полученные данные свидетельствуют, что обнаруженные с помощью обращенно-фазовой хроматографии 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

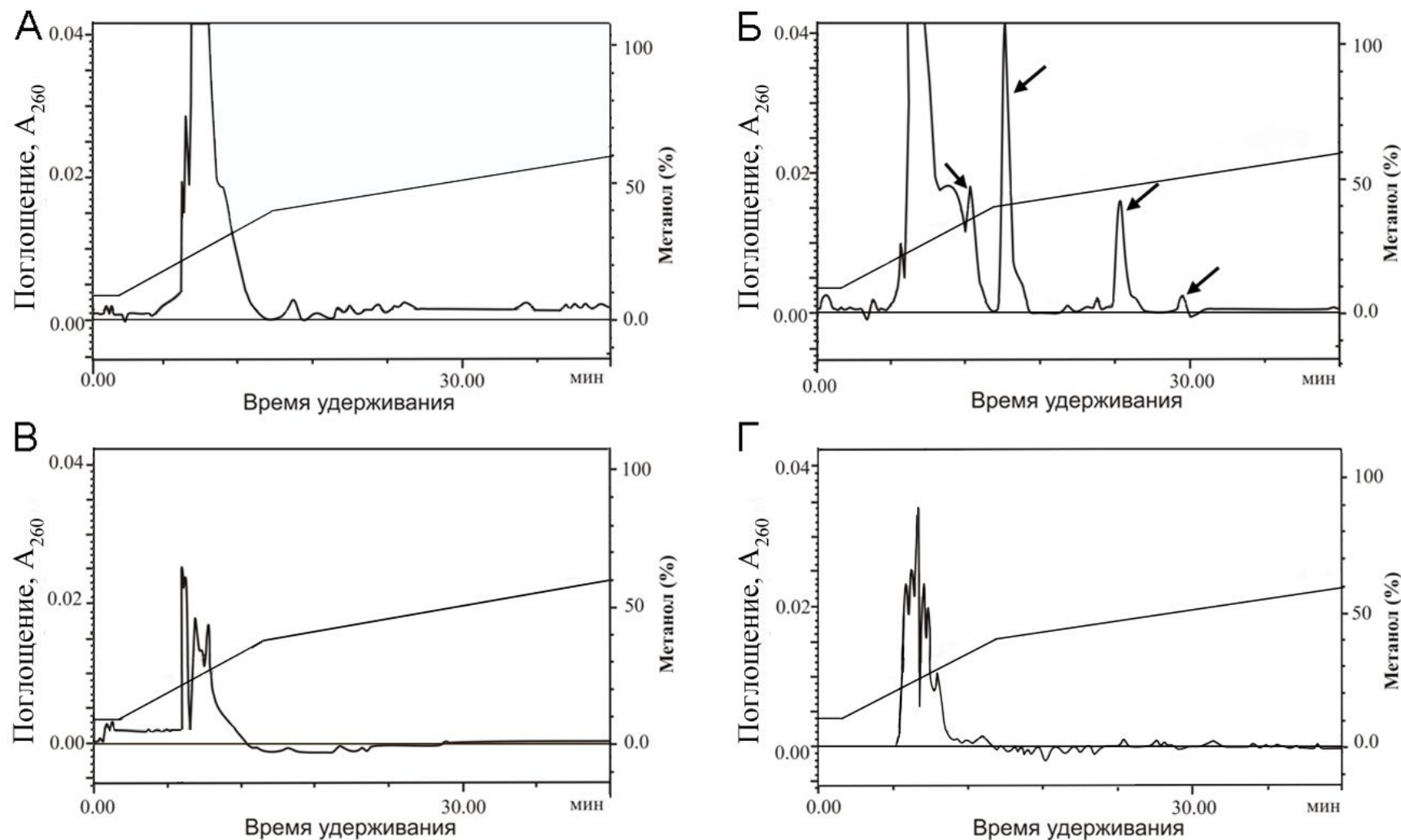


Рис. 17. Профили элюции соединений, экстрагируемых метанолом из буфер-экстрагируемой фракции полисахаридов растений табака и клеток *P. atrosepticum* SCRI1043 после проведения щелочного и кислотного гидролиза (А-В) или без этапа гидролиза (Г): контрольные растения (А); инфицированные *P. atrosepticum* SCRI1043 растения (Б, Г); бактерии *P.*

atrosepticum SCRI1043, выращенные *in vitro* (**B**). 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.

которых может увеличиваться в растениях при развитии инфекционного процесса (Тарчевский, 2002). Мы оценили возможность накопления АФК в сосудах ксилемы инфицированных растений табака при формировании в них бактериальных эмболов. Содержание АФК оценивали с помощью красителя 2',7'- дихлорофлуоресцин диацетата (2',7'-Dichlorofluorescein diacetate; DCF-DA) (Sigma-Aldrich, США).

В контрольных растениях уровень флуоресценции DCF-DA был чуть выше фонового; при этом наибольшая интенсивность была отмечена во вторичных клеточных стенках сосудов вторичной ксилемы; в первичной ксилеме свечения не наблюдали (рис. 18А). В инфицированных растениях интенсивность флуоресценции DCF-DA в клеточных стенках сосудов первичной ксилемы была высокой (рис. 18Б). Более того, свечение было отмечено на внутренней поверхности клеточных стенок, а также в люмене сосудов, колонизированных клетками *Pba* (рис 18Б, В). При анализе срезов, необработанных DCF-DA, флуоресценции не наблюдали (рис 18Г). В том случае, если срезы инфицированных растений до окрашивания DCF-DA обрабатывали антиоксидантами (каталазой или супероксиддисмутазой), интенсивность флуоресценции красителя была низкой (рис. 18Д, Е).

Известно, что АФК могут обладать антимикробным эффектом и приводить к угнетению патогена в организме хозяина (Тарчевский, 2002). Однако в ходе проведенного анализа ультраструктурных характеристик патогена в процессе колонизации сосудов ксилемы табака повреждений бактериальных клеток выявлено не было. Бактерии активно размножались до полной закупорки полости сосуда. Это согласуется с данными, что перекись водорода (в концентрации, характерной для инфицированных растений) не

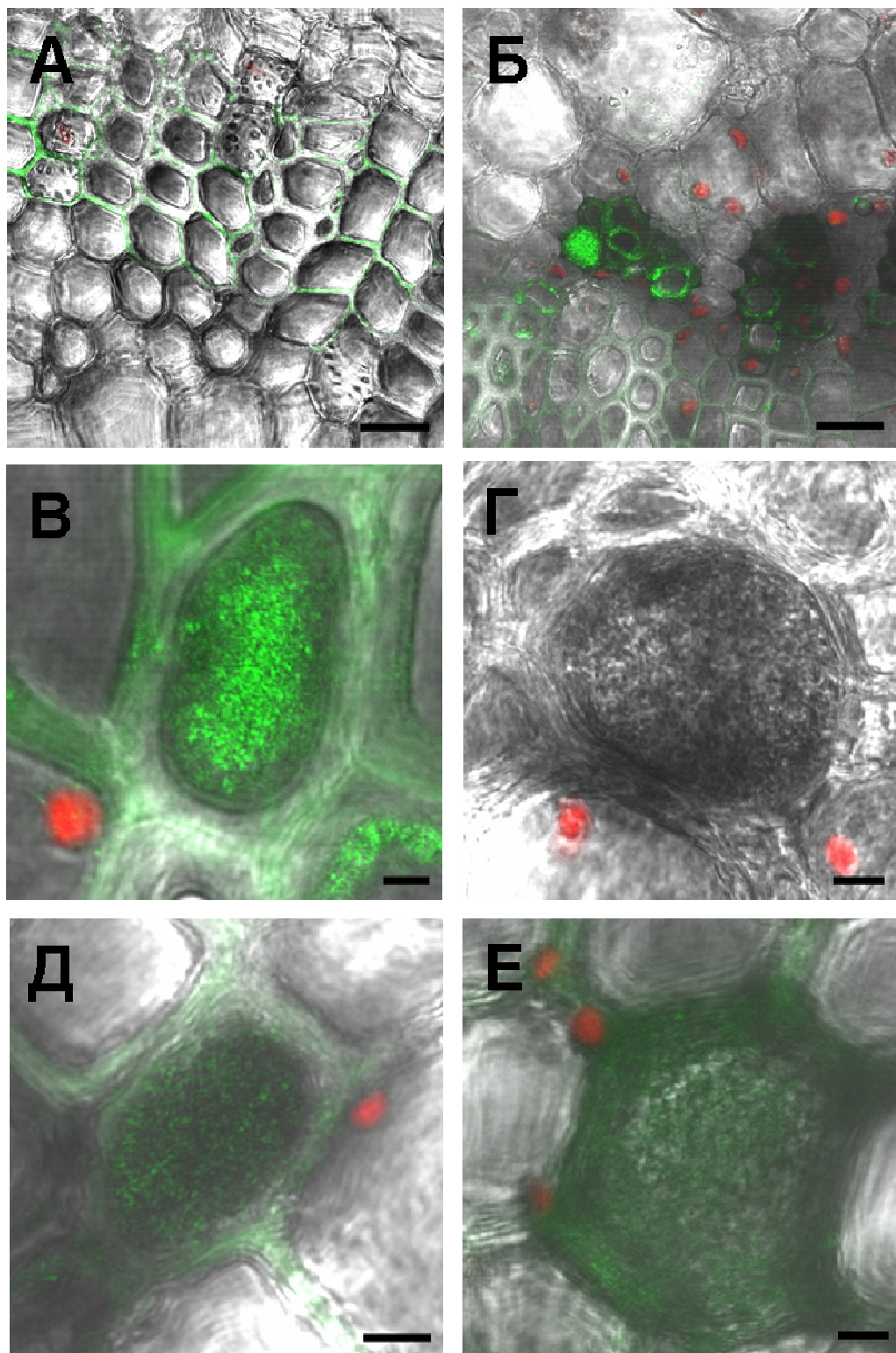


Рис. 18. Детекция активных форм кислорода в растениях табака с помощью красителя 2',7'-дихлорофлуоресцин диацетата (2',7'-Dichlorofluorescein diacetate; DCF-DA). На photographs представлены срезы контрольных неинфицированных (А) и инфицированных клетками *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 (Б – Е) растений табака. Вариант (Г)

не был окрашен DCF-DA. Д, Е – срезы растений до окрашивания DCF-DA были обработаны супероксиддисмутазой или каталазой, соответственно. Масштабные линейки – 20, 20, 2, 5, 5, 5 мкм для А – Е, соответственно.

обладает антимикробным действием в отношении многих бактерий, в том числе родственной *Pba Erwinia chrysanthemi* (*Dickeya dadantii*) (Asselbergh *et al.*, 2008). Вероятно, что накопление АФК в люмене ксилемных сосудов инфицированных растений приводит к окислению ароматических соединений, связанных с полисахаридами, содержащихся в ксилемном соке, что приводит к сшивке полимеров. В свою очередь, формирование «сети» полисахаридов может способствовать закреплению бактерий в люмене сосуда и обеспечить формирование бактериального эмбола.

Таким образом, в процессе инфекции в растениях, в том числе в люмене ксилемных сосудов, появляются высокомолекулярные продукты распада пектиновых веществ. Часть этих продуктов содержит в своем составе модифицирующие группы из фенольных соединений. Накопление в ксилемных сосудах АФК создает условия для окисления этих фенольных соединений, что может способствовать их взаимодействию и сшивке 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 ксилемных сосудах.

Описанные выше особенности модификации пектиновых веществ в инфицированных растениях предполагают работу обширной группы ферментов, в частности, гликозил-гидролаз, фенолпероксидаз и т.д. Однако, вопрос не только о конкретных ферментах, задействованных в этом процессе, но и об их происхождении (растительное или микробное) остается пока открытым. *Pba* обладает большим арсеналом гликозил-гидролаз и других групп ферментов, разрушающих полисахариды растений (Ito *et al.*, 1988).

Однако ферменты, модифицирующие фенольные соединения, у этой бактерии пока не описаны. В то же время, некоторые события, происходящие в ксилемных сосудах при развитии инфекционного процесса (накопление гранулярной субстанции и начальные стадии ее разрыхления), начинают происходить, когда в люмене присутствуют лишь единичные бактериальные клетки. Продукция экстраклеточных ферментов малым количеством бактерий будет весьма не эффективной для подобного изменения структуры растительных клеток, особенно учитывая, что регуляция синтеза этих факторов вирулентности зависит от плотности микробной популяции (Мае *et al.*, 2001). Поэтому возможно, что в обнаруженных процессах важную роль играют и ферменты растения-хозяина.

Изменение структуры растительной клеточной стенки, связанное с модификацией ее компонентов, может быть следствием не только действия бактериальных ферментов, но и защитной реакции организма хозяина. При этом может происходить как «упрочнение» структуры самой клеточной стенки, так и формирование в ксилемных сосудах гелей и тилл, обычно препятствующих системному распространению инфекционных агентов (Wallis, Truter 1978; Hilaire *et al.*, 2001). Все эти изменения, безусловно, сопряжены с индукцией активности определенных ферментов растения, которая может осуществляться на разных регуляторных уровнях (транскрипционный, посттранскрипционный, трансляционный и посттрансляционный). Однако, как уже упоминалось выше, подобные «защитные» реакции не обязательно сопряжены с устойчивостью растения, а в некоторых случаях, наоборот, делают его более восприимчивым. Поэтому, патоген-индуцируемая модификация полимеров клеточной стенки в результате модуляции активности ферментов растения-хозяина может быть рассмотрена и как способ кондиционирования внутренней среды хозяина, обеспечивающий более успешную его колонизацию и формирование патологической системы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в настоящей работе результаты расширяют представление о процессе развития бактериозов растений, вызываемых пектобактериями – возбудителями «мягких гнилей». Стратегии взаимодействия фитопатогенных бактерий с растениями принято делить на два основных типа: 1) «*brute force*» – колонизация растения-хозяина за счет «грубой силы», а именно интенсивной продукции ферментов, разрушающих ткани хозяина, и токсинов, вызывающих гибель клеток макроорганизма, и 2) «*stealth*» – использование «деликатного поведения» и «хитрости» при развитии в организме хозяина (Liu *et al.*, 2008). Считается, что пектобактерии используют стратегию первого типа (Charkowski *et al.*, 2012). 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-хозяина, а также протекающие в них физиологические процессы формируют «микрониши» для отдельных субпопуляций патогена. Это, по всей видимости, является движущей силой, обеспечивающей реализацию имеющегося у пектобактерий потенциала к формированию разных клеточных фенотипов и специализированных структур. В результате этого разные «компарменты» растения оказываются колонизированными различными по ультраструктуре и физиологии клетками патогена. Так, описанные в нашей работе бактериальные эмболы формируются только в ксилемных сосудах в ходе детерминированной последовательности происходящих в них биохимических и физиологических процессов: 1) преобразования полисахаридов клеточной стенки растения; 2) появления в полости сосудов высокомолекулярных продуктов частичного распада полисахаридов, содержащих фенольные соединения; 3) окисления фенольных соединений вследствие накопления АФК и формирования трехмерных полимерных сетей (гелей).

Субпопуляциям патогена, формирующимся в растении-хозяине ткане- и/или стадия-специфично, свойственна функциональная специализация. Одни обеспечивают закупорку ксилемных сосудов, другие – мацерацию тканей, третьи – колонизацию ризосферы, четвертые – эффективное сохранение резерва популяции после гибели растения-хозяина. Количественное соотношение разных субпопуляций бактерий в растении соответствует характеру взаимодействия партнеров. Так, при описанной в нашем исследовании бессимптомной инфекции у растений табака, происходит угнетение субпопуляции клеток пектобактерий, колонизирующих паренхиму, но не сосуды ксилемы.

Различные типы инфекционного процесса, вызванного пектобактериями, отличают друг от друга также особенности функционирования регуляторных систем, координирующих ответные реакции растений. Так, при типичной инфекции активируется жасмонат-зависимый ответ, чего не происходит при бессимптомной инфекции, сопряженной с индукцией экспрессии салицилат-индуцируемых генов. Таким образом, типичные и бессимптомные инфекции различаются как минимум по двум аспектам: 1) особенностям колонизации растений патогеном (только ксилема, или ксилема и коровая паренхима); 2) особенностям функционирования гормональных систем растения.

Обобщая полученные нами результаты можно сделать следующее заключение. Формирование патосистемы *Nicotiana tabacum* – *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 может происходить по двум возможным сценариям (рис. 19). При взаимодействии с растением-хозяином 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 ксилемных сосудов, создавая условия для нисходящей миграции бактерий. В результате этого

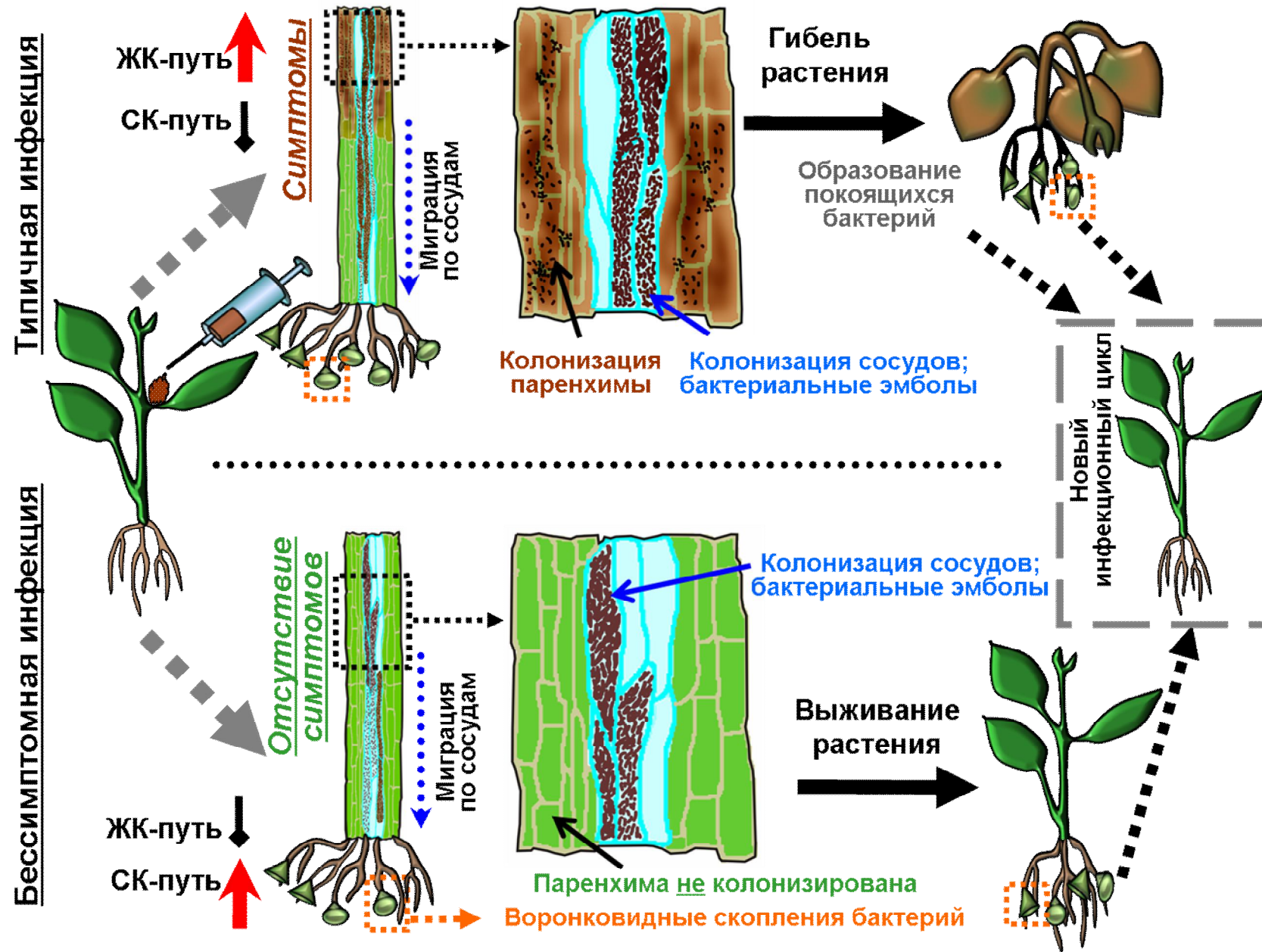


Рис. 19. Схема формирования растительно-микробной патосистемы *Nicotiana tabacum* – *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043. Описание в тексте. ЖК-, СК- путь – жасмонат-, салицилат-зависимые ответные реакции, соответственно.

микроорганизмы колонизируют корневую систему растений и ризосферу. По всей вероятности, попадание бактерий в почвенную экосистему способствует инфицированию новых хозяев. При типичной инфекции, сопряженной с развитием симптомов заболевания, растение погибает вследствие генерализованного поражения разных тканей; после этого клетки патогена обратимо переходят в покоящееся некультивируемое состояние. Таким образом, развитие симптомов заболевания и гибель растения-хозяина не являются обязательным условием формирования патологической системы *Nicotiana tabacum* – *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043, а популяционный цикл пектобактерий *in planta* может проходить бессимптомно.

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. Нельзя исключать и то, что выбор стратегии взаимодействия детерминирован совокупностью этих факторов. Полученные в настоящей работе результаты и разработанные тестовые системы 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 патогенного организма, 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беспалов, М.М. Функции аутоиндукторов анабиоза микроорганизмов при создании метаболического блока в клетке / М.М. Беспалов, А.И. Колпаков, Н.Г. Лойко, Е.В. Дорошенко, А.Л. Мулюкин, А.Н. Козлова, Е.А. Варламова, Б.И. Курганов, Г.И. Эль-Регистан // Микробиология. – 2000. – Т.69. – N 2. – С. 217–223.
2. Бородулин, В. Большой медицинский энциклопедический словарь / В. Бородулин, А. Тополянский, под ред. В. Бородулина // Рипол Классик, 2007. – 960 с.
3. Великанов, Л.Л. Инфекционные болезни растений: физиологические и биохимические основы / перевод с англ. Л.Л. Великанов, Л.М. Левкина, В.П. Прохоров, И.И. Сидорова, под ред. и с предисл. Ю.Т. Дьякова // М.: ВО Агропромиздат, 1985. – 367 с.
4. Головлев, Е.Л. Другое состояние неспорулирующих бактерий / Е.Л. Головлев // Микробиология. – 1998. – Т.67. – N 6. – С. 725–735.
5. Горленко, М.В. Бактериальные болезни растений / М.В. Горленко, М.А. Чумаевская, Р.И. Кирюхина. – М.: Колос, 1981. – 287 с.
6. Горшков, В. Ю. Образование «некультивируемых» покоящихся форм фитопатогенной энтеробактерии *Erwinia carotovora* / В.Ю. Горшков, О.Е. Петрова, Н.Е. Мухаметшина, М.В. Агеева, А.Л. Мулюкин, Ю.В. Гоголев // Микробиология. – 2009. – Т. 78. – N 5. – С. 647–655.
7. Горшкова, Т.А. Растительная клеточная стенка как динамичная система / Т.А. Горшкова. – М.: Наука, 2007. – 429 с.
8. Давыдова, О.К. О механизмах взаимодействия ДНК с химическими аналогами микробных аутоиндукторов анабиоза / О.К. Давыдова, Д.Г. Дерябин, А.Н. Никиян, Г.И. Эль-Регистан // Микробиология. – 2005. – Т. 74. – N 5. – С. 616–625.
9. Деверолл, Б.Д. Защитные механизмы растений / Б.Д. Деверолл; перевод с англ. М.И. Бухара, под ред. и с предисл. Л.А. Воронкова. – М.: Колос, 1980. – 128 с.

10. Дорошенко, Е.В. Характеристика диссоциантов, штамм 504 / Е.В. Дорошенко, Н.Г. Лойко, О.Н. Ильинская, А.И. Колпаков, И.В. Горнова, Г.И. Эль-Регистан // Микробиология. – 2001. – Т. 70. – N 6. – С. 811–819.
11. Дуда, В.И. Образование покоящихся рефрактильных клеток у *Bacillus cereus* под влиянием ауторегуляторного фактора // В.И. Дуда, С.В. Пронин, Г.И. Эль-Регистан, А.С. Капрельянц, Л.Л. Митюшина // Микробиология. – 1982. – Т. 51. – N 1. – С. 77–81.
12. Дьяков, Ю.Т. Общая и молекулярная фитопатология / Ю.Т. Дьяков, О.Л. Озерецковская, В.Г. Джавахия, С.Ф. Багирова. – М.: Общество фитопатологов, 2001. – 302 с.
13. Дьяков, Ю.Т. Фундаментальная фитопатология / Под ред. Ю.Т. Дьякова. – М.: Красанд, 2012. – 512 с.
14. Зигангирова, Н.А. Влияние факторов внешней среды на экспрессию гена *Mycoplasma pneumoniae*, детерминирующего синтез белка Р1 / Н.А. Зигангирова, О.И. Бархатова, И.В. Раковская, А.Л. Гинцбург // ЖМЭИ. – 2003. – N 4. – С. 17–22.
15. Ильинская, О.Н. Роль бактериальных ауторегуляторов роста группы алкилоксибензолов в ответе на стрессовые воздействия / О.Н. Ильинская, А.И. Колпаков, М.А. Шмидт, Е.В. Дорошенко, А.Л. Мулюкин, Г.И. Эль-Регистан // Микробиология. – 2002а. – Т. 71. – N 1. – С. 23–29.
16. Ильинская, О.Н. Влияние аутоиндукторов анабиоза на геном микробных клеток / О.Н. Ильинская, А.И. Колпаков, П.В. Зеленин, З.Д. Круглова, Б. Чойдаш, Е.В. Дорошенко, А.Л. Мулюкин, Г.И. Эль-Регистан // Микробиология. – 2002б. – Т. 71. – N 2. – С. 194–199.
17. Колпаков, А.И. Стабилизация ферментов аутоиндукторами анабиоза как один из механизмов устойчивости покоящихся форм микроорганизмов / А.И. Колпаков, О.Н. Ильинская, М.М. Беспалов, Ф.Г. Куприянова-Ашина, В.Ф. Гальченко, Б.И. Курганов, Г.И. Эль-Регистан // Микробиология. – 2000. – Т. 69. – N 2. – С. 224–230.

18. Лойко, Н.Г. Покоящиеся формы *Sinorhizobium meliloti* / Н.Г. Лойко, Н.А. Кряжевских, Н.Е. Сузина, Е.В. Демкина, В.Ф. Гальченко, Г.И. Эль-Регистан // Микробиология. – 2011. – Т. 80. – С. 465–476.
19. Маниатис, Т. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Д. Сэмбрук. – М.: Мир, 1984. – 480 с.
20. Медведев, С.С. Биология развития растений. Начала биологии развития растений. Фитогормоны: в 2-х т. / С.С. Медведев, Е.И. Шарова. – Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2011. – 1 т. – 253 с.
21. Мулюкин, А.Л. Образование покоящихся форм *Bacillus cereus* и *Micrococcus luteus* // А.Л. Мулюкин, К.А. Луста, М.Н. Грязнова, А.Н. Коздова, М.В. Дужа, В.И. Дуда, Г.И. Эль-Регистан // Микробиология. – 1996. – Т. 65. – N 6. – С. 782–789.
22. Мулюкин, А.Л. Влияние микробных аутоиндукторов анабиоза – алкилоксибензолов – на структурную организацию ДНК *Pseudomonas aurantiaca* и индукцию фенотипической диссоциации / А.Л. Мулюкин, М.А. Вархушев, Н.Б. Стражевская, А.С. Шмырина, Р.И. Жданов, Н.Е. Сузина, В.И. Дуда, Г.И. Эль-Регистан // Микробиология. – 2005. – Т. 74. – N 2. – С. 157–165.
23. Мулюкин, А.Л. Структурное и физиологическое разнообразие цистоподобных покоящихся клеток бактерий рода *Pseudomonas* / А.Л. Мулюкин, Н.Е. Сузина, В.И. Дуда, Г.И. Эль-Регистан // Микробиология. – 2008. – Т. 77. – N 4. – С. 512–523.
24. Поздеев, О.К. Медицинская микробиология / О.К. Поздеев. – М.: Гэотар-мед, 2002. – 768 с.
25. Полевой, В.В. Физиология растений: Учеб. для биол. спец. вузов / В.В. Полевой. – М.: Высш. Шк, 1989. – 464 с.
26. Сузина, Н.Е. Тонкое строение покоящихся клеток некоторых неспорообразующих бактерий / Н.Е. Сузина, А.Л. Мулюкин, А.Н. Козлова, А.П. Шорохова, В.В. Дмитриев, Е.С. Барина, О.Н. Мохова,

- Г.И. Эль-Регистан, В.И. Дуда // Микробиология. – 2004. – Т. 73. – N 4. – С. 516 – 529.
27. Тарр, С.А. Основы патологии растений / С.А. Тарр; перевод с англ. Л.М. Дунина, Н.Л. Клячко, под ред. и с предисл. М.С. Дунина. – М.: Мир, 1974. – 587 с.
28. Тарчевский, И.А. Сигнальные системы клеток растений / И.А. Тарчевский. – М.: Наука, 2002. – 294 с.
29. Третьякова, О.М. Молекулярно-генетические особенности взаимодействия бактерий *Pectobacterium carotovorum*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Dickeya dadantii* с растениями картофеля *Solanum tuberosum* L.: автореф. дис. на соискание ученой степени канд. биол. наук: 03.01.07 "Молекулярная генетика" / Ольга Михайловна Третьякова. – Минск, 2013. – 22 с.
30. Фролов, В.А. Патологическая физиология / В.А. Фролов, Г.А. Дроздова, Т.А. Казанская, Д.П. Билибин, Е.А. Демуров, под ред. В.А. Фролова. – М.: ОАО Изд-во Экономика, 1999. – 616 с.
31. Чикин, Ю.А. Общая фитопатология (часть 1) / Ю.А. Чикин. – Томск, 2001. – 170 с.
32. Шлеева, М.О. Образование «некультивируемых» клеток *Mycobacterium tuberculosis* и их оживление / М.О. Шлеева, Г.В. Мукамолова, М.В. Телков, Т.Л. Березинская, А.В. Сыроешкин, С.Ф. Бикетов, А.С. Капрельянц // Микробиология. – 2003. – Т. 72. – N 1. – С. 76–83.
33. Эль-Регистан, Г.И. Регуляция роста и развития *Pseudomonas carboxydoflava* специфическими эндогенными факторами / Г.И. Эль-Регистан, Г.В. Цышнатий, М.В. Дужа, С.В. Пронин, Л.Л. Митюшина, Н.Д. Савельева, А.С. Капрельянц, Ю.М. Соколов // Микробиология. – 1980. – Т. 49. – N 4. – С. 561–565.
34. Эль-Регистан, Г.И. Адаптогенные функции внеклеточных ауторегуляторов микроорганизмов / Г.И. Эль-Регистан, А.Л. Мулюкин,

- Ю.А. Николаев, Н.Е. Сузина, В.Ф. Гальченко, В.И. Дуда // Микробиология. – 2006. – Т. 75. – N 4. – С. 446–456.
35. Achard, P. Integration of Plant Responses to Environmentally Activated Phytohormonal Signals / P. Achard, H. Cheng, L. De Grauwe, J. Decat, H. Schoutteten, T. Moritz, D. Van Der Straeten, J. Peng, N.P. Harberd // Science. – 2006. – Vol. 311. – P. 91–94.
36. Achard, P. Plant DELLAs Restrained Growth and Promote Survival of Adversity by Reducing the Levels of Reactive Oxygen Species / P. Achard, J.-P. Renou, R. Berthome', N.P. Harberd, P. Genschik // Current Biology. – 2008. – Vol. 18. – P. 656–660.
37. Achuo, E.A. Influence of drought, salt stress and abscisic acid on the resistance of tomato to *Botrytis cinerea* and *Oidium neolycopersici* / E.A. Achuo, E. Prinsen, M. Höfte // Plant Pathology. – 2006. – Vol. 55. – P. 178–186.
38. Adie, B. Modulation of Plant Defenses by Ethylene / B. Adie, J.M.Chico, I. Rubio-Somoza, R. Solano // J Plant Growth Regul. – 2007a. – Vol. 26. – P. 160–177.
39. Adie, B.A.T. ABA Is an Essential Signal for Plant Resistance to Pathogens Affecting JA Biosynthesis and the Activation of Defenses in *Arabidopsis* / B.A.T. Adie, J. Perez-Perez, M.M. Perez-Perez, M. Godoy, J.-J. Sa'nchez-Serrano, E.A. Schmelz, R. Solano // The Plant Cell. – 2007b. – Vol. 19. – P. 1665–1681.
40. Aertsen, A. Diversify or die: generation of diversity in response to stress / A. Aertsen, C.W. Michiels // Crit Rev Microbiol. – 2005. – Vol. 31. – N.2. – P. 69–78.
41. Agrios, G.N. Plant Pathology / G.N. Agrios. – 5 th ed. – Elsevier Academic Press, 2005. – 922 p.
42. Alfano, J.R. Type III secretion system effector proteins: Double Agents in Bacterial Disease and Plant Defense / J.R. Alfano, A. Collmer // Annu. Rev. Phytopathol. – 2004. – Vol. 42. – P. 385–414.

43. Allan, E.J. Bacterial L-Forms / E.J. Allan, C. Hoischen, J. Gumpert // *Advances in Applied Microbiology*. – 2009. – Vol. 68. – P. 1–39.
44. Al-Mousawi, A.H. Ultrastructural Studies of *Greenbug* (*Hemiptera: Aphididae*) Feeding Damage to Susceptible and Resistant Wheat Cultivars / A.H. Al-Mousawi, P.E. Richardson, R.L. Burton // *Annals of the Entomological Society of America*. – 1983. – Vol. 76. – N.8. – P. 6964–6971.
45. Aloni, R. The three-dimensional structure of vascular tissues in *Agrobacterium tumefaciens*-induced crown galls and in the host stems of *Ricinus communis* L. / R. Aloni, K.S. Pradel, C.I. Uilrich // *Planta*. – 1995. – Vol. 196. – P. 597–605.
46. Alvarez, B. Survival strategies and pathogenicity of *Ralstonia solanacearum* phylotype II subjected to prolonged starvation in environmental water microcosms / B. Alvarez, M.M. Lopez, G.E. Biosca // *Microbiology*. – 2008. – Vol. 154. – P. 3590–3598.
47. Amel, B.K.-N. Survival of *Vibrio fluvialis* in seawater under starvation conditions / B.K.-N. Amel, B. Amine, B. Amina // *Microbiol Res*. – 2008. – Vol. 163. – P. 323–328.
48. Amijee, F. Non-pathogenic Association of L-form Bacteria (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*) with Bean Plants (*Phaseolus vulgaris* L.) and its Potential for Biocontrol of Halo Blight Disease / F. Amijee, E.J. Allan, R.N. Waterhouse, L.A. Glover, A.M. Paton // *Biocontrol Science and Technology*. – 1992. – Vol. 2. – P. 203–214.
49. Andersson, R.A. Role of RpoS in virulence and stress tolerance of the plant pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* / R.A. Andersson, V. Koiv, C. Norman-Setterblad, M. Pirhonen // *Microbiology*. – 1999a. – Vol. 145. – P. 3547–3556.
50. Andersson, R.A. The Response Regulator ExpM Is Essential for the Virulence of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and Acts Negatively on the Sigma Factor RpoS (σ^S) / R.A. Andersson, E.T. Palva, M. Pirhonen // *MPMI*. – 1999b. – Vol. 12. – N.7. – P. 575–584.

51. Anderson, J.P. Antagonistic Interaction between Absciscic Acid and Jasmonate-Ethylene Signaling Pathways Modulates Defense Gene Expression and Disease Resistance in Arabidopsis / J.P. Anderson, E. Badruzsaufari, P.M. Schenk, J.M. Manners, O.J. Desmond, C. Ehlert, D.J. Maclean, P.R. Ebert, K. Kazan // *The Plant Cell*. – 2004. – Vol. 16. – P. 3460–3479.
52. Antunes, L.C.M. Quorum sensing in bacterial virulence / L.C.M. Antunes, R.B.R. Ferreira, M.M.C. Buckner, B.B. Finlay // *Microbiology*. – 2010. – Vol. 156. – P. 2271–2282.
53. Anuchin, A.M. Dormant forms of *Mycobacterium smegmatis* with distinct morphology / A.M. Anuchin, A.L. Mulyukin, N.E. Suzina, V.I. Duda, G.I. El Registan, A.S. Kaprelyants // *Microbiology*. – 2009. – Vol. 155. – P. 1071–1079.
54. Arlat, M. *Xanthomonas campestris* contains a cluster of *hrp* genes related to the larger *hrp* cluster of *Pseudomonas solanacearum* / M. Arlat, C.L. Gough, C.E. Barber, C. Boucher, M.J. Daniels // *MPMI*. – 1991. – Vol. 4. – N.6. – P. 593–601.
55. Asad, S. Bench-to-bedside review: Quorum sensing and the role of cell-to-cell communication during invasive bacterial infection / S. Asad, S.M. Opal // *Crit Care*. – 2008. – Vol. 12. – N.6. – P. 236.
56. Assante, G.L. (+)-Absciscic acid, a metabolite of the fungus *Cercospora rosicola* / G.L. Assante, L. Merlini, G. Nashini // *Experientia*. – 1977. – Vol. 33. – P. 1556–1557.
57. Asselbergh, B. Absciscic acid deficiency leads to rapid activation of tomato defence responses upon infection with *Erwinia chrysanthemi* / B. Asselbergh, A.E. Achuo, M. Höfte, F.V. Gijsegem // *Mol Plant Pathol*. – 2008. – Vol. 9. – N.1. – P. 11–24.
58. Audenaert, K. Absciscic Acid Determines Basal Susceptibility of Tomato to *Botrytis cinerea* and Suppresses Salicylic Acid-Dependent Signaling Mechanisms / K. Audenaert, G.B. De Meyer, M.M. Hofte // *Plant Physiology*. – 2002. – Vol. 128. – P. 491–501.

59. Baccari, C. Assessment of the process of movement of *Xylella fastidiosa* within susceptible and resistant grape cultivars / C. Baccari, S.E. Lindow // *Phytopathology*. – 2011. – Vol. 101. – P. 77–84.
60. Baffone, W. Retention of virulence in viable but non-culturable halophilic *Vibrio* spp. / W. Baffone, B. Citterio, E. Vittoria, A. Casaroli, R. Campana, L. Falzano, G. Donelli // *International Journal of Food Microbiology*. – 2003. – Vol. 89. – P. 31–39.
61. Baffone, W. *Campylobacter jejuni* loss of culturability in aqueous microcosms and ability to resuscitate in a mouse model / W. Baffone, A. Casaroli, B. Citterio, L. Pierfelici, R. Campana, E. Vittoria, E. Guaglianone, G. Donelli // *International Journal of Food Microbiology*. – 2006. – Vol. 107. – P. 83–91.
62. Bain, R.A. Blackleg development and tuber yield in relation to numbers of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on seed tubers / R.A. Bain, M.C.M. Perombelon, L. Tsrer, A. Nachmias // *Plant Pathology*. – 1990. – Vol. 39. – P. 125–133.
63. Balaban, N.Q. Bacterial Persistence as a Phenotypic Switch / N.Q. Balaban, J. Merrin, R. Chait, L. Kowalik, S. Leibler // *Science*. – 2004. – Vol. 305. – N.2. – P. 1622–1625.
64. Bari, R. Role of plant hormones in plant defence responses / R. Bari, J.D.G. Jones // *Plant Mol Biol*. – 2009. – Vol. 69. – P. 473–488.
65. Barnard, A.M.L. Quorum sensing in *Erwinia* species / A.M.L. Barnard, G.P.C. Salmond // *Anal Bioanal Chem*. – 2007. – Vol. 387. – P. 415–423.
66. Barnard, A.M.L. Quorum sensing, virulence and secondary metabolite production in plant soft-rotting bacteria / A.M.L. Barnard, S.D. Bowden, T. Burr, S.J. Coulthurst, R.E. Monson, G.P.C. Salmond // *Phil. Trans. R. Soc. B*. – 2007. – Vol. 362. – P. 1165–1183.
67. Bauer, D.W. *Erwinia chrysanthemi* *hrp* genes and their involvement in soft rot pathogenesis and elicitation of hypersensitive response / D.W. Bauer,

- A.J. Bogdanove, S.V. Beer, A. Collmer // MPMI. – 1994. – Vol. 7. – N.5. – P. 573–581.
68. Baulina, O.I. Population Cytology and Its Role in Research of Life Activity of Procaryotes / O.I. Baulina // Moscow University Biological Sciences Bulletin. – 2008. – Vol. 63. – N.1. – P. 32–39.
69. Beaudoin, N. Interactions between abscisic acid and ethylene signaling cascades / N. Beaudoin, C. Serizet, F. Gosti, J. Giraudat // Plant Cell. – 2000. – Vol. 12. – P. 1103–15.
70. Bell, K.S. Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and characterization of virulence factors / K.S. Bell, M. Sebaihia, L. Pritchard, M.T.G. Holden, L.J. Hyman, M.C. Holeva, N.R. Thomson, S.D. Bentley, L.J.C. Churcher, K. Mungall, R. Atkin, N. Bason, K. Brooks, T. Chillingworth, K. Clark, J. Doggett, A. Fraser, Z. Hance, H. Hauser, K. Jagels, S. Moule, H. Norbertczak, D. Ormond, C. Price, M.A. Quail, M. Sanders, D. Walker, S. Whitehead, G.P.C. Salmond, P.R.J. Birch, J. Parkhill, I.K. Toth // Microbiology. – 2004. – Vol. 101. – N.30. – P. 11105–11110.
71. Benhamou, N. Elicitor-induced plant defence pathways / N. Benhamou // Trends in plant science. – 1996. – Vol. 1. – N.7. – P. 233–240.
72. Benhamou, N. Cell Surface Interactions between Bean Leaf Cells and *Colletotrichum lindemuthianum*: Cytochemical Aspects of Pectin Breakdown and Fungal Endopolygalacturonase Accumulation / N. Benhamou, C. Lafitte, J.P. Barthe, M.T. Esquerré-Tugayé // Plant Physiol. – 1991. – Vol. 97. – N.1. – P. 234–44.
73. Benjamins, R. Auxin: the looping star in plant development / R. Benjamins, B. Scheres // Annu. Rev. Plant Biol. – 2008. – Vol. 59. – P. 443–65.
74. Bent, A.F. Disease Development in Ethylene-Insensitive *Arabidopsis thaliana* Infected with Virulent and Avirulent *Pseudomonas* and *Xanthomonas* Pathogens / A.F. Bent, R.W. Innes, J.R. Ecker, B.J. Staskawicz // MPMI. – 1992. – Vol. 5. – N. 5. – P. 372–378.

75. Berrocal-Lobo, M. Ethylene response factor 1 mediates Arabidopsis resistance to the soilborne fungus *Fusarium oxysporum* / M. Berrocal-Lobo, A. Molina // *Mol Plant Microbe Interact.* – 2004. – Vol. 17. – N. 7. – P. 763–70.
76. Bogosian, G. A matter of bacterial life and death / G. Bogosian, E.V. Bourneuf // *EMBO Reports.* – 2001. – Vol. 21. – N.9. – P. 770–774.
77. Bogosian, G. Recovery of hydrogen peroxide-sensitive culturable cells of *Vibrio vulnificus* give s the appearance of resuscitation from a viable but nonculturable state / G. Bogosian, N.D. Aardema, E.V. Bourneuf, P.J.L. Morris, J.P. O’Neil // *J. Bacteriol.* – 2000. – Vol. 182. – N.18. – P. 5070–5075.
78. Bogs, J. Colonization of host plants by the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* marked with genes for bioluminescence and fluorescence / J. Bogs, I. Bruchmüller, C. Erbar, K. Geider // *Phytopathology.* – 1998. – Vol. 88. – P. 416–421.
79. Boher, B. Ultrastructure of Interactions Between *Cassava* and *Xanthomonas campestris* pv.*manihotis*: Cytochemistry of Cellulose and Pectin Degradation in a Susceptible cultivar / B. Boher, K. Kpemoua, M. Nicole, J. Luisetti, J.P. Geiger // *Phytopathology.* – 1995. – Vol. 85. – P. 777–788.
80. Booth, I.R. Stress and the single cell: Intrapopulation diversity is a mechanism to ensure survival upon exposure to stress / I.R.Booth // *International Journal of Food Microbiology.* – 2002. – Vol. 78. – P. 19–30.
81. Branda, S.S. Biofilms: the matrix revisited / S.S. Branda, S. Vik, L. Friedman, R. Kolter // *Trends Microbiol.* – 2005. – Vol. 13. – N.1. – P. 20–6.
82. Brauer, M.J. Conservation of the metabolomic response to starvation across two divergent microbes / M.J. Brauer, J. Yuan, B.D. Bennett, W. Lu, E. Kimball, D. Botstein, J.D. Rabinowitz // *PNAS.* – 2006. – Vol. 103. – N.51. – P. 19302–7.
83. Brodersen, P. Arabidopsis MAP kinase 4 regulates salicylic acid- and jasmonic acid/ethylene-dependent responses via EDS1 and PAD4 / P. Brodersen, M. Petersen, H.B. Nielsen, S. Zhu, M.-A. Newman, K.M. Shokat, S. Rietz, J. Parke, J. Mundy // *The Plant Journal.* – 2006. – Vol. 47. – P. 532–546.

84. Brooks, D.M. The *Pseudomonas syringae* phytotoxin coronatine promotes virulence by overcoming salicylic acid-dependent defences in *Arabidopsis thaliana* / D.M. Brooks, C. L. Bender, B.N. Kunkel // Molecular Plant Pathology. – 2005. – Vol. 6. – N. 6. – P. 629–639
85. Browse, J. Jasmonate Passes Muster: A Receptor and Targets for the Defense Hormone / J. Browse // Annu. Rev. Plant Biol. – 2009. – Vol. 60. – P. 183–205.
86. Bunker, S.T. Effects of temperature on detection of plasmid and chromosomally encoded *gfp*- and *lux*-labeled *Pseudomonas fluorescens* in soil / S.T. Bunker, T.C. Bates, J.D. Oliver // Environ Biosafety Res. – 2004. – Vol. 3. – P. 1–8.
87. Burr, T. Identification of the central quorum sensing regulator of virulence in the enteric phytopathogen, *Erwinia carotovora* : the VirR repressor / T. Burr, A.M.L. Barnard, M.J. Corbett, C.L. Pemberton, N.J.L. Simpson, G.P.C. Salmond // Molecular Microbiology. – 2006. – Vol. 59. – N.1. – P. 113–125.
88. Buttner, D. Getting across – bacterial type 3 effector proteins on their way to the plant cell / D. Buttner, U. Bonas // The EMBO Journal. – 2002. – Vol. 21. – N.20. – P. 5313–5322.
89. Canet, J.V. Resistance and biomass in *Arabidopsis*: a new model for salicylic acid perception / J.V. Canet, A. Dobon, F. Ibanez, L. Perales, P. Tornero // J. Plant Biotechnol. – 2010. – Vol. 8. – P. 126–41.
90. Cao, F.Y. The roles of ABA in plant–pathogen interactions / F.Y. Cao, K. Yoshioka, D. Desveaux // J Plant Res. – 2011. – Vol. 124. – P. 489–499.
91. Casadesu's, J. Bacterial L-forms require peptidoglycan synthesis for cell division / J. Casadesu's // BioEssays. – 2007. – Vol. 29. – P. 1189–1191.
92. Charkowski, A. The Role of Secretion Systems and Small Molecules in Soft-Rot *Enterobacteriaceae* Pathogenicity / A. Charkowski, C. Blanco, G. Condemine, D. Expert, T. Franza, C. Hayes, N. Hugouvieux-Cotte-Pattat, E.L. Solanilla, D. Low, L. Moleleki, M. Pirhonen, A. Pitman, N. Perna, S.

- Reverchon, P. Rodr'iguez Palenzuela, M.S. Francisco, I. Toth, S. Tsuyumu, J. van der Waals, J. Van der Wolf, F.V. Gijsegem, C.-H. Yang, I. Yedidia // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 2012. – Vol. 50. – P. 21.1–21.25.
93. Chatterjee, A.K. Inactivation of *rsmA* Leads to Overproduction of Extracellular Pectinases, Cellulases, and Proteases in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in the Absence of the Starvation / Cell Density-Sensing Signal, N-(3-Oxohehexanoyl)-L-Homoserine Lactone / A. Chatterjee, Y. Cui, Y. Liu, C.K. Dumenzo, A.K. Chatterjee // *Applied and Environmental Microbiology.* – 1995. – Vol. 61. – N.5. – P. 1959–1967.
94. Chen, Z. *Pseudomonas syringae* type III effector AvrRpt2 alters *Arabidopsis thaliana* auxin physiology / Z. Chen, J.L. Agnew, J.D. Cohen, P. He, L. Shan, Jen Sheen, B.N. Kunkel // *PNAS.* – 2007. – Vol. 104. – N.50. – P. 20131–20136.
95. Cherif, M. Silicon induced resistance in cucumber plants against *Pythium ultimum* / M. Cherif, N. Benhamou, J.G. Menzies, R.R. Bélanger // *Physiological and Molecular Plant Pathology.* – 1992. – Vol. 41. – Issue 6. – P.411–425.
96. Chung, H.S. A Critical Role for the TIFY Motif in Repression of Jasmonate Signaling by a Stabilized Splice Variant of the Jasmonate ZIM-Domain Protein JAZ10 in *Arabidopsis* / H.S. Chung, G.A. Howe // *The Plant Cell.* – 2009. – Vol. 21. – P. 131–145.
97. Chung, H.S. Alternative splicing expands the repertoire of dominant JAZ repressors of jasmonate signaling / H.S. Chung, T.F. Cooke, C.L. DePew, L.C. Patel, N. Ogawa, Y. Kobayashi, G.A. Howe // *The Plant Journal.* – 2010. – Vol. 63. – P. 613–622.
98. Clérivet, A. Tyloses and gels associated with cellulose accumulation in vessels are responses of plane tree seedlings (*Platanus acerifolia*) to the vascular fungus *Ceratocystis fimbriata* f. sp *platani* / A. Clérivet, V. Déon, I. Alami, F. Lopez, J.-P.Geiger, M. Nicole // *Trees.* – 2000. – Vol. 15. – P. 25–31.

99. Cohen, A.C. *Azospirillum brasilense* Sp 245 produces ABA in chemically-defined culture medium and increases ABA content in Arabidopsis plants / A.C. Cohen, R. Bottini, P.N. Piccoli // Plant Growth Regul. – 2008. – Vol. 54. – P. 97–103.
100. Collmer, A. *Pseudomonas syringae* Hrp type III secretion system and effector proteins / A. Collmer, J.L. Badel, A.O. Charkowski, W.-L. Deng, D.E. Fouts, A.R. Ramos, A.H. Rehm, D.M. Anderson, O. Schneewind, K. van Dijk, and J.R. Alfano // PNAS. – 2000. – Vol. 97. – N.16. – P. 8770–8777.
101. Condemine, G. 2-Keto-3-Deoxygluconate Transport System in *Erwinia chrysanthemi* / G. Condemine, J. Robert-Baodouy // Journal of Bacteriology. – 1987. – Vol. 169. – N.5. – P. 1972–1978.
102. Corbett, M. Identification of a New Quorum-Sensing-Controlled Virulence Factor in *Erwinia carotovora* subsp. *Atroseptica* Secreted via the Type II Targeting Pathway / M. Corbett, S. Virtue, K. Bell, P. Birch, T. Burr, L. Hyman, K. Lilley, S. Pooch, I. Toth, G. Salmond // MPMI. – 2005. – Vol. 18. – N.4. – P. 334–342.
103. Cornelis, K. Virulence Genes of the *Phytopathogen Rhodococcus fascians* Show Specific Spatial and Temporal Expression Patterns During Plant Infection / K. Cornelis, T. Maes, M. Jaziri, M. Holsters, K. Goethals // MPMI. – 2001. – Vol. 15. – N.4. – P. 398–403.
104. Costerton, J.W. Overview of microbial biofilms / J.W. Costerton // J Ind Microbiol. – 1995. – Vol. 15. – N.3. – P. 137–40.
105. Coulthurst, S. Genetic and proteomic analysis of the role of *luxS* in the enteric phytopathogen, *Erwinia carotovora* / S. Coulthurst, K. Lilley, G. Salmond // Molecular plant pathology. – 2006. – Vol. 7. – N.1. – P. 31–45.
106. Creelman, R.A. Jasmonic acid distribution and action in plants: Regulation during development and response to biotic and abiotic stress / R.A. Creelman, J.E. Mullet // PNAS. – 1995. – Vol. 92. – P. 4114–4119.

107. Creelman, R.A. Biosynthesis and action of jasmonates in plants / R.A. Creelman, J.E. Mullet // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* – 1997. – Vol. 48. – P. 355–81.
108. Crépin, A. Biological control of pathogen communication in the rhizosphere: A novel approach applied to potato soft rot due to *Pectobacterium atrosepticum* / A. Crépin, C. Barbey, A. Cirou, M. Tannières, N. Orange, M. Feuilloley, Y. Dessaux, J.-F. Burini, D. Faure, X. Latour // *Plant Soil.* – 2012. – Vol. 358. – P. 27–37.
109. Cubitt, M.F. A Metabolic Regulator Modulates Virulence and Quorum Sensing Signal Production in *Pectobacterium atrosepticum* / M.F. Cubitt, P.E. Hedley, N.R. Williamson, J.A. Morris, E. Campbell, I.K. Toth, G.P.C. Salmond // *MPMI.* – 2013. – Vol. 26. – N.3. – P. 356–366.
110. Cui, Y. Identification of a global repressor gene, *rsmA*, of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* that controls extracellular enzymes, *N*-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone, and pathogenicity in soft-rotting *Erwinia* spp / Y. Cui, A. Chatterjee, Y. Liu, C.K. Dumenyo, A.K. Chatterjee // *Journal of Bacteriology.* – 1995. – Vol. 177. – N.17. – P. 5108–5115.
111. Curvers, K. Absciscic Acid Deficiency Causes Changes in Cuticle Permeability and Pectin Composition That Influence Tomato Resistance to *Botrytis cinerea* / K. Curvers, H. Seifi, G. Mouille, R. de Rycke, B. Asselbergh, A. Van Hecke, D. Vanderschaeghe, H. Hofte, N. Callewaert, F. Van Breusegem, M. Hofte // *Plant Physiology.* – 2010. – Vol. 154. – P. 847–860.
112. Cutler, A.J. Formation and breakdown of ABA / A.J. Cutler, J.E. Krochko // *Trends in plant science.* – 1999. – Vol. 4. – N.12. – P. 472–478.
113. Czajkowski, R. Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: a review / R. Czajkowski, M.C.M. Pe'rombelon, J.A. van Veen, J.M. van der Wolf // *Plant Pathology.* – 2011. – Vol. 60. – P. 999–1013.
114. Daayf, F. Early vascular defense reactions of cotton roots infected with a defoliating mutant strain of *Verticillium dahliae* / F. Daayf, M. Nicole, B.

- Boher, A. Pando, J.P. Geiger // European Journal of Plant Pathology. – 1997a. – Vol. 103. – P. 125–136.
115. Daayf, F. Evidence of Phytoalexins in *Cucumber* Leaves Infected with *Powdery Mildew* following Treatment with Leaf Extracts of *Reynoutria sachalinensis* / F. Daayf, A. Schmitt, R.R. Bélanger // Plant Physiol. – 1997b. – Vol. 113. – P. 719–727.
116. Danhorn, T. Biofilm formation by plant-associated bacteria / T. Danhorn, C. Fuqua // Annu Rev Microbiol. – 2007. – Vol. 61. – P. 401–22.
117. Davidsson, R. Pathogenicity of and plant immunity to softrot *pectobacteria* / R. Davidsson, T. Kariola, O. Niemi, E.T. Palva // Frontiers in Plant. – 2013. – Vol. – N.191. – P. 1–13.
118. Day, P. Changes in Membrane Fatty Acid Composition during Entry of *Vibrio vulnificus* into the Viable But Nonculturable State / A. Day, J.D. Oliver // The Journal of Microbiology. – 2004. – Vol. 42. – N.2. – P. 69–73.
119. de Haan, E.G. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum* can cause potato blackleg in temperate climates / E.G. de Haan, T.C.E.M. Dekker-Nooren, Gé W. van den Bovenkamp, A.G.C.L. Speksnijder, P.S. van der Zouwen, J.M. van der Wolf // Eur J Plant Pathol. – 2008. – Vol. 122. – P. 561–569.
120. de Torres-Zabala, M. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* hijacks the Arabidopsis abscisic acid signalling pathway to cause disease / M. de Torres-Zabala, W. Truman, M.H. Bennett, G. Lafforgue, J.W. Mansfield, P.R. Egea, L. Børgesen, M. Grant // The EMBO Journal. – 2007. – Vol. 26. – P. 1434–1443.
121. Deatherage, B.L. Membrane Vesicle Release in Bacteria, Eukaryotes, and Archaea: a Conserved yet Underappreciated Aspect of Microbial Life / B.L. Deatherage, B.T. Cookson // Infection and Immunity. – 2012. – Vol. 80. – N.6. – P. 1948–1957.
122. Delaney, T.P. A Central Role of Salicylic Acid in Plant Disease Resistance / T.P. Delaney, S. Uknes, B. Vernooij, L. Friedrich, K. Weymann,

- D. Negrotto, T. Gaffney, M. Gut-Rella, H. Kessmann, E. Ward, J. Ryals // Science. – 1994. – Vol. 266. – P. 1247–1250.
123. den Besten, H.M. Quantitative analysis of population heterogeneity of the adaptive salt stress response and growth capacity of *Bacillus cereus* ATCC 14579 / H.M. den Besten, C.J. Ingham, J.E. van Hylckama Vlieg, M.M. Beerthuyzen, M.H. Zwietering, T. Abee // Appl Environ Microbiol. – 2007. – Vol. 73. – N.15. – P. 4797–804.
124. Depuydt, S. Modulation of the Hormone Setting by *Rhodococcus fascians* Results in Ectopic KNOX Activation in Arabidopsis / S. Depuydt, K.Doležal, M. Van Lijsebettens, T. Moritz, M. Holsters, D. Vereecke // Plant Physiology. – 2008. – Vol. 146. – P. 1267–1281.
125. Dienelt, M.M. Histopathology of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* from Florida and Mexico in wound-inoculated detached leaves of *Citrus aurantifolia*: transmission electron microscopy / M.M. Dienelt, R.H. Lawson // Phytopathology. – 1989. – Vol. 79. – P. 336–348.
126. Ding, X. Activation of the Indole-3-Acetic Acid–Amido Synthetase GH3-8 Suppresses Expansin Expression and Promotes Salicylate- and Jasmonate-Independent Basal Immunity in Rice / X. Ding, Y. Cao, L. Huang, J. Zhao, C. Xu, X. Li, S. Wang // The Plant Cell. – 2008. – Vol. 20. – P. 228–240.
127. Dörffling, K. Absciscic acid in phytopathogenic fungi of the genera *Botrytis*, *Ceratocytis*, *Fusarium*, and *Rhizoctonia* / K. Dörffling, W. Peterson, E. Sprecher, I. Urbasch, H.P. Hanssen // Z Naturforsch. – 1984. – Vol. 39. – N.6. – P. 683–684.
128. Dong, X. NPR1, all things considered / X. Dong // Current Opinion in Plant Biology. – 2004. – Vol. 7. – P. 547–552.
129. Dong, T. Role of RpoS in Virulence of Pathogens / T. Dong, H.E. Schellhorn // Infection and Immunity. – 2010. – Vol. 78. – N.3. – P. 887–897.
130. Du, M. Retention of Virulence in a Viable but Nonculturable *Edwardsiella tarda* Isolate / M. Du, J. Chen, X. Zhang, A. Li, Y. Li, Y. Wang // Appl Environ Microbiol. – 2007. – Vol. 73. – N.4. – P. 1349–1354.

131. Dubois, M. Colorimetric method for determination of sugars and related substances / M. Dubois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, F. Smith // *Analytical Chemistry*. – 1956. – Vol. 28. – P. 350–356.
132. Efetova, M.A. Central Role of Absciscic Acid in Drought Stress Protection of *Agrobacterium*-Induced Tumors on Arabidopsis / M. Efetova, J. Zeier, M. Riederer, C.-W. Lee, N. Stingl, M. Mueller, W. Hartung, R. Hedrich, R. Deeken // *Plant Physiology*. – 2007. – Vol. 145. – P. 853–862.
133. Ellis, C. The *Arabidopsis* Mutant *cev1* Has Constitutively Active Jasmonate and Ethylene Signal Pathways and Enhanced Resistance to Pathogens / C. Ellis, J.G. Turner // *The Plant Cell*. – 2001. – Vol. 13. – P. 1025–1033.
134. Ellis, C. The *Arabidopsis* Mutant *cev1* Links Cell Wall Signaling to Jasmonate and Ethylene Responses / C. Ellis, I. Karafyllidis, C. Wasternack, J.G. Turner // *The Plant Cell*. – 2002. – Vol. 14. – P. 1557–1566.
135. Ellis, T.N. Virulence and Immunomodulatory Roles of Bacterial Outer Membrane Vesicles / T.N. Ellis, M.J. Kuehn // *Microbiology and molecular biology reviews*. – 2010. – Vol. 74. – N.1. – P. 81–94.
136. Enyedi, A.J. Localization, conjugation, and function of salicylic acid in tobacco during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus (systemic acquired resistance/pathogenesis-related proteins/glucosyltransferase/signal transduction) / A.J. Enyedi, N. Yalpani, P. Silverman, I. Raskin // *PNAS*. – 1992. – Vol. 89. – P. 2480–2484.
137. Epstein, S.S. General Model of Microbial Uncultivability / S.S. Epstein // *Microbiol Monogr*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. – 2009. – P. 131–159.
138. Escobar, M.A. *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease / M.A. Escobar, A.M. Dandekar // *Trends in Plant Science*. – 2003. – Vol. 8. – N.8. – P. 380–386.
139. Eulgem, T. Networks of WRKY transcription factors in defense signaling / T. Eulgem, I.E. Somssich // *Current Opinion in Plant Biology*. – 2007. – Vol. 10. – P. 366–371.

140. Farmer, E.E. Octadecanoid Precursors of Jasmonic Acid Activate the Synthesis of Wound-Inducible Proteinase Inhibitors / E.E. Farmer, C.A. Ryan' // *The Plant Cell*. – 1992. – Vol. 4. – P. 129–134.
141. Fett, W.F. Role of bacterial immobilization in race-specific resistance of soybean to *Pseudomonas syringae* pv. *Glycinea* / W.F. Fett, S.B. Jones // *Phytopathology*. – 1982. – Vol. 72. – P. 488–492.
142. Flemming, H.-C. Biofilms and Environmental Protection / H.-C. Flemming // *Water Science & Technology*. – 1993. – Vol. 27. – N.7-8. – P. 1–10.
143. Flors, V. Interplay between JA, SA and ABA signalling during basal and induced resistance against *Pseudomonas syringae* and *Alternaria brassicicola* / V. Flors, J. Ton, R. van Doorn, G. Jakab, P. Garcí'a-Agusti'n, B. Mauch-Mani // *The Plant Journal*. – 2008. – Vol. 54. – P. 81–92.
144. Fu, Z.Q. NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants / Z.Q. Fu, S. Yan, A. Saleh, W. Wang, J. Ruble, N. Oka, R. Mohan, S.H. Spoel, Y. Tada, N. Zheng, X. Dong // *Nature*. – 2012. – Vol. 486. – N.7402. – P. 228–232.
145. Gaffney, T. Requirement of Salicylic Acid for the Induction of Systemic Acquired Resistance / T. Gaffney, L. Friedrich, B.Vernooij, D. Negrotto, G. Nye, S. Uknes, E. Ward, H. Kessmann, J. Ryals // *Science*. – 1993. – Vol. 261. – P. 754–756.
146. Garcia, M.T. *Acanthamoeba polyphaga* resuscitates viable non-culturable *Legionella pneumophila* after disinfection / M.T. Garcia, S. Jones, C. Pelaz, R.D. Millar, Y.A. Kwaik // *Environmental Microbiology*. – 2007. – Vol. 9. – N.5. – P. 1267–1277.
147. Gefen, O. The importance of being persistent: heterogeneity of bacterial populations under antibiotic stress / O. Gefen, N.Q. Balaban // *FEMS Microbiol Rev*. – 2009. – Vol. 33. – P. 704–717.

148. Geng, X. The Coronatine Toxin of *Pseudomonas syringae* Is a Multifunctional Suppressor of *Arabidopsis* Defense / X. Geng, J. Cheng, A. Gangadharan, D. Mackey // *The Plant Cell*. – 2012. – Vol. 24. – P. 4763–4774.
149. Ghezzi, J.I. Induction of the viable but non-culturable condition in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in liquid microcosms and sterile soil / J.I. Ghezzi, T.R. Steck // *FEMS Microbiology Ecology*. – 1999. – Vol. 30. – P. 203–208.
150. Gilbert, P. Common therapeutic approaches for the control of oral biofilms: microbiological safety and efficacy / P. Gilbert, A. McBain, P. Sreenivasan // *Clin Microbiol Infect*. – 2007. – Suppl. 4. – P. 17–24.
151. Glazebrook, J. Defence against biotrophic and necrotrophic pathogens / J. Glazebrook // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 2005. – Vol. 43. – P. 205–27.
152. Goodman, R.N. Inducible resistance responses in plants to plant pathogenic bacteria / R.N. Goodman // *Mycopathologia*. – 1978. – Vol. 65. – P. 107–113.
153. Goodman, R.N. Ultrastructural evidence for immobilization of an incompatible bacterium, *Pseudomonas pisi*, in tobacco leaf tissue / R.N. Goodman, P.-Y. Huang, J.A. White // *Phytopathology*. – 1976. – Vol. 66. – P. 754–764.
154. Gorshkov, V.Y. Cell-to-cell communication in the populations of enterobacterium *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* SCRI1043 during adaptation to stress conditions / V.Y. Gorshkov, O.E. Petrova, N.E. Gogoleva, Y.V. Gogolev // *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. – 2010. – Vol. 59, Issue 3. – P. 378–385.
155. 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.

156. Govrin, E.M. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea* / E.M. Govrin, A. Levine // *Current Biology*. – 2000. – Vol. 10. – P. 751–757.
157. Grant, M.R. Hormone (dis)harmony moulds plant health and disease / M.R. Grant, J.D. Jones // *Science*. – 2009. – Vol. 324. – N. 5928. – P. 750–752.
158. Greenberg, J.T. Uncoupling Salicylic Acid-Dependent Cell Death and Defense-Related Responses From Disease Resistance in the Arabidopsis Mutant *acd5* / J.T. Greenberg, F.P. Silverman, H. Liang // *Genetics*. – 2000. – Vol. 156. – P. 341–350.
159. Grey, B.E. The viable but nonculturable state of *Ralstonia solanacearum* may be involved in long – term survival and plant infection / B.E. Grey, T.R. Steck // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2001. – Vol. 7. – N.9. – P. 3866–3872.
160. Grimault, V. Distribution of *Pseudomonas solanacearum* in the stem tissues of tomato plants with different levels of resistance to bacterial wilt / V. Grimault, G. Anais, P. Prior // *Plant Pathology*. – 1994. – Vol. 43. – P. 663–668.
161. Gutjahr, C. Weights in the Balance: Jasmonic Acid and Salicylic Acid Signaling in Root-Biotroph Interactions / C. Gutjahr, U. Paszkowski // *MPMI*. – 2009. – Vol. 22. – N.7. – P. 763–772.
162. Hainfield, J. New frontiers in gold labeling / J. Hainfield, R. Powell // *J. Histochem Cytochem*. – 2000. – Vol. 48. – N.4. – P. 471–480.
163. Han, S.W. Small protein-mediated quorum sensing in a Gram-negative bacterium / S.W. Han, M. Sriariyanun, S.W. Lee, M. Sharma, O. Bahar, Z. Bower, P.C. Ronald // *PLoS One*. – 2011. – Vol. 6. – N.12. – P. 1–10.
164. Han, Y. Regulation of basal and oxidative stress-triggered jasmonic acid-related gene expression by glutathione / Y. Han, A. Mhamdi, S. Chaouch, G. Noctor // *Plant, Cell and Environment*. – 2012. – P. 1–12.

165. Hayward, C. Latent infections by bacteria / C. Hayward // Annu. Rev. Phytopathol. – 1974. – Vol. 12. – P. 87–97.
166. Helias, V. Internal colonization pathways of potato plants by *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* / V. Helias, D. Andrivon, B. Jouan // Plant Pathology. – 2000. – Vol. 49. – P. 33–42.
167. Herná'ndez-Blanco, C. Impairment of Cellulose Synthases Required for *Arabidopsis* Secondary CellWall Formation Enhances Disease Resistance / C. Herná'ndez-Blanco, D.X. Feng, J. Hu, A. Sa' nchez-Vallet, L. Deslandes, F. Llorente, M. Berrocal-Lobo, H. Keller, X. Barlet, C. Sa' nchez-Rodríguez, L.K. Anderson, S. Somerville, Y. Marco, A. Molina // The Plant Cell. – 2007. – Vol. 19. – P. 890–903.
168. Hiei, Y. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens* / Y. Hiei, T. Komari, T. Kubo // Plant Molecular Biology. – 1997. – Vol. 35. – P. 205–218.
169. Hilaire, E. Vascular Defense Responses in Rice: Peroxidase Accumulation in Xylem Parenchyma Cells and Xylem Wall Thickening / E. Hilaire, S.A. Young, L.H. Willard, J.D. McGee, T. Sweat, J.M. Chittoor, J.A. Guikema, J.E. Leach // MPMI. – 2001. – Vol. 14. – N.12. – P. 1411–1419.
170. Hirsch, J. Delayed Symptom Development in *ein2-1*, an *Arabidopsis* Ethylene-Insensitive Mutant, in Response to Bacterial Wilt Caused by *Ralstonia solanacearum* / J. Hirsch, L. Deslandes, D.X. Feng, C. Balagué, Y. Marco // Phytopathology. – 2002. – Vol. 92. – P. 1142–1148.
171. Hogan, C.S. The type III secreted effector DspE is required early in *solanum tuberosum* leaf infection by *Pectobacterium carotovorum* to cause cell death, and requires Wx(3-6)D/E motifs / C.S. Hogan, B.M. Mole, S.R. Grant, D.K. Willis, A.O.Charkowski // PLoS One. – 2013. – Vol. 8. – N.6. – P. 1–10.
172. Hu, T. Overexpression of the Tomato 13-Lipoxygenase Gene *TomloxD* Increases Generation of Endogenous Jasmonic Acid and Resistance to *Cladosporium fulvum* and High Temperature / T. Hu, H. Zeng, Z. Hu, X. Qv, G. Chen // Plant Mol Biol Rep. – 2013. DOI 10.1007/s11105-013-0581-4.

173. Huang, P.-Y. Resistance mechanisms of apple shoots to an avirulent strain of *Erwinia amylovora* / P.-Y. Huang, J.-S. Huang, R.N. Goodman // *Physiol Plant Pathol.* – 1975. – Vol. 6. – P. 283–287.
174. Hurek, T. Root Colonization and Systemic Spreading of *Azoarcus* sp. Strain BH72 in Grasses / T. Hurek, B. Reinhold, M. Van Montagu, E. Kellenberger // *Journal of Bacteriology.* – 1994. – Vol. 176. – N.7. – P. 1913–1923.
175. Ingham, C.J. Population heterogeneity of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 microcolonies in response to and recovery from acid stress / C.J. Ingham, M. Beerthuyzen, V.J. van Hylckama // *Appl Environ Microbiol.* – 2008. – Vol. 74. – N.24. – P. 7750–8.
176. Iriti, M. Absciscic acid is involved in chitosan-induced resistance to tobacco necrosis virus (TNV) / M. Iriti, F. Faoro // *Plant Physiology and Biochemistry.* – 2008. – Vol. 46. – P. 1106–1111.
177. Ito, K. DNA structure of pectate lyase I gene cloned from *Erwinia carotovora* / K. Ito, R. Kobayashi, N. Nikaido, K. Izaki // *Agric Biol Chem.* – 1988. – Vol. 52. – N.2. – P. 479–487.
178. James, E.K. *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue in leaves of *Sorghum bicolor* L. Moench / E.K. James, F.L. Olivares, J.I. Baldani, J. Dobereiner // *Journal of Experimental Botany.* – 1997. – Vol. 48. – N. 308. – P. 785–797.
179. James, S.A. Heat dissipation sensors of variable length for the measurement of sap flow in trees with deep sapwood / S.A. James, M.J. Clearwater, F.C. Meinzer, G. Goldstein // *Tree Physiology.* – 2002. – Vol. 22. – P. 277–283.
180. Jiang, C.-J. Absciscic Acid Interacts Antagonistically with Salicylic Acid Signaling Pathway in Rice–*Magnaporthe grisea* Interaction / C.-J. Jiang, M. Shimono, S. Sugano, M. Kojima, K. Yazawa, R. Yoshida, H. Inoue, N. Hayashi, H. Sakakibara, H. Takatsuji // *MPMI.* – 2010. – Vol. 23. – N.6. – P. 791–798.

181. Johnson, S.N. Attractive properties of an isoflavonoid found in white clover root nodules on the clover root weevil / S.N. Johnson, P.J. Gregory, J.R. Greenham, X. Zhang, P.J. Murray // *J Chem Ecol.* – 2005. – Vol. 31. – N.9. – P. 2223-9.
182. Jordan, S. Cell envelope stress response in Gram-positive bacteria / S. Jordan, M.I. Hutchings, T. Mascher // *FEMS Microbiol.* – 2008. – Vol. 32. – P. 107–146.
183. Joseleau-Petit, D. Biosynthesis of a Membrane Adhesion Zone Fraction throughout the Cell Cycle of *Escherichia coli* / D. Joseleau-Petit, F. Kepes, L. Peutat, R. D'ari, L.I. Rothfield // *Journal of Bacteriology.* – 1990. – Vol. 172. – N.11. – P. 6573–6575.
184. Joseleau-Petit, D. ppGpp concentration, growth without PBP2 activity, and growth-rate control in *Escherichia Coli* / D. Joseleau-Petit, D. Thevenet, R. D'Ari // *Molecular Microbiology.* – 1994. – Vol. 13. – P. 911–917.
185. Kachroo, P. A fatty acid desaturase modulates the activation of defense signaling pathways in plants / P. Kachroo, J. Shanklin, J. Shah, E.J. Whittle, D.F. Klessig // *PNAS.* – 2001. – Vol. 98. – N.16. – P. 9448–9453.
186. Kachroo, P. Role of salicylic acid and fatty acid desaturation pathways in *ssi2*-mediated signaling / P. Kachroo, S.C. Venugopal, D.A. Navarre, L. Lapchyk, A. Kachroo // *Plant Physiol.* – 2005. – Vol. 139. – P. 1717–35.
187. Kaliff, M. ABA Is Required for *Leptosphaeria maculans* Resistance via ABI1- and ABI4-Dependent Signaling / M. Kaliff, J. Staal, M. Myrenås, C. Dixelius // *MPMI.* – 2007. – Vol. 20. – N.4. – P. 335–345.
188. Kana, B.D. The resuscitation-promoting factors of *Mycobacterium tuberculosis* are required for virulence and resuscitation from dormancy but are collectively dispensable for growth *in vitro* / B.D. Kana, B.G. Gordhan, K.J. Downing, N. Sung, G. Vostroknutova, E.E. Machowski, L. Tsenova, M. Young, A. Kaprelyants, G. Kaplan, V. Mizrahi // *Molecular Microbiology.* – 2008. – Vol. 67. – N.3. – P. 672–684.

189. Katayama, N. Community-wide effects of below-ground rhizobia on above-ground arthropods / N. Katayama, Z. Zhang, T. Ohgushi // *Ecological Entomology*. – 2011. – Vol. 36. – P. 43–51.
190. Kazemi-Pour, N. The secretome of the plant pathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi* / N. Kazemi-Pour, G. Condemine, N. Hugouvieux-Cotte-Pattat // *Proteomics*. – 2004. – Vol. 4. – N.10. – P. 3177–3186.
191. Keren, I. Specialized Persister Cells and the Mechanism of Multidrug Tolerance in *Escherichia coli* / I. Keren, D. Shah, A. Spoering, N. Kaldalu, K. Lewis // *Journal of Bacteriology*. – 2004. – Vol. 186. – N.24. – P. 8172–8180.
192. Kettner, J. Biosynthesis and metabolism of abscisic acid in tomato leaves infected with *Botrytis cinerea* / J. Kettner, K. Dorffling // *Planta*. – 1995. – Vol. 196. – P. 627–634.
193. Kim, H.-S. *Pectobacterium carotovorum* Elicits Plant Cell Death with DspE/F but the *P. carotovorum* DspE Does Not Suppress Callose or Induce Expression of Plant Genes Early in Plant–Microbe Interactions / H.-S. Kim, P. Thammarat, S.A. Lommel, C.S. Hogan, A.O. Charkowski // *MPMI*. – 2011. – Vol. 24. – N.7. – P. 773–786.
194. Kloeck, A.P. Resistance to *Pseudomonas syringae* conferred by an *Arabidopsis thaliana* coronatine-insensitive (*coi1*) mutation occurs through two distinct mechanisms / A.P. Kloeck, M.L. Verbsky, S.B. Sharma, J.E. Schoelz, J. Vogel, D.F. Klessig, B.N. Kunkel // *The Plant Journal*. – 2001. – Vol. 26. – N. 5. – P. 509–522.
195. Knoester, M. Ethylene-insensitive tobacco lacks nonhost resistance against soil-borne fungi / M. Knoester, L.C. Van Loon, J. Van den Heuvel, J. Hennig, J.F. Bol, H.J.M. Linthorst // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1998. – Vol. 95. – P. 1933–1937.
196. Koczan, J.M. Contribution of *Erwinia amylovora* exopolysaccharides amylovoran and levan to biofilm formation: Implications in pathogenicity / J.M. Koczan, M.J. McGrath, Y. Zhao, G.W. Sundin // *Phytopathology*. – 2009. – Vol. 99. – P. 1237–1244.

197. Koga, H. Absciscic acid and low temperatures suppress the whole plant-specific resistance reaction of rice plants to the infection of *Magnaporthe grisea* / H. Koga, K. Dohi, M. Mori // *Physiol. Mol. Plant Pathol.* – 2004. – Vol. 65. – P. 3–9.
198. Kondo, K. Morphology of the viable but nonculturable *Vibrio cholerae* as determined by the freeze fixation technique / K. Kondo, A. Takade, K. Amako // *FEMS Microbiol Lett.* – 1994. – Vol. 123. – N.1-2. – P. 179–84.
199. Koornneef, A. Cross Talk in Defense Signaling / A. Koornneef, C.M.J. Pieterse // *Plant Physiology.* – 2008. – Vol. 146. – P. 839–844.
200. Koutsoudis, M.D. Quorum-sensing regulation governs bacterial adhesion, biofilm development, and host colonization in *Pantoea stewartii* subspecies *stewartii* / M.D. Koutsoudis, D. Tsaltas, T.D. Minogue, S.B. von Bodman // *PNAS.* – 2006. – Vol. 103. – N.15. – P. 5983–8.
201. Kozubek, A. Resorcinolic Lipids, the Natural Non-isoprenoid Phenolic Amphiphiles and Their Biological Activity / A. Kozubek, J.H. Tyman // *Chem Rev.* – 1999. – Vol. 99. – N.1. – P. 1–26.
202. Kpemoua, K. Cytochemistry of defense responses in cassava infected by *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* / K. Kpemoua, B. Boher, M. Nicole, P. Calatayud, and J.P. Geiger // *Can. J. Microbiol.* – 1996. – Vol. 42. – P. 1131–1143.
203. Kubheka, G.C. Colonization patterns of an mCherry-tagged *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* strain in potato plants / G.C. Kubheka, T.A. Coutinho, N. Moleleki, L.N. Moleleki // *Phytopathology.* – 2013. – Vol. 103. – P. 1268–79.
204. Kulkarni, G.B. Indole-3-acetic acid biosynthetic pathway and aromatic amino acid aminotransferase activities in *Pantoea dispersa* strain GPK / G.B. Kulkarni, A.S. Nayak, S.S. Sajjan, A. Oblesha, T.B. Karegoudar // *Letters in Applied Microbiology.* – 2013. – Vol. 56. – P. 340–347.

205. Kumar, D. Differential Induction of Tobacco MAP Kinases by the Defense Signals Nitric Oxide, Salicylic Acid, Ethylene, and Jasmonic Acid / D. Kumar, D.F. Klessig // MPMI. – 2000. – Vol. 13. – N.3. – P. 347–351.
206. Kunkel, B.N. Cross talk between signaling pathways in pathogen defense / B.N. Kunkel, D.M. Brooks // Current Opinion in Plant Biology. – 2002. – Vol. 5. – P. 325–331.
207. Kurosawa, E. Experimental studies on the nature of the substance excreted by the “bakanae” fungus / E. Kurosawa // Trans. Nat. Hist. Soc. Formosa 16. – 1926. – P. 213–27. [in Japanese; quoted from Phinney (1983)].
208. Kussel, E. Phenotypic diversity, population growth, and information in fluctuating environments / E. Kussel, S. Leibler // Science. – 2005. – Vol. 309. – N.5743. – P. 2075–8.
209. Lannoo, N. The Jasmonate-Induced Expression of the *Nicotiana tabacum* Leaf Lectin / N. Lannoo, G.Vandenborre, O. Miersch, G. Smagghe, C. Wasternack, W.J. Peumans, E.J.M. Van Damme // Plant Cell Physiol. – 2007. – Vol. 48. – N.8. – P. 1207–1218.
210. Laurie-Berry, N. The *Arabidopsis thaliana* Jasmonate insensitive 1 Gene Is Required for Suppression of Salicylic Acid-Dependent Defenses During Infection by *Pseudomonas syringae* / N. Laurie-Berry, V. Joardar, I.H. Street, B.N. Kunkel // MPMI. – 2006. – Vol. 19. – N.7. – P. 789–800.
211. Lawton, K. Systemic Acquired Resistance in *Arabidopsis* Requires Salicylic Acid but Not Ethylene / K. Lawton, K. Weymann, L. Friedrich, B. Vernooij, S. Uknes, J. Ryals // MPMI. – 1995. – Vol. 8. – N.6. – P. 863–870.
212. Lee, I.J. Comparative Ultrastructure of Nonwounded Mexican Lime and Yuzu Leaves Infected With the Citrus Canker Bacterium *Xanthomonas citri* pv. *citri* / I.J. Lee, K.W. Kim, J.W. Hyun, Y.H. Lee, E.W. Park // Microscopy research and technique. – 2009. – Vol. 72. – P. 507–516.
213. Lee, V.T. Protein secretion and the pathogenesis of bacterial infections / V.T. Lee, O. Schneewind // Genes Dev. – 2001. – Vol. 15. – P. 1725–1752.

214. Leite, B. Colony aggregation and biofilm formation in xylem chemistry-based media for *Xylella fastidiosa* / B. Leite, P.C. Andersen, M.L. Ishida // FEMS Microbiol. Lett. – 2004. – Vol. 230. – P. 283–290.
215. Lentimäki, S. Characterization of the *hrp* pathogenicity cluster of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* : high basal level expression in a mutant is associated with reduced virulence / S. Lehtimäki, A. Rantakari, J. Routtu, A. Tuikkala, J. Li, O. Virtaharju, E.T. Palva, M. Romantschuk, H.T. Saarilahti // Mol Gen Genomics. – 2003. – Vol. 270. – P. 263–272.
216. Lewis, K. Persister Cells / K. Lewis // Annu. Rev. Microbiol. – 2010. – Vol. 64. – P. 357–72.
217. Li, J. The WRKY70 Transcription Factor: A Node of Convergence for Jasmonate-Mediated and Salicylate-Mediated Signals in Plant Defense / J. Li, Günter Brader, E.T. Palva // The Plant Cell. – 2004. – Vol. 16. – P. 319–331.
218. Li, J. WRKY70 modulates the selection of signaling pathways in plant defense / J. Li, G. Brader, T. Kariola, E.T. Palva // The Plant Journal. – 2006. – Vol. 46. – P. 477–491.
219. Lidstrom, M.E. The role of physiological heterogeneity in microbial population behavior / M.E. Lidstrom, M.C. Konopka // Nat Chem Biol. – 2010. – Vol. 6. – N.10. – P. 705–12.
220. Linder, K. Membrane fatty acid and virulence changes in the viable but nonculturable state of *Vibrio vulnificus* / K. Linder, J.D. Oliver // Appl Environ Microbiol. – 1989. – Vol. 55. – N.11. – P. 2837–42.
221. Liu, H. Quorum Sensing Coordinates Brute Force and Stealth Modes of Infection in the Plant Pathogen *Pectobacterium atrosepticum* / H. Liu, S.J. Coulthurst, L. Pritchard, P.E. Hedley, M. Ravensdale¹, S. Humphris, T. Burr, G. Takle, B. May-Bente, P.R.J. Birch, G.P.C. Salmond, I.K. Toth // PLoS Pathogens. – 2008. – Vol. 4. – N.6. – P. 1–11.
222. Liu, P. Indoleacetic acid, a product of transferred DNA, inhibits *vir* gene expression and growth of *Agrobacterium tumefaciens* C58 / P. Liu, E.W. Nester // PNAS. – 2006. – Vol. 103. – N.12. – P. 4658–4662.

223. Liu, Y. Characterization of a novel RNA regulator of *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* that controls production of extracellular enzymes and secondary metabolites / Y. Liu, Y. Cui, A. Mukherjee, A. Chatterjee // Molecular Microbiology. – 1998. – Vol. 29. – N.1. – P. 219–234.
224. Liu, Y. *kdgREcc* Negatively Regulates Genes for Pectinases, Cellulase, Protease, HarpinEcc, and a Global RNA Regulator in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* / Y. Liu, G. Jiang, Y. Cui, A. Mukherjee, W.L. Ma, A.K. Chatterjee // Journal of Bacteriology. – 1999. – Vol. 181. – N.8. – P. 2411–2422.
225. Lleo, M.M. Inhibition of the resuscitation from the viable but non-culturable state in *Enterococcus faecalis* / M.M. Lleo, D. Benedetti, M.C. Tafi, C. Signoretto, P. Canepari // Environ Microbiol. – 2007. – Vol. 9. – P. 2313–2320.
226. Llorente, F. Repression of the Auxin Response Pathway Increases *Arabidopsis* Susceptibility to Necrotrophic Fungi / F. Llorente, P. Muskett, A. Sa' nchez-Vallet, G. Lo' pez, B. Ramos, C. Sa' nchez-Rodri' guez, L. Jorda' , J. Parker, A. Molina // Molecular Plant. – 2008. – Vol. 1. – N. 3. – P. 496–509.
227. Lomovskaya, O.L. Characterization of the sigma 38-dependent expression of a core *Escherichia coli* starvation gene, *pexB* / O.L. Lomovskaya, J.P. Kidwell, A. Matin // J Bacteriol. – 1994. – Vol. 176. – N.13. – P. 3928–3935.
228. Lopez, J. Assembly Site of Bacteriophage fl Corresponds to Adhesion Zones between the Inner and Outer Membranes of the Host Cell / J. Lopez, R.E. Webster // Journal of Bacteriology. – 1985. – Vol. 163. – N.3. – P. 1270–1274.
229. Lopez, M.A. Controlling hormone signaling is a plant and pathogen challenge for growth and survival / M.A. Lopez, G. Bannenberg, C. Castresana // Current Opinion in Plant Biology. – 2008. – Vol. 11. – P. 420–427.
230. Lory, S. Secretion of proteins and assembly of bacterial surface organelles: shared pathways of extracellular protein targeting / S. Lory // Current Opinion in Microbiology. – 1998. – Vol. 1. – N.1. – P. 27–35.

231. Lu, H. Dissection of salicylic acid-mediated defense signaling networks / H. Lu // *Plant Signaling & Behavior*. – 2009. – Vol. 4. – N.8. – P. 713–717.
232. Lund, S.T. Ethylene Regulates the Susceptible Response to Pathogen Infection in Tomato / S.T. Lund, R.E. Stall, H.J. Klee // *The Plant Cell*. – 1998. – Vol. 10. – P. 371–382.
233. Maalej, S. Maintenance of pathogenicity during entry into and resuscitation from viable but nonculturable state in *Aeromonas hydrophila* exposed to natural seawater at low temperature / S. Maalej, R. Gdoura, S. Dukan, A. Hammami, A. Bouain // *Journal of Applied Microbiology*. – 2004. – Vol. 97. – P. 557–565.
234. MacMillan, J. Occurrence of Gibberellins in Vascular Plants, Fungi, and Bacteria / J. MacMillan // *J Plant Growth Regul.* – 2001. – Vol. 20. – N.4. – P. 387–442.
235. Mae, A. Transgenic Plants Producing the Bacterial Pheromone *N*-Acyl-Homoserine Lactone Exhibit Enhanced Resistance to the Bacterial Phytopathogen *Erwinia carotovora* / A. Mae, M. Montesano, V. Koiv, E.T. Palva // *MPMI*. – 2001. – Vol. 14. – N.9. – P. 1035–1042.
236. Manas, P. Morphological and Physiological Changes Induced by High Hydrostatic Pressure in Exponential- and Stationary-Phase Cells of *Escherichia coli*: Relationship with Cell Death / P. Manas, B.M. Mackey // *Appl Environ Microbiol.* – 2004. – Vol. 70. – N.3. – P. 1545–1554.
237. Mansfield, J. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology / J. Mansfield, S. Genin, S. Magori, V. Citovsky, M. Sriariyanum, P. Ronald, M. Dow, V. Verdier, S.V. Beer, M.A. Machado, I. Toth, G. Salmond, G.D. Foster // *Molecular Plant Pathology*. – 2012. – Vol. 13. – N.6. – P. 614–629.
238. Marden, P. Physiological and morphological changes during short term starvation of marine bacterial isolates / P. Marden, A. Tunlid, K. Malmcrona-Friberg, G. Odham, S. Kjelleberg // *Arch. Microbiol.* – 1985. – Vol. 142. – P. 326–332.

239. Marois, E. The *Xanthomonas* type III effector protein AvrBs3 modulates plant gene expression and induces cell hypertrophy in the susceptible host / E. Marois, G. van den Ackerveken, U. Bonas // MPMI. – 2002. – Vol. 15. – N.7. – P. 637–46.
240. Marquez-Villavicencio, M.D.P. Soft rot disease severity is affected by potato physiology and *Pectobacterium* Taxa / M.D.P. Marquez-Villavicencio, R.L. Groves, A.O. Charkowski // Plant Dis. – 2011. – Vol. 95. – P. 232–241.
241. Mathesius, U. Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum-sensing signals / U. Mathesius, S. Mulders, M. Gao, M. Teplitski, G. Caetano-Anolle', B.G. Rolfe, W.D. Bauer // PNAS. – 2003. – Vol. 100. – N.3. – P. 1444–1449.
242. Mauch-Mani, B. The role of abscisic acid in plant–pathogen interactions / B. Mauch-Mani, F. Mauch // Current Opinion in Plant Biology. – 2005. – Vol. 8. – P. 409–414.
243. McBroom, A.J. Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response / A.J. McBroom, M.J. Kuehn // Molecular Microbiology. – 2007. – Vol. 63. – N.2. – P. 545–558.
244. McDonald, K.L. Influence of abscisic acid and the abscisic acid biosynthesis inhibitor, norflurazon, on interactions between *Phytophthora sojae* and soybean (*Glycine max*) / K.L. McDonald, D.M. Cahill // Eur. J. Plant Pathol. – 1999. – Vol. 105. – P. 651–658.
245. McDougald, D. Nonculturability: adaptation or debilitation? / D. McDougald, S.A. Rice, D. Weichert, S. Kjelleberg // FEMS Microbiol Eco. – 1998. – Vol. 25. – P. 1–9.
246. Mei, C. Inducible Overexpression of a Rice Allene Oxide Synthase Gene Increases the Endogenous Jasmonic Acid Level, *PR* Gene Expression, and Host Resistance to Fungal Infection / C. Mei, M. Qi, G. Sheng, Y. Yang // MPMI. – 2006. – Vol. 19. – N.10. – P. 1127–1137.
247. Meier, B.M. Spatial and Temporal Accumulation of Defense Gene Transcripts in Bean (*Phaseolus vulgaris*) Leaves in Relation to Bacteria –

- Induced Hypersensitive Cell Death / B.M. Meier, N. Shaw, A.J. Slusarenko // MPMI. – 1993. – Vol. 6. – N.4. – P. 453–466.
248. Melotto, M. Plant Stomata Function in Innate Immunity against Bacterial Invasion / M. Melotto, W. Underwood, J. Koczan, K. Nomura, S.Y. He // Cell. – 2006. – Vol. 126. – P. 969–980.
249. Memelink, J. Regulation of gene expression by jasmonate hormones / J. Memelink // Phytochemistry. – 2009. – Vol. 70. – P. 1560–1570.
250. Meng, Y. Upstream Migration of *Xylella fastidiosa* via Pilus-Driven Twitching Motility / Y. Meng, Y. Li, C.D. Galvani, G. Hao, J.N. Turner, T.J. Burr, H.C. Hoch // Journal of bacteriology. – 2005. – Vol. 187. – N.16. – P. 5560–5567.
251. Miller, M.B. Quorum sensing in bacteria / M.B. Miller, B.L. Bassler // Annu. Rev. Microbiol. – 2001. – Vol. 55. – P. 165–99.
252. Mizunoe, Y. Resuscitation of viable but nonculturable cells of *Vibrio parahaemolyticus* induced at low temperature under starvation / Y. Mizunoe, S. N. Wai, T. Ishikawa, A. Takade, S.I. Yoshida // FEMS Microbiology Letters. – 2000. – Vol. 186. – N.1. – P. 115–120.
253. Mohr, P.G. Suppression by ABA of salicylic acid and lignin accumulation and the expression of multiple genes, in *Arabidopsis* infected with *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* / P.G. Mohr, D.M. Cahill // Funct Integr Genomics. – 2007. – Vol. 7. – P. 181–191.
254. Möker, N. *Pseudomonas aeruginosa* increases formation of multidrug-tolerant persister cells in response to quorum-sensing signaling molecules / N. Möker, C.R. Dean, J. Tao // J Bacteriol. – 2010. – Vol. 192. – N.7. – P. 1946–55.
255. Mole, B.M. Global virulence regulation networks in phytopathogenic bacteria / B.M. Mole, D.A. Baltrus, J.L. Dang, S.R. Grant // Trends in Microbiology. – 2007. – Vol. 15. – N.8. – P. 363–371.
256. Morgham, A.T. Effects of continuous dark upon ultrastructure, bacterial populations and accumulation of phytoalexins during interactions between

- Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* and bacterial blight susceptible and resistant cotton / A.T. Morgham, P.E. Righardson, Essenberg, E. C. Cover // Physiological and Molecular Plant Pathology. – 1988. – Vol. 32. – P. 141–162.
257. Mou, Z. Inducers of Plant Systemic Acquired Resistance Regulate NPR1 Function through Redox Changes / Z. Mou, W. Fan, X. Dong // Cell. – 2003. – Vol. 113. – P. 935–944.
258. Mukamolova, G.V. Biochemical changes accompanying the long-term starvation of *Micrococcus luteus* cells in spent growth medium / G.V. Mukamolova, N.D. Yanopolskaya, T.V. Votyakova, V.I. Popov, A.S. Kaprelyants, D.B. Kell // Arch. Microbiol. – 1995. – Vol. 163. – P. 373–379.
259. Mukamolova, G.V. On resuscitation from the dormant state of *Micrococcus luteus* / G.V. Mukamolova, N.D. Yanopolskaya, D.B. Kell, A.S. Kaprelyants // Antonie van Leeuwenhoek. – 1998. – Vol. 73. – P. 237–243.
260. Mukamolova, G.V. The *rpf* gene of *Micrococcus luteus* encodes an essential secreted growth factor / G.V. Mukamolova, O.A. Turapov, K. Kazarian, M. Telkov, A.S. Kaprelyants, D.B. Kell, M. Young // Molecular Microbiology. – 2002. – Vol. 46. – N.3. – P. 611–621.
261. Mukamolova, G.V. Muralytic activity of *Micrococcus luteus* Rpf and its relationship to physiological activity in promoting bacterial growth and resuscitation / G.V. Mukamolova, A.G. Murzin, E.G. Salina, G.R. Demina, D.B. Kell, A.S. Kaprelyants, M. Young // Molecular Microbiology. – 2006. – Vol. 59. – N.1. – P. 84–98.
262. Mukherjee, A. Global regulation in *Erwinia* species by *Erwinia carotovora* *rsmA*, a homologue of *Escherichia coli* *csrA*: repression of secondary metabolites, pathogenicity and hypersensitive reaction / A. Mukherjee, Y. Cui, Y. Liu, C.K. Dumenyo, A.K. Chatterjee // Microbiology. – 1996. – Vol. 142. – P. 427–434.
263. Mukherjee, A. Molecular Characterization and Expression of the *Erwinia carotovora* *hrpNEcc* Gene, Which Encodes an Elicitor of the

- Hypersensitive Reaction / A. Mukherjee, Y. Cui, Y.Liu, A.K. Chatterjee // MPMI. – 1997. – Vol. 10. – N.4. – P. 462–471.
264. Mukherjee, A. RpoS (Sigma-S) controls expression of *rsmA*, a global regulator of secondary metabolites, harpin, and extracellular proteins in *Erwinia carotovora* / A. Mukherjee, Y. Cui, W. Ma, Y. Liu, A. Ishihama, A. Eisensark, A.K. Chatterjee // Journal of Bacteriology. – 1998. – Vol. 180. – N.14. – P. 3629–3634.
265. Muller, B. Advances in Cytokinin Signaling / B. Muller, J. Sheen // Science. – 2007. – Vol. 318. – P. 68–69.
266. Mur, L.A.J. The Outcomes of Concentration-Specific Interactions between Salicylate and Jasmonate Signaling Include Synergy, Antagonism, and Oxidative Stress Leading to Cell Death / L.A.J. Mur, P. Kenton, R. Atzorn, O. Miersch, C. Wasternack // Plant Physiology. – 2006. – Vol. 140. – P. 249–262.
267. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // Physiol. Plant. – 1962. – Vol. 15. – P. 473–497.
268. Murphy, M. Comparison of cytokinin production *in vitro* by *Pyrenopeziza brassicae* with other plant pathogens / M. Murphy, E. Pryce-Jones, K. Johnstone, A.M. Ashby // Physiological and Molecular Plant Pathology. – 1997. – Vol. 50. – P. 53–65.
269. Nandi, A. *Arabidopsis ssi2*-Conferred Susceptibility to *Botrytis cinerea* Is Dependent on *EDS5* and *PAD4* / A. Nandi, W. Moeder, P. Kachroo, D.F. Klessig, J. Shah // MPMI. – 2005. – Vol. 18. – N.4. – P. 363–370.
270. Navarro, L. A Plant miRNA Contributes to Antibacterial Resistance by Repressing Auxin Signaling / L. Navarro, P. Dunoyer, F. Jay, B. Arnold, N. Dharmasiri, M. Estelle, O. Voinnet, J.D.G. Jones // Science. – 2006. – Vol. – P. 436–439.
271. Navarro, L. DELLAs Control Plant Immune Responses by Modulating the Balance of Jasmonic Acid and Salicylic Acid Signaling / L. Navarro, R.

- Bari, P. Achard, P. Liso' n, A. Nemri, N.P. Harberd, J.D.G. Jones // *Current Biology*. – 2008. – Vol. 18. – P. 650–655.
272. Nawrath, C. Salicylic acid induction-deficient mutants of *Arabidopsis* express *PR-2* and *PR-5* and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation / C. Nawrath, J.P. Métraux // *Plant Cell*. – 1999. – Vol. 11. – P. 1393–404.
273. Nawrath, C. EDS5, an Essential Component of Salicylic Acid–Dependent Signaling for Disease Resistance in *Arabidopsis*, Is a Member of the MATE Transporter Family / C. Nawrath, S. Heck, N. Parinthewong, J.-P. Métraux // *The Plant Cell*. – 2002. – Vol. 14. – P. 275–286.
274. Neimark, H. Origins and evolution of wall-less prokaryotes / H. Neimark // *In The Bacterial L-forms* (Ed. Madoff). Marcel Dekker Inc., New York & Basel. – 1986. – P. 21–42.
275. Nickstadt, A. The jasmonate-insensitive mutant *jin1* shows increased resistance to biotrophic as well as necrotrophic pathogens / A. Nickstadt, B.P.H.J. Thomma, I.V. Feussner, J. Kangasjarvi, J. Zeier, C. Loeffler, D. Scheel, S. Berger // *Molecular plant Pathology*. – 2004. – Vol. 5. – N.5. – P. 425–434.
276. Nilsson, L. Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the Viable but Nonculturable State / L. Nilsson, J.D. Oliver, S. an Kjelleberg // *Journal of Bacteriology*. – 1991. – Vol. 173. – N. 16. – P. 5054–5059.
277. Norman-Setterblad, C. Interacting Signal Pathways Control Defense Gene Expression in *Arabidopsis* in Response to Cell Wall-Degrading Enzymes from *Erwinia carotovora* / C. Norman-Setterblad, S. Vidal, E.T. Palva // *MPMI*. – 2000. – Vol. 13. – N.4. – P. 430–438.
278. Novitsky, J.A. Morphological Characterization of Small Cells Resulting from Nutrient Starvation of a Psychrophilic Marine *Vibrio* / J.A. Novitsky, R.Y. Morita // *Appl Environ Microbiol*. – 1976. – Vol. 32. – N.4. – P. 617–622.

279. Nowakowska, J. Resistance to environmental stresses by *Vibrio vulnificus* in the viable but nonculturable state / J. Nowakowska, J.D. Oliver // FEMS Microbiol Ecol. – 2013. – Vol. 84. – N.1. – P. 213–22.
280. O'Donnell, P.J. Ethylene-dependent salicylic acid regulates an expanded cell death response to a plant pathogen / P.J. O'Donnell, J.B. Jones, F.R. Antoine, J. Ciardi, H.J. Klee // The Plant Journal. – 2001. – Vol. 25. – N.3. – P. 315–323.
281. O'Donnell, P.J. Susceptible to intolerance – a range of hormonal actions in a susceptible *Arabidopsis* pathogen response / P.J. O'Donnell, E.A. Schmelz, P. Moussatche, S.T. Lund, J.B. Jones, H.J. Klee // The Plant Journal. – 2003a. – Vol. 33. – P. 245–257.
282. O'Donnell, P.J. Multiple Hormones Act Sequentially to Mediate a Susceptible Tomato Pathogen Defense Response / P.J. O'Donnell, E. Schmelz, A. Block, O. Miersch, C. Wasternack, J.B. Jones, H.J. Klee // Plant Physiology. – 2003b. – Vol. 133. – P. 1181–1189.
283. Oliver, J.D. The public health significance of viable but nonculturable bacteria / J.D. Oliver. – Nonculturable Microorganisms in the Environment (Colwell RR & Grimes DJ, eds). – 2000. – P. 277–300.
284. Oliver, J.D. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria / J.D. Oliver // FEMS Microbiology Reviews Volume. – 2010. – Vol. 34. – Issue 4. – P. 415–425.
285. Oliver, J.D. *In Vivo* Resuscitation, and Virulence towards Mice, of Viable but Nonculturable Cells of *Vibrio vulnificus* / J.D. Oliver, R. Bockian // Applied and Environmental Microbiology. – 1995. – Vol. 61. – N.7. – P. 2620–2623.
286. Ordax, M. Survival Strategy of *Erwinia amylovora* against Copper: Induction of the Viable-but-Nonculturable State / M. Ordax, E. Marco-Noales, M.M. Lo'pez, E.G. Biosca // Applied and environmental microbiology. – 2006. – Vol. 72. – N.5. – P. 3482–3488.

287. Ordax, M. Survival of *Erwinia amylovora* in mature apple fruit calyces through the viable but nonculturable (VBNC) state / M. Ordax, E.G. Biosca, S.C. Wimalajeewa, M.M. Lo'pez, E. Marco-Noales // Journal of Applied Microbiology. – 2009. – Vol. 107. – P. 106–116.
288. Ouellette, G.B. Ultrastructural and cytochemical study of colonization of xylem vessel elements of susceptible and resistant *Dianthus caryophyllus* by *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* / G.B. Ouellette, R.P. Baayen, M. Simard, D. Rioux // Can. J. Bot. – 1999. – Vol. 77. – P. 644–663.
289. Ozawa, R. Involvement of Jasmonate- and Salicylate-Related Signaling Pathways for the Production of Specific Herbivore-Induced Volatiles in Plants / R. Ozawa, G.-i. Arimura, J. Takabayashi, T. Shimodaira, T. Nishioka // Plant Cell Physiol. – 2000. – Vol. 41. – N.4. – P. 391–398.
290. Pallas, J.A. Tobacco plants epigenetically suppressed in phenylalanine ammonia-lyase expression do not develop systemic acquired resistance in response to infection by tobacco mosaic virus / J.A. Pallas, N.L. Paiva, C. Lamb, R.A. Dixon // The Plant Journal. – 1996. – Vol. 10. – N.2. – P. 281–293.
291. Palva, T.K. Salicylic acid Induced Resistance to *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora* in Tobacco / T.K. Palva, M. Hurtig, P. Saindrenan, E.T. Palva // MPMI. – 1994. – Vol. 7. – N.3. – P. 356–363.
292. Partida-Martinez, L.P. The microbe-free plant: fact or artifact? / L.P. Partida-Martinez, M. Heil // Front. Plant Sci. – 2011. – Vol. 2. – P. 1–16.
293. Perez-Donoso, A.G. *Xylella fastidiosa* Infection and Ethylene Exposure Result in Xylem and Water Movement Disruption in Grapevine Shoots / A.G. Perez-Donoso, L.C. Greve, J.H. Walton, K.A. Shackel, J.M. Labavitch // Plant Physiology. – 2007. – Vol. 143. – P. 1024–1036.
294. Penninckx, I.A.M.A. Concomitant Activation of Jasmonate and Ethylene Response Pathways Is Required for Induction of a Plant Defensin Gene in Arabidopsis / I.A.M.A. Penninckx, B.P.H.J. Thomma, A. Buchala, J.-P. Métraux, W. F. Broekaert // The Plant Cell. – 1998. – Vol. 10. – P. 2103–2113.

295. Perombelon, M.C.M. Potato diseases caused by soft rot erwinias: an overview of Pathogenesis / M.C.M. Perombelon // Plant Pathology. – 2002. – Vol. 51. – P. 1–12.
296. Perombelon, M.C.M. Methods for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*) on potatoes: a laboratory manual / M.C.M. Perombelon, J.M. Van der Wolf // Scottish Crop Research Institute Occasional Publication. – 2002. – N.10. – P.1–82.
297. Petersen, M. *Arabidopsis* MAP Kinase 4 Negatively Regulates Systemic Acquired Resistance / M. Petersen, P. Brodersen, H. Naested, E. Andreasson, U. Lindhart, B. Johansen, H.B. Nielsen, M. Lacy, M.J. Austin, J.E. Parker, S.B. Sharma, D.F. Klessig, R. Martienssen, O. Mattsson, A.B. Jensen, J. Mundy // Cell. – 2000. – Vol. 103. – P. 1111–1120.
298. 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.
299. Pieterse, C.M. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis* / C.M. Pieterse, S.C. van Wees, J.A. van Pelt, M. Knoester, R. Laan R., H. Gerrits H., P.J. Weisbeek, L.C. van Loon // Plant Cell. – 1998. – Vol. 10. – N.9. – P.1571–80.
300. Pieterse, C.M.J. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* requires sensitivity to jasmonate and ethylene but is not accompanied by an increase in their production / C.M.J. Pieterse, J.A. Van Pelt, J. Ton, S. Parchmann, M.J. Mueller, A.J. Buchala, J.-P. Metraux, L.C. Van Loon // Physiol Mol Plant Pathol. – 2000. – Vol. 57. – P. 123–134.
301. Pieterse, C.M.J. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance: triggering, signalling and expression / C.M.J. Pieterse, J.A. Van Pelt, S.C.M. Van Wees, J. Ton, K.M. L'eon-Kloosterziel, J.J.B. Keurentjes, B.W.M.

- Verhagen, M. Knoester, I. Van der Sluis, P.A.H.M. Bakker, L.C. Van Loon // European Journal of Plant Pathology. – 2001. – Vol. 107. – P. 51–61.
302. Pieterse, C.M.J. Hormonal Modulation of Plant Immunity / C.M.J. Pieterse, D. Van der Does, C. Zamioudis, A. Leon-Reyes, S.C.M. Van Wees // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. – 2012. – Vol. 28. – P. 28.1–28.33.
303. Pirhonen, M. A small diffusible signal molecule is responsible for the global control of virulence and exoenzyme production in the plant pathogen *Erwinia carotovora* / M. Pirhonen, D. Flego, R. Heikinheimo, E. T. Pavla // The EMBO Journal. – 1993. – Vol. 12. – N.6. – P. 2467–2476.
304. Pöllumaa, L. Quorum Sensing and Expression of Virulence in *Pectobacteria* / L. Pöllumaa, T. Alamäe, A. Mäe // Sensors. – 2012. – Vol. 12. – P. 3327–3349.
305. Po-Wen, C. Priming of the Arabidopsis pattern-triggered immunity response upon infection by necrotrophic *Pectobacterium carotovorum* bacteria / C. Po-Wen, P. Singh, L. Zimmerli // Mol Plant Pathol. – 2013. – Vol. 14. – N.1. – P. 58–70.
306. Rahman, I. Methionine uptake and cytopathogenicity of viable but nonculturable *Shigella dysenteriae* type 1 / I. Rahman, M. Shahamat, P.A. Kirchman, E. Russek-Cohen, R.R. Colwell // Applied and Environmental Microbiology. – 1994. – Vol. 60. – N.10. – P. 3573–3578.
307. Raivio, T.L. Envelope stress responses and Gram-negative bacterial pathogenesis / T.L. Raivio // Mol Microbiol. – 2005. – Vol. 56. – N.5. – P. 1119–28.
308. Ralet, M.C. Monoclonal antibodies to rhamnogalacturonan I backbone / M.C. Ralet, O. Tranquet, D. Poulain, A. Moïse, F. Guillon // Planta. – 2010. – Vol. 231. – N.6. – P. 1373–83.
309. Rantakari, A. Type III Secretion Contributes to the Pathogenesis of the Soft-Rot Pathogen *Erwinia carotovora*: Partial Characterization of the *hrp* Gene Cluster / A. Rantakari, O. Virtaharju, S. Vähämiko, S. Taira, E.T. Palva, H.T. Saarilahti, M. Romantschuk // MPMI. – 2001. – Vol. 14. – N.8. – P. 962–968.

310. Rate, D.N. The *Arabidopsis aberrant* growth and *death2* mutant shows resistance to *Pseudomonas syringae* and reveals a role for NPR1 in suppressing hypersensitive cell death / D.N. Rate, J.T. Greenberg // The Plant Journal. – 2001. – Vol. 27. – N.3. – P. 203–211.
311. Reeve, C.A. Role of Protein Degradation in the Survival of Carbon-Starved *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* / C.A. Reeve, A.T. Bockman, A. Matin // Journal of Bacteriology. – 1984. – Vol. 157. – N.3. – P. 758–763.
312. Reinbothe, C. Plant oxylipins: role of jasmonic acid during programmed cell death, defence and leaf senescence / C. Reinbothe, A. Springer, I. Samol, S. Reinbothe // FEBS Journal. – 2009. – Vol. 276. – P. 4666–4681.
313. Reynolds, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy / E.S. Reynolds // J Cell Biol. – 1963. – Vol. 17. – P. 208–212.
314. Rinaudi, L.V. An integrated view of biofilm formation in rhizobia / L.V. Rinaudi, W. Giordano // FEMS Microbiol Lett. – 2010. – Vol. 304. – N.1. – P. 1–11.
315. Rioux, D. Immunocytochemical evidence that secretion of pectin occurs during gel (gum) and tylosis formation in trees / D. Rioux, M. Nicole, M. Simard, G.B. Ouellette // Phytopathology. – 1998. – Vol. 88. – P. 494–505.
316. Robert-Seilaniantz, A. Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism / A. Robert-Seilaniantz, M. Grant, J.D. Jones // Annu Rev Phytopathol. – 2011. – Vol. 49. – P. 317–43.
317. Robert-Seilaniantz, A. Pathological hormone imbalances / A. Robert-Seilaniantz, L. Navarro, R. Bari, J.D.G Jones // Current Opinion in Plant Biology. – 2007. – Vol. 10. – P. 372–379.
318. Robinettet, D. Inhibition by *Agrobacterium tumefaciens* and *Pseudomonas savastanoi* of Development of the Hypersensitive Response Elicited by *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* / D. Robinettet, A.G.

- Matthysse // *Journal of Bacteriology*. – 1990. – Vol. 172. – N.10. – P. 5742–5749.
319. Rossier, O. The *Xanthomonas* Hrp type III system secretes proteins from plant and mammalian bacterial pathogens / O. Rossier, K. Wengelnik, K. Hahn, U. Bonas // *PNAS*. – 1999. – Vol. 96. – P. 9368–9373.
320. Sakakibara, H. Cytokinins: Activity, Biosynthesis, and Translocation / H. Sakakibara // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2006. – Vol. 57. – P. 431–49.
321. Salmond, G.P.C. Secretion of extracellular virulence factors by plant-pathogenic bacteria / G.P.C. Salmond // *Annual Review of Phytopathology*. – 1994. – Vol. 32. – P. 181–200.
322. Sambrook, J. *Molecular cloning: a Laboratory Manual* / J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis. – 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Press, 1989. – 1659 p.
323. Santander, R.D. In planta recovery of *Erwinia amylovora* viable but nonculturable cells / R.D. Santander, J.F. Catala` -Senent, E. Marco-Noales, E.G. Biosca // *Trees*. – 2012. – Vol. 26. – N.1. – P. 75–82.
324. Schechter, L.M. *Pseudomonas syringae* Type III Secretion System Targeting Signals and Novel Effectors Studied with a Cya Translocation Reporter / L.M. Schechter, K.A. Roberts, Y. Jamir, J.R. Alfano, A. Collmer // *Journal of Bacteriology*. – 2004. – Vol. 186. – N.2. – P. 543–555.
325. Schenk, P.M. Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis / P.M. Schenk, K. Kazan, I. Wilson, J.P. Anderson, T. Richmond, S.C. Somerville, J.M. Manners, A.J Soitamo, B. Jada, K. Lehto // *PNAS*. – 2000. – Vol. 97. – P. 11655–11660.
326. Sequeira, L. Agglutination of avirulent strains of *Pseudomonas solanacearum* by potato lectin / L. Sequeira, T.L. Graham // *Physiological Plant Pathology*. – 1977. – Vol. 11. – P. 43–54.
327. Sequeira, L. Interaction of bacteria and host cell walls: its relation to mechanisms of induced resistance / L. Sequeira, G. Gaard, G.A. de Zoeten // *Physiological Plant Pathology*. – 1977. – Vol. 10. – P. 43–50.

328. Setlow, P. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals / P. Setlow // Journal of Applied Microbiology. – 2006. – Vol. 101. – P. 514–525.
329. Seufferheld, M.J. Role of Polyphosphates in Microbial Adaptation to Extreme Environments / M.J. Seufferheld, H.M. Alvarez, M.E. Farias // Appl Environ Microbiol. – 2008. – Vol. 74. – N.19. – P. 5867–5874.
330. Shah, J. A recessive mutation in the *Arabidopsis* *SSI2* gene confers SA- and *NPR1*-independent expression of *PR* genes and resistance against bacterial and oomycete pathogens / J. Shah, P. Kachroo, A. Nandi, D.F. Klessig // The Plant Journal. – 2001. – Vol. 25. – N.5. – P. 563–574.
331. Shah, D. Persisters: a distinct physiological state of *E. coli* / D. Shah, Z. Zhang, A.B Khodursky, N. Kaldalu, K. Kurg, K. Lewis // BMC Microbiology. – 2006. – Vol. 6. – N.53. – P. 1–9.
332. Shleeve, M.O. Formation and resuscitation of 'non-culturable' cells of *Rhodococcus rhodochrous* and *Mycobacterium tuberculosis* in prolonged stationary phase / M.O. Shleeve, K. Bagramyan, M.V. Telkov, G.V. Mukamolova, M. Young, D. B. Kell, A.S. Kaprelyants // Microbiology. – 2002. – Vol. 148. – P. 1581–1591.
333. Shleeve, M. Formation of 'non-culturable' cells of *Mycobacterium smegmatis* in stationary phase in response to growth under suboptimal conditions and their Rpf-mediated resuscitation / M. Shleeve, G.V. Mukamolova, M. Young, H.D. Williams, A.S. Kaprelyants // Microbiology. – 2004. – Vol. 150. – P. 1687–1697.
334. Shoji, T. Jasmonate-Induced Nicotine Formation in Tobacco is Mediated by Tobacco *COI1* and *JAZ* Genes / T. Shoji, T. Ogawa, T. Hashimoto // Plant Cell Physiol. – 2008. – Vol. 49. – N.7. – P. 1003–1012.
335. Siemens, J. Transcriptome Analysis of *Arabidopsis* Clubroots Indicate a Key Role for Cytokinins in Disease Development / J. Siemens, I. Keller, J. Sarx, S. Kunz, A. Schuller, W. Nage, T. Schmülling, M. Parniske, J. Ludwig-Müller // MPMI. – 2006. – Vol. 19. – N.5. – P. 480–494.

336. Signoretto, C. Modification of the peptidoglycan of *Escherichia coli* in the viable but nonculturable state / C. Signoretto, M. Lleò, P. Canepari // *Curr Microbiol.* – 2002. – Vol. 44. – N.2. – P. 125–31.
337. Sing, V.O. Bacteria-plant cell surface interactions: active immobilization of saprophytic bacteria in plant leaves *Science* / V.O. Sing, M.N. Schroth // *Science.* – 1977. – Vol. 197. – N.4305. – P. 759–61.
338. Singh, R. Role of persisters and small-colony variants in antibiotic resistance of planktonic and biofilm-associated *Staphylococcus aureus*: an *in vitro* study / R. Singh, P. Ray, A. Das, M. Sharma // *Journal of Medical Microbiology.* – 2009. – Vol. 58. – P. 1067–1073.
339. Skerker, J.M. Direct observation of extension and retraction of type IV pili / J.M. Skerker, H.C. Berg // *PNAS.* – 2001. – Vol. 98. – N.12. – P. 6901–6904.
340. Slawiak, M. Genes responsible for coronatine synthesis in *Pseudomonas syringae* present in the genome of soft rot bacteria / M. Slawiak, E. Lojkowska // *Eur J Plant Pathol.* – 2009. – Vol. 124. – P. 353–361.
341. Soina, V.S. The Structure of Resting Bacterial Populations in Soil and Subsoil Permafrost / V.S. Soina, A. L. Mulyukin, E.V. Demkina, E.A. Vorobyova, G.I. El-Registan // *Astrobiology.* – 2004. – Vol. 4. – N.3. – P. 345–358.
342. Soitamo, A.J. Expression of geminiviral AC2 RNA silencing suppressor changes sugar and jasmonate responsive gene expression in transgenic tobacco plants / A.J Soitamo, B. Jada, K. Lehto // *BMC Plant Biology.* – 2012. – Vol. 12. – N.204. – P. 1–18.
343. Spoel, S.H. Making Sense of Hormone Crosstalk using Plant Immune Responses / S.H. Spoel, X. Dong // *Cell Host & Microbe.* – 2008. – Vol. 3. – P. 348–351.
344. Spoel, S.H. Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles / S.H. Spoel, J.S. Johnson, X. Dong // *PNAS.* – 2007. – Vol. 104. – N.47. – P. 18842–18847.

345. Spoel, S.H. NPR1 Modulates Cross-Talk between Salicylate- and Jasmonate-Dependent Defense Pathways through a Novel Function in the Cytosol / S.H. Spoel, A. Koornneef, S.M.C. Claessens, J.P. Korzelius, J.A. Van Pelt, M.J. Mueller, A.J. Buchala, J.-P. Métraux, R. Brown, K. Kazan, L.C. Van Loon, X. Dong, C.M.J. Pieterse // *The Plant Cell*. – 2003. – Vol. 15. – P. 760–770.
346. Stanley, N.R. Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation / N.R. Stanley, B.A. Lazazzera // *Mol Microbiol*. – 2004. – Vol. 52. – N.4. – P. 917–24.
347. Staswick, P.E. Characterization of an Arabidopsis Enzyme Family That Conjugates Amino Acids to Indole-3-Acetic Acid / P.E. Staswick, B. Serban, M. Rowe, I. Tiryaki, M.T. Maldonado, M.C. Maldonado, W. Suza // *The Plant Cell*. – 2005. – Vol. 17. – P. 616–627.
348. Steinert, M. Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii* / M. Steinert, L. Emödy, R. Amann, J. Hacker // *Appl Environ Microbiol*. – 1997. – Vol. 63. – N.5. – P. 2047–53.
349. Stoodley, L.H. Evolving concepts in biofilm infections / L.H.-Stoodley, P. Stoodley // *Cellular Microbiology*. – 2009. – Vol. 11. – Issue 7. – P. 1034–1043.
350. Stoodley, P. Relationship between mass transfer coefficient and liquid flow velocity in heterogenous biofilms using microelectrodes and confocal microscopy / P. Stoodley, S. Yang, H. Lappin-Scott, Z. Lewandowski // *Biotechnol Bioeng*. – 1997. – Vol. 56. – N.6. – P. 681–8.
351. Stoodley, P. Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure / P. Stoodley, I. Dodds, J.D. Boyle, H.M. Lappin-Scott // *J Appl Microbiol*. – 1998. – Vol. 85. – P. 19s-28s.
352. Strang, J.A. Induction of *Bacillus brevis* L-forms / J.A. Strang, E.J. Allan B. Seddon, A.M. Paton // *J. App. Bacteriol*. – 1991. – Vol. 70. – P. 47–51.

353. Strovas, T.J. Cell-to-cell heterogeneity in growth rate and gene expression in *Methylobacterium extorquens* AM1 / T.J. Strovas, L.M. Sauter, X. Guo, M.E. Lidstrom // J Bacteriol. – 2007. – Vol. 189. – N.19. – P. 7127–33.
354. Su, X. Exploring the potential environmental functions of viable but non-culturable bacteria / X. Su, X. Chen, J. Hu, C. Shen, L. Ding // World J Microbiol Biotechnol. – 2013. – Vol 29. – P. 2213–2218.
355. Sudesh, K. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters / K. Sudesh, H. Abe, Y. Doi // Prog. Polym. Sci. – 2000. – Vol. 25. – P. 1503–1555.
356. Sun, F. Characterization and virulence retention of viable but nonculturable *Vibrio harvey* / F. Sun, J. Chen, L. Zhong, X.H. Zhang, R. Wang, Q. Guo, Y. Dong // FEMS Microbiology Ecology. – 2008. – Vol. 64. – N.1. – P. 37–44.
357. Sutherland, I.W. The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment / I.W. Sutherland // Trends in Microbiology. – 2001. – Vol. 9. – N.5. – P. 222–227.
358. Swanson, J.K. Behavior of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 during latent and active infection of geranium / J.K. Swanson, J. Yao, J. Tans-Kersten, C. Allen // Phytopathology. – 2005. – Vol. 95. – P. 136–143.
359. Tanaka, N. *gid1*, a gibberellin-insensitive dwarf mutant, shows altered regulation of probenazole-inducible protein (PBZ1) in response to cold stress and pathogen attack / N. Tanaka, M. Matsuoka, H. Kitano, T. Asano, H. Kaku, S. Komatsu // Plant, Cell and Environment. – 2006. – Vol. 29. – P. 619–631.
360. Tandler, B. Improved uranyl acetate staining for electron microscopy / B. Tandler // J Electron Microsc Tech. – 1990. – Vol. 16. – N.1. – P. 81–2.
361. Tarasova, N. Potato signal molecules that activate pectate lyase synthesis in *Pectobacterium atrosepticum*SCRI1043 / N. Tarasova, V. Gorshkov, O. Petrova, Y. Gogolev // World J Microbiol Biotechnol. – World J Microbiol Biotechnol. – 2013. – V. 29. – N.7. – P. 1189 – 1196.

362. Terta, M. *Arabidopsis thaliana* Cells: A Model to Evaluate the Virulence of *Pectobacterium carotovorum* / M. Terta, M. Kettani-Halabi, K. Ibenyassine, D. Tran, P. Meimoun, R.A. M'hand, H. El-Maarouf-Bouteau, F. Val, M.M. Ennaji, F. Bouteau // MPMI. – 2010. – Vol. 23. – N.2. – P. 139–143.
363. Thaler, J.S. Interactions between abscisic-acid-mediated responses and plant resistance to pathogens and insects / J.S. Thaler, R.M. Bostock // Ecology. – 2004. – Vol. 85. – N.1. – P. 48–58.
364. Thatcher, L.F. *Fusarium oxysporum* hijacks COI1-mediated jasmonate signaling to promote disease development in *Arabidopsis* / L.F. Thatcher, J.M. Manners, K. Kazan // The Plant Journal. – 2009. – Vol. 58. – P. 927–939.
365. Thiery, J.P. Mise en evidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie electronique / J.P. Thiery // J Microsc. – 1967. – Vol. 6. – P. 987–1018.
366. Thomas, P. Soft rot inciting *Pectobacterium carotovorum* (syn. *Erwinia carotovora*) is unlikely to be transmitted as a latent pathogen in micropropagated banana / P. Thomas, C. Goplakrishnan, M. Krishnareddy // Plant Cell Tiss Organ Cult. – 2011. – Vol. 105. – P. 423–429.
367. Thomma, B.P.H.J. Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens / B.P.H.J. Thomma, K. Eggermont, I.A.M.A. Penninckx, B. Mauch-Mani, R. Vogelsang, B.P.A. Cammue, W.F. Broekaert // PNAS. – 1998. – Vol. 95. – P. 15107–15111.
368. Thomma, B.P.H.J. The complexity of disease signaling in *Arabidopsis* / B.P.H.J. Thomma, I.A.M.A. Penninckx, W.F. Broekaert, B.P.A. Cammue // Current Opinion in Immunology. – 2001. – Vol. 13. – P. 63–68.
369. Ton, J. β -amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose / J. Ton, B. Mauch-Mani // The Plant Journal. – 2004. – Vol. 38. – P. 119–130.

370. Torres, M.A. Pathogen-induced, NADPH oxidase–derived reactive oxygen intermediates suppress spread of cell death in *Arabidopsis thaliana* / M.A. Torres, J.D.G. Jones, J.L. Dangl // *Nature Genetics*. – 2005. – Vol. 37. – N.10. – P. 1130–1134.
371. Toth, I.K. Soft rot erwiniae: from genes to genomes / I.K. Toth, K.S. Bell, M.C. Holeva, P.R.J. Birch // *Molecular Plant Pathology*. – 2003. – Vol. 4. – N.1. – P. 17–30.
372. Toth, I.K. What Will a Genome Sequence Do for Fire Blight Research? *Pectobacterium atrosepticum* and Potato – A Case Study / I.K. Toth, P.R.J. Birch, H. Liu, L. Pritchard, S. Humphris, M. Ravensdale, L. Moleleki, C. Robert, P. Hedley, E.M. Gilroy // *Proc. XIth IW on Fire Blight* Eds.: K.B. Johnson and V.O. Stockwell *Acta Hort.* 793, ISHS. – 2008. – P.157–162.
373. Toth, I.K. *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe / I.K. Toth, J.M. van der Wolf, G. Saddler, E. Lojkowska, V. Helias, M. Pirhonen, L. Tsrer (Lahkim), J.G. Elphinston // *Plant Pathology*. – 2011. – Vol. 60. – P. 385–399.
374. Trevors, J.T. The Molecularly Crowded Cytoplasm of Bacterial Cells: Dividing Cells Contrasted with Viable but Non-culturable (VBNC) Bacterial Cells / J.T. Trevors, J.D. van Elsas, A.K. Bej // *Curr Issues Mol Biol*. – 2012. – Vol. 15. – N.1. – P. 1–6.
375. Truman, W. Type III effectors orchestrate a complex interplay between transcriptional networks to modify basal defence responses during pathogenesis and resistance / W. Truman, M. Torres de Zabala, M. Grant // *The Plant Journal*. – 2006. – Vol. 46. – P. 14–33.
376. Truman, W. *Arabidopsis* systemic immunity uses conserved defense signaling pathways and is mediated by jasmonates / W. Truman, M.H. Bennett, I. Kubigsteltig, C. Turnbull, M. Grant // *PNAS*. – 2007. – Vol. 104. – P. 1075–1080.
377. Vailleau, F. Characterization of the Interaction Between the Bacterial Wilt Pathogen *Ralstonia solanacearum* and the Model Legume Plant *Medicago*

- truncatula* / F. Vailleau, E. Sartorel, M.F. Jardinaud, F. Chardon, S. Genin, T. Huguet, L. Gentzbittel, M. Petitprez // MPMI. – 2006. – Vol. 20. – N.2. – P. 159–167.
378. van der Merwe, J.J. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* causing blackleg on potatoes in South Africa / J.J. van der Merwe, T.A. Coutinho, L. Korsten, J.E. van der Waals // Eur J Plant Pathol. – 2010. – Vol. 126. – P. 175–185.
379. van der Wolf, J.M. Bacterial pathogens of potato / J.M. van der Wolf, S.H. de Boer // In: Vreugdenhil D, ed. Potato Biology and Biotechnology: Advances and Perspectives. Oxford, UK: Elsevier. – 2007. – P. 595–617.
380. van Wees, S.C.M. Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana* / S.C.M. van Wees, E.A.M. de Swart, J.A. van Pelt, L.C. van Loon, C.M.J. Pieterse // PNAS. – 2000. – Vol. 97. – N.15. – P. 8711–8716.
381. VanderMolen, G.E. Vascular gelation: A general response phenomenon following infection / G.E. VanderMolen, C.H. Beckman, E. Rodehorst // Physiol. Plant Pathol. – 1977. – Vol. 11. – P. 95–100.
382. VanderMolen, G.E. Pathogen-induced vascular gels: Ethylene as a host intermediate / G.E. VanderMolen, J.M. Labavitch, L.L. Strand, J.E. DeVay // Physiol. Plant. – 1983. – Vol. 59. – P. 573–580.
383. VanderMolen, G.E. Fusarium-induced vascular gels from banana roots a partial chemical characterization / G.E. VanderMolen, J.M. Labavitch, J.E. DeVay // Ph. Plant. – 1986. – Vol. 66. – P. 298–302.
384. Vasse, J. Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum* / J. Vasse, P. Frey, A. Tricalet // MPMI. – 1995. – Vol. 8. – P. 241–251.
385. Vega, N.M. Signaling-mediated bacterial persister formation / N.M. Vega, K. RAllison, A. Skhalil, J.J. Collins // Nature Chemical Biology. – 2012. – Vol. 8. – P. 431–433.

386. Verhertbruggen, Y. An extended set of monoclonal antibodies to pectic homogalacturonan / Y. Verhertbruggen, S.E. Marcus, A. Haeger, J.J. Ordaz-Ortiz, J.P. Knox // *Carbohydr Res.* – 2009. – Vol. 344. – N.14. – P. 1858–62.
387. Vernooij, B. Salicylic Acid Is Not the Translocated Signal Responsible for Inducing Systemic Acquired Resistance but Is Required in Signal Transduction / B. Vernooij, L. Friedrich, A. Morse, R. Reist, R. Kolditz-Jawhar, E. Ward, S. Uknes, H. Kessmann, J. Ryals // *The Plant Cell.* – 1994. – Vol. 6. – P. 959–965.
388. Véronési, C. Lipoxygenase Gene Expression in the Tobacco-*Phytophthora parasitica nicotianae* Interaction / C. Véronési, M. Rickauer, J. Fournier, M.-L. Pouénat, M.-T. Esquerré-Tugayé // *Plant Physiol.* – 1996. – Vol. 112. – P. 997–1004.
389. Vidal, S. Salicylic acid and the plant pathogen *Erwinia carotovora* induce defense genes via antagonistic pathways / S. Vidal, I.P. de Leon, J.O. Denecke, E.T. Palva // *The Plant Journal.* – 1997. – Vol. 11. – N.1. – P. 115–123.
390. Vlot, A.C. Salicylic Acid, a Multifaceted Hormone to Combat Disease / A.C. Vlot, D'M.A. Dempsey, D.F. Klessig // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 2009. – Vol. 47. – P. 177–206.
391. von Bodman, S.B. Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria / S.B. von Bodman, W.D. Bauer, D. L. Coplin // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 2003. – Vol. 41. – P. 455–82.
392. von Rad, U. Response of *Arabidopsis thaliana* to *N*-hexanoyl-DL homoserinelactone, a bacterial quorum sensing molecule produced in the rhizosphere / U. von Rad, I. Klein, P. I. Dobrev, J. Kottova, E. Zazimalova, A. Fekete, A. Hartmann, P. Schmitt-Kopplin, J. Durner // *Planta.* – 2008. – Vol. 229. – P. 73–85.
393. Vora, G.J. Microarray-based detection of genetic heterogeneity, antimicrobial resistance, and the viable but nonculturable state in human

- pathogenic *Vibrio* spp. / G.J. Vora, C.E. Meador, M.M. Bird, C.A. Bopp, J.D. Andreadis, D.A. Stenger // PNAS. – 2005. – Vol. 102. – N.52. – P. 19109–14.
394. Wallis, F.M. Histopathology of tomato plants infected with *Pseudomonas solanacearum*, with emphasis on ultrastructure / F.M. Wallis, S.J. Truter // Plant Pathology. – 1978. – Vol. 13. – P. 307–317.
395. Walters, D.R. Plants and biotrophs: a pivotal role for cytokinins? / D.R. Walters, N. McRoberts // Trends Plant Sci. – 2006. – Vol. 11. – P. 581–586.
396. Wang, D. A Genomic Approach to Identify Regulatory Nodes in the Transcriptional Network of Systemic Acquired Resistance in Plants / D. Wang, N. Amornsiripanitch, X. Dong // PLoS Pathogens. – 2006. – Vol. 2. – N.11. – P. 1042–1050.
397. Wang, J. RelA-Dependent (*p*)*ppGpp* Production Controls Exoenzyme Synthesis in *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* / J. Wang, N. Gardio, T. Burr, G.P.C. Salmond, M. Welch // Journal of Bacteriology. – 2007. – Vol. 189. – N.21. – P. 7643–7652.
398. Ward, E.W. Absciscic Acid Suppression of Phenylalanine Ammonia Lyase Activity and mRNA, and Resistance of Soybeans to *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea* / E.W. Ward, D.M. Cahill, M.K. Bhattacharyya M.K. // Plant Physiol. – 1989. – Vol. 91. – N.1. – P. 23–7.
399. Warner, J.M. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of starved and viable but nonculturable *Vibrio vulnificus* cells / J.M. Warner, J.D. Oliver // Applied and Environmental Microbiology. – 1998. – Vol. 64. – P. 3025–3028.
400. Wasilewska, A. An update on abscisic acid signaling in plants and more / A. Wasilewska, F. Vlad, C. Sirichandra, Y. Redko, F. Jammes, C. Valon, N. Frei dit Frey, J. Leung // Mol. Plant. – 2008. – Vol. 1. – N.2. – P. 198–217.
401. Wasternack, C. Jasmonates: An Update on Biosynthesis, Signal Transduction and Action in Plant Stress Response, Growth and Development / C. Wasternack // Annals of Botany. – 2007. – Vol. 100. – P. 681–697.
402. Wasternack, C. The wound response in tomato – Role of jasmonic acid / C. Wasternack, I. Stenzel, B. Hause, G. Hause, C. Kutter, H. Maucher, J.

- Neumerkel, I. Feussner, O. Miersch // Journal of Plant Physiology. – 2006. – Vol. 163. – P. 297—306.
403. Waters, C.M. Quorum Sensing: Cell-to-Cell Communication in Bacteria / C.M.Waters, B.L. Bassler // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. – 2005. – Vol. 21. – P. 319–46.
404. Watson, A. Technology for microarray analysis of gene expression / A. Watson, A. Mazumder, M. Stewart, S. Balasubramanian // Curr. Opin. Biotechnol. – 1998. – Vol. 9. – P. 609–614.
405. Webb, L.E. Infection of potato tubers with soft rot bacteria / L.E. Webb, R.K. s. Wood // Ann. appl. Biol. – 1974. – Vol. 76. – P. 91–98.
406. Wei, Z-M. Expression of *Erwinia amylovora hip* Genes in Response to Environmental Stimuli / Z-M. Wei, B.J. Sneath, S.V. Beer // Journal of Bacteriology. – 1992. – Vol. 174. – N.6. – P. 1875–1882.
407. Weichert, D. Stress resistance and recovery potential of culturable and viable but nonculturable cells of *Vibrio vulnificus* / D. Weichert, S. Kjelleberg // Microbiology. – 1996. – Vol. 142. – P. 845–853.
408. Whitehead, N.A. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria / N.A. Whitehead, A.M.L. Barnard, H. Slater, N.J.L. Simpson, G.P.C. Salmond // FEMS Microbiology Reviews. – 2001. – Vol. 25. – P. 365–404.
409. Whitesides, M.D. Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the Viable but Nonculturable State / M.D. Whitesides, J.D. Oliver // Applied and Environmental Microbiology. –1997. – Vol. 63. – N.3. – P. 1002–1005.
410. Wildermuth, M.C. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence / M.C. Wildermuth, J. Dewdney, G. Wu, F.M. Ausubel // Nature. – 2001. – Vol. 414. – P. 562–571.
411. Windt, C.W. MRI of long-distance water transport: a comparison of the phloem and xylem flow characteristics and dynamics in poplar, castor bean, tomato and tobacco / C.W. Windt, F.J. Vergeldt, P.A. de Jager, H. Vanas // Plant, Cell and Environment. – 2006. – Vol. 29. – P. 1715–1729.

412. Wong, H.-C. Induction of viable but nonculturable state in *Vibrio parahaemolyticus* and its susceptibility to environmental stresses / H.-C. Wong, P. Wang // J Appl Microbiol. – 2004. – Vol. 96. – P. 359–366.
413. Wu, J. New Insights into Plant Responses to the Attack from Insect Herbivores / J. Wu, I.T. Baldwin // Annu. Rev. Genet. – 2010. – Vol. 44. – P. 1–24.
414. Xu, Y. Plant Defense Genes Are Synergistically Induced by Ethylene and Methyl Jasmonate / Y. Xu, P.-F.L. Chang, D. Liu, M. L. Narasimhan, K.G. Raghothama, P.M. Hasegawa, R.A. Bressan // The Plant Cell. – 1994. – Vol. 6. – P. 1077–1085.
415. Yamada, T. The role of auxin in plant disease development / T. Yamada // Annu. Rev. Phytopathol. – 1993. – Vol. 31. – P. 253–273.
416. Yang, C-H. *hrp* genes of *Erwinia chrysanthemi* 3937 are important virulence factors / C-H. Yang, M. Gavilanes-Ruiz, Y. Okinaka, R. Vedel, I. Berthuy, M. Boccara, J.W.-T. Chen, N.T. Perna, N.T. Keen // MPMI. – 2002. – Vol. 15. – N.5. – P. 472–480.
417. Yang, Y. Transcriptome Profiling Identified Multiple Jasmonate ZIM-Domain Proteins Involved in the Regulation of Alkaloid Biosynthesis in Tobacco BY-2 Cells / Y. Yang, J. Guo, P. Yan, Y. Li, K. Liu, P. Gao, H. Zhao, Y. Chen, Y. Wang, M.P. Timko, S. Han // Plant Mol Biol Rep. – 2014. DOI 10.1007/s11105-014-0740-2
418. Zeng, B. Formation and Resuscitation of Viable but Nonculturable *Salmonella typhi* / B. Zeng, G. Zhao, X. Cao, Z. Yang, C. Wang, L. Hou // BioMed Research International. – 2013. – P. 1–7.
419. Zheng, X.-y. Coronatine Promotes *Pseudomonas syringae* Virulence in Plants by Activating a Signaling Cascade that Inhibits Salicylic Acid Accumulation / X.-y. Zheng, N.W. Spivey, W. Zeng, P.-P. Liu, Z.Q. Fu, D.F. Klessig, S.Y. He, X. Dong // Cell Host & Microbe. – 2012. – Vol. 11. – P. 587–596.

Благодарности

Автор выражает благодарность научным руководителям д.б.н. Юрию Викторовичу Гоголеву и к.б.н. Владимиру Юрьевичу Горшкову за чуткость, понимание и всестороннюю поддержку; д.б.н. Вадиму Владимировичу Сальникову и к.б.н. Марине Вячеславовне Агеевой (лаборатория микроскопии) за помощь в освоении методов конфокальной и электронной микроскопии и за неоценимый вклад в работу, к.б.н. Полине Владимировне Микшиной (лаборатория механизмов роста растительных клеток) за терпение и обучение современным биохимическим методам, к.б.н. Ольге Евгеньевне Петровой за помощь в проведении микробиологических экспериментов и позитивное отношение к жизни, к.б.н. Надежде Борисовне Тарасовой за консультации и ценные научные советы при подготовке диссертационной работы, а также всем сотрудникам лаборатории молекулярной биологии за теплую атмосферу и приятную рабочую обстановку.