

Министерство образования и науки Российской Федерации

УДК
ГРНТИ
Инв. №

УТВЕРЖДЕНО:
Исполнитель: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук
От имени Руководителя организации _____/_____/_____ М.П.

НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКИЙ ОТЧЕТ

о выполнении 4 этапа Государственного контракта
№ 14.740.11.1190 от 14 июня 2011 г. и Дополнению от 15 марта 2012 г. № 1

Исполнитель: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук
Программа (мероприятие): Федеральная целевая программа «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг., в рамках реализации мероприятия № 1.3.2 Проведение научных исследований целевыми аспирантами.
Проект: Динамика микробных популяций при развитии бактериозов растений
Руководитель проекта: _____/Даминова Амина Галеевна (подпись)

Казань
2013 г.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ИСПОЛНИТЕЛЕЙ
по Государственному контракту 14.740.11.1190 от 14 июня 2011 на выполнение
поисковых научно-исследовательских работ для государственных нужд

Организация-Исполнитель: Учреждение Российской академии наук Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН

Руководитель темы:

без ученой степени, без
ученого звания

_____ Даминова А. Г.
подпись, дата

Исполнители темы:

без ученой степени, без
ученого звания

_____ Шлыкова Л. В.
подпись, дата

без ученой степени, без
ученого звания

_____ Сафина А. Ф.
подпись, дата

СОДЕРЖАНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ	4
2. ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ Молекулярно-генетические особенности клеток в различных по структуре популяциях. Обобщение и оценка результатов исследования	7
2.1. Оценка динамики экспрессии генов факторов вирулентности и их регуляторных компонентов у бактерий при развитии различных типов инфекции	7
2.2. Характеристика особенностей нуклеинового обмена микробных клеток, разнородных по морфофизиологическим свойствам популяций	17
2.3. Разработка рекомендаций по усовершенствованию подходов для диагностики бактериозов растений. Создание теоретической модели развития бактериозов растений	26
3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	46
4. СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ	48

1. ВВЕДЕНИЕ

В природных экосистемах, а также в искусственных агрофитоценозах рост и развитие растений находится под непосредственным влиянием микроорганизмов. Множество видов бактерий способно проникать внутрь растений и сосуществовать со своим хозяином в течение определенной части жизненного цикла. Растения, в свою очередь, обладают широким спектром средств для распознавания «чужеродных агентов» и защитных механизмов для их элиминации. Поэтому фитоассоциированным бактериям необходимо длительное время сосуществовать со своими хозяевами, оставаясь «незамеченными», что требует наличия физиологических программ контролирующей «поведение» бактерий. Альтернативные физиологические программы микроорганизмов приводят либо к активации их патогенного потенциала и прогрессирующему развитию заболевания растений, либо к «мирному» (мутуалистичному) сосуществованию в результате бессимптомной инфекции [6, 8]. Изменения, происходящие в бактериальных популяциях в процессе развития бактериозов, сказываются на свойствах микроорганизмов, а именно на их патогенности, агрессивности и резистентности. Эти свойства микроорганизмов регулируются на популяционном уровне при участии микробного сигналинга, и в частности, системой кворум сенсинга.

Растительный организм является многокомпонентной неоднородной средой для жизни бактерий. Широкое разнообразие тканей, различающихся по физико-химическим, трофическим и иммунореакционным свойствам, в ряде случаев приводит к тканевой специализации фитоассоциированных бактерий. Однако часто определенный вид бактерий способен выживать сразу в нескольких растительных тканях. Логично предположить, что различные субпопуляции микроорганизмов, обитающие в разных тканях хозяина, неоднородны по физиологическим критериям и, вероятно, представляют собой отдельные функциональные компоненты единой популяции.

Известно, что существует ряд клеточных морфотипов, отличающихся физиологически и функционально, которые могут спонтанно или индуцировано формироваться в бактериальных популяциях. К таким морфофизиологическим вариантам бактерий относятся жизнеспособные, но некультивируемые клетки [12,26], цистоподобные рефрактерные клетки [5,7], персистеры [14,17], а также клетки, формирующие сложноструктурированные микробные сообщества, такие как биопленки [21]. Эти формы бактерий активно изучаются в культурах *in vitro*, однако *in planta* охарактеризованы крайне слабо. Особую значимость представляет не просто выявление того или иного бактериального морфотипа в растении, но и определение где (в каком типе ткани), когда (на каком этапе взаимодействия) и для чего (функциональная роль) происходит их формирование. Выяснение этих вопросов на примере различных модельных систем микроорганизм/растение-хозяин – важная составляющая в изучении фундаментальных вопросов растительно-микробных взаимодействий.

Бактерии из рода *Erwinia* являются патогенами широкого круга хозяйственно ценных растений: от картофеля и томатов до древесных пород. Некоторые виды принадлежат к числу микроорганизмов, у которых определена первичная структура генома. Для многих из них изучены основные регуляторные цепи, контролирующие активность генов вирулентности, в том числе гены кластера *hrp* [1, 2, 4]. В то же время, в сравнении с другими фитопатогенами (из родов *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Ralstonia*) для *Erwinia* доступен минимум информации о молекулярных механизмах взаимодействия с растением-хозяином и остается много вопросов об особенностях экспрессии большинства генов и о функционировании регуляторных цепей, вовлеченных в процесс адаптации к различным условиям существования и разным экологическим нишам. Между тем, понимание того, каким образом *Erwinia* подавляют иммунитет растений, позволит разработать средства борьбы с этими патогенами.

Целью данного Проекта является реконструкция процесса формирования микробных популяций при развитии бактериозов растений для выявления ключевых критериев патогенности микроорганизмов, а также содействие развитию научно-образовательной и приборной базы для подготовки студентов, аспирантов и молодых ученых в области физико-химической, молекулярной и клеточной биологии, и повышению квалификации специалистов микробиологического, биохимического и молекулярно-биологического профиля. Для реализации цели данного Проекта необходимо выполнить четвертый этап исследований – молекулярно-генетические особенности клеток в различных по структуре популяциях. Обобщение и оценка результатов исследования. В рамках данного этапа были поставлены следующие задачи:

1. Оценка динамики экспрессии генов факторов вирулентности и их регуляторных компонентов у бактерий при развитии различных типов инфекции.

2. Характеристика особенностей нуклеинового обмена микробных клеток, разнородных по морфофизиологическим свойствам популяций.

3. Разработка рекомендаций по усовершенствованию подходов для диагностики бактериозов растений. Создание теоретической модели развития бактериозов растений.

2. ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Молекулярно-генетические особенности клеток в различных по структуре популяциях. Обобщение и оценка результатов исследования.

2.1. Оценка динамики экспрессии генов факторов вирулентности и их регуляторных компонентов у бактерий при развитии различных типов инфекции

Ключевыми факторами вирулентности *Erwinia carotovora* ssp. *atrosepticum* SCRI1043 являются секретируемые ферменты, разрушающие клеточную стенку растения-хозяина. К ним относятся пектатлиазы, пектинлиазы, целлюлазы, полигалактуроназы, пектинметилэстеразы. Их продукция контролируется как сенсорами факторов растительного происхождения, так и системой межклеточной коммуникации. Пектатлиазы не синтезируются у штаммов, мутантных по генам системы кворума [9]. В то же время транскрипция генов данных ферментов регулируется неспецифическими факторами растительного происхождения. В роли таких факторов выступают продукты расщепления клеточной стенки растения-хозяина, которые внутри бактериальной клетки метаболизируются с образованием 2-кето-3-дезоксиглюконата (КДГ) [16]. Последний связывается с репрессором транскрипции KdgR, что приводит к дерепрессии целевых генов. Таким образом, КДГ образуется в ходе инфекционного процесса независимо от вида растения.

На предыдущем этапе исследования нами обнаружено, что метаболиты растений влияют на особенности функционирования глобальной регуляторной системы *E. carotovora*. При этом метаболиты специфического хозяина обладали большим индуцирующим действием, чем неспецифического. Однако оставалось невыясненным, будет ли, обнаруженная нами различная степень активации системы кворума *E. carotovora* в присутствии метаболитов специфического и неспецифического растения-хозяина отражаться на уровне пектатлиазной активности этого фитопатогена. Для выяснения этого была определена пектатлиазная активность в супернатантах опытных культур.

В контрольном варианте, не содержащем растительных тканей, а также в образцах, растительных тканей, инкубированных в стерильных условиях, пектатлиазная активность не детектировалась. Добавление питательного субстрата к суспензии бактериальных клеток (среда LB или D5) не приводило к проявлению активности. В присутствии растительных тканей наблюдали высокий уровень пектатлиазной активности, причем ткани специфического растения-хозяина оказывали более значительный эффект: пектатлиазная активность была в 3 раза выше ($P=0,005$), чем в присутствии тканей неспецифического хозяина (рис. 1).

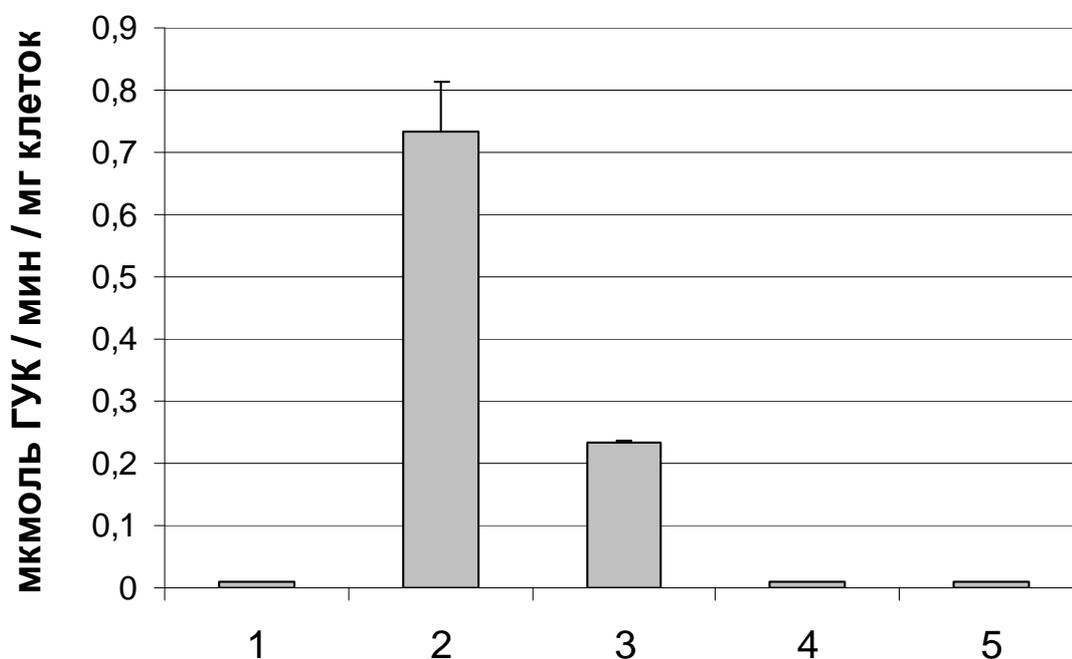


Рис. 1. Пектатлиазная активность в культуральной жидкости *E. carotovora* при культивировании микроорганизмов в течение двух суток на индукционной среде IM (1), на среде IM в присутствии тканей картофеля (2) и табака (3), на среде IM, обогащенной LB-бульоном (4) и на синтетической среде D5 (5). Представленные значения соответствуют средним из четырех независимых экспериментов. В качестве разброса указано стандартное отклонение средней. Достоверность различия между вариантами 2 и 3 составляет 0,005.

Полученные данные подтверждают, что активация системы кворума влияет на продукцию пектатлиаз [20]. Однако возможность различной степени активации пектолитических ферментов, в присутствии метаболитов специфического и неспецифического растения-хозяина ранее не была продемонстрирована. Высокий уровень пектатлиазной активности в присутствии тканей картофеля, по сравнению с тканями табака, возможно связан именно с большей степенью активации системы кворума. Известны факторы растительного происхождения, которые активируют продукцию пектатлиаз по независимой от системы кворума регуляторной цепи [11, 16,22]. Однако природа этих метаболитов не зависит от таксономической принадлежности растения-хозяина. В проведенных экспериментах уровень пектатлиазной активности *E. carotovora* различался в зависимости от вида растения, ткани которого использовались в опыте, и соответствовал степени активации системы межклеточной коммуникации.

Бактериальная система секреции третьего типа играет важную роль на ранних стадиях инфекционного процесса. Она служит для переноса бактериальных эффекторных белков непосредственно в клетку хозяина, что вызывает блокировку сигнальных систем макроорганизма, приводя к развитию инфекции. Ряд эффекторных белков может распознаваться хозяином и вызывать защитный ответ растения, который выражается в виде реакции гиперчувствительности. Для *E. carotovora* показано, что гены кластера *hrp*, кодирующего компоненты системы секреции третьего типа, не экспрессируются у мутантов по генам системы кворума, то есть, подвержены кворум-зависимой регуляции [15]. Поскольку система секреции третьего типа оказывает влияние на сигнальные системы растений, а ее активация зависит от сигнальных систем бактерий, она является наглядным примером интерференции сигнальных систем макро- и микроорганизма.

Для определения особенностей функционирования системы секреции третьего типа *Erwinia carotovora ssp. atrosepticum* SCRI1043 в присутствии тканей растений, мы определили относительный уровень экспрессии генов,

различных по функциям компонентов кластера *hrp*: *hrpA* – гена структурного белка аппарата секреции – пилина; *hrpL* – гена регуляторного белка, альтернативного σ -фактора, активирующего экспрессию генов кластера *hrp*; *dspE* – гена эффекторного белка, секретируемого через систему секреции третьего типа в клетку хозяина.

Относительный уровень экспрессии гена *hrpA* был выше в присутствии тканей как специфичного, так и неспецифичного растения-хозяина, чем в варианте без растительных тканей (рис. 2). Причем индукция экспрессии этого гена происходила лишь на начальных этапах культивирования бактериальных клеток в присутствии тканей растений; уровень экспрессии был выше через 6 часов, чем через 9. Добавление к культурам клеток *Erwinia carotovora* ssp. *atrosepticum* среды LB или их культивирование на среде D5 снижало уровень экспрессии данного гена. Репрессия генов системы секреции третьего типа на богатых питательных средах описана для ряда бактерий [27] и подтверждается нашими данными.

Экспрессия гена *hrpL* также индуцировалась метаболитами как специфичного, так и неспецифичного растения-хозяина (рис. 3). Следует отметить, что больший эффект при этом оказывал неспецифичный хозяин. Через 9 часов инкубирования в варианте с тканями картофеля уровень экспрессии гена *hrpL* не изменялся, а в варианте с тканями табака происходило его снижение, вследствие чего показатели выравнивались. Добавление питательного субстрата (сред LB или D5) вызывало негативный эффект на транскрипцию гена *hrpL*.

Таким образом, индукция экспрессии генов *hrpA* и *hrpL* системы секреции третьего типа у *Erwinia carotovora* происходит на начальных

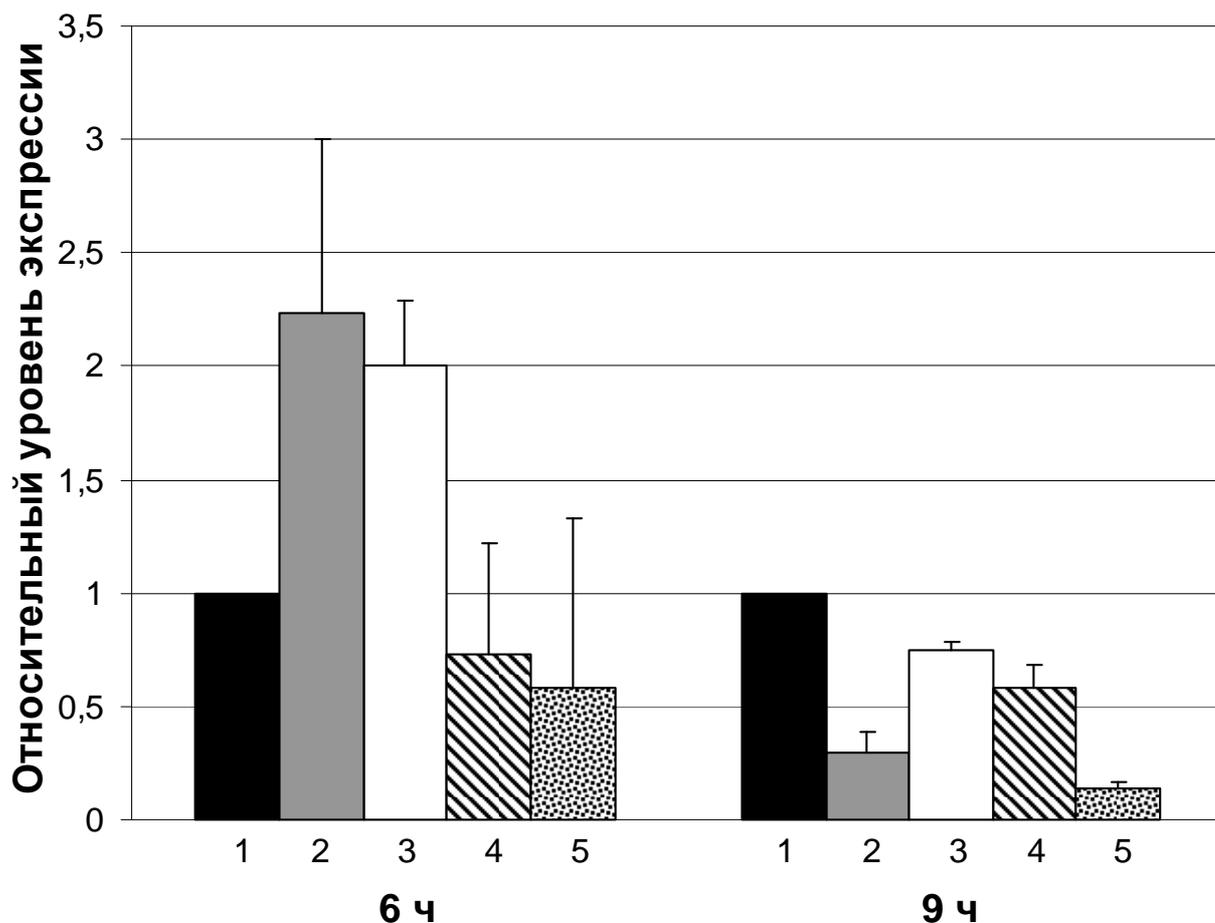


Рис. 2. Экспрессия гена *hrpA* *Erwinia carotovora* при культивировании микроорганизмов на индукционной среде ИМ (1), на среде ИМ в присутствии тканей картофеля (2) и табака (3), на среде ИМ, обогащенной LB-бульоном (4) и на синтетической среде D5 (5). Представленные значения соответствуют средним из четырех независимых экспериментов. В качестве разброса указано стандартное отклонение средней.

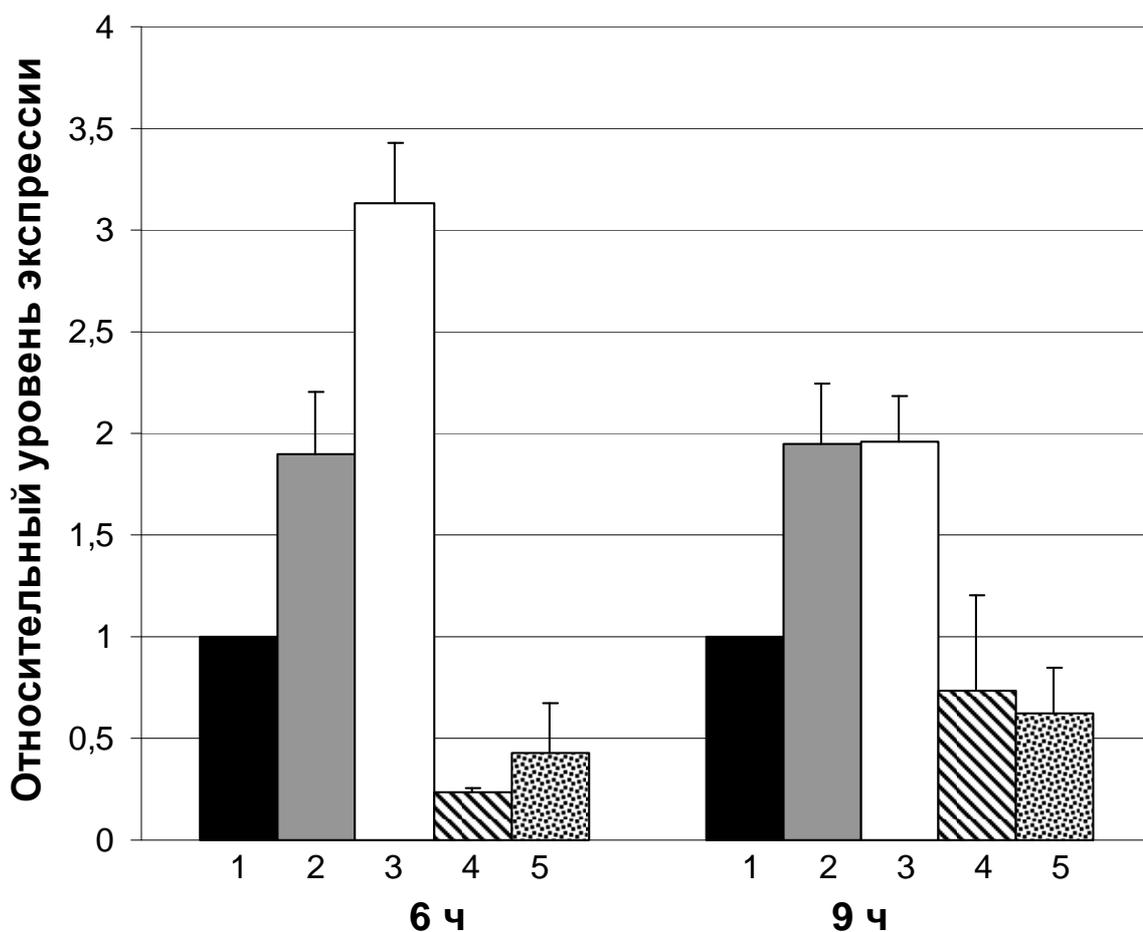


Рис. 3. Экспрессия гена *hrpL* *Erwinia carotovora* при культивировании микроорганизмов на индукционной среде ИМ (1), на среде ИМ в присутствии тканей картофеля (2) и табака (3), на среде ИМ, обогащенной LB-бульоном (4) и на синтетической среде D5 (5). Представленные значения соответствуют средним из четырех независимых экспериментов. В качестве разброса указано стандартное отклонение средней.

этапах взаимодействия с растительными тканями, что согласуется с данными литературы, и определяется не только комплексом физических факторов, но и индукторами растения-хозяина. Причем природа этих индукторов для структурного и регуляторного компонента системы секреции, по-видимому, аналогична у специфичного и неспецифичного растения-хозяина.

Экспрессия гена эффекторного компонента системы секреции третьего типа – белка DspE, активировалась на начальных этапах культивирования *E.*

carotovora в присутствии тканей неспецифического растения-хозяина. Через 9 часов инкубирования уровень экспрессии снижался (рис. 4). По-видимому, регуляция транскрипции генов различных по функциям компонентов системы секреции при неспецифических взаимодействиях осуществляется при помощи единого механизма, поскольку динамика экспрессии всех трех исследуемых генов была схожа. Добавление сред LB или D5 в культуры *E. carotovora* негативно сказывалось на экспрессии гена *dspE*.

Присутствие тканей специфического растения-хозяина в культурах *E. carotovora* SCRI1043 оказывало ингибирующее действие на экспрессию гена *dspE* (рис. 4). Через 6 часов инкубирования уровень экспрессии был ниже детектируемых значений. Таким образом, при наличии тканей специфического растения-хозяина происходила активация экспрессии генов структурного и регуляторного компонентов системы секреции (*hrpA*, *hrpL*), но репрессия гена эффекторного белка (*dspE*).

Согласно имеющимся в литературе сведениям, активация экспрессии различных генов системы секреции третьего типа происходит синхронно и регулируется альтернативным σ -фактором HrpL. Однако наши данные свидетельствуют о возможности дифференцированной регуляции экспрессии генов кластера *hrp* под влиянием метаболитов специфического растения-хозяина. По-видимому, контроль секреции эффекторных белков через систему секреции третьего типа при специфических взаимодействиях может осуществляться на транскрипционном уровне. Важно отметить, что при данных условиях (в присутствии тканей специфического хозяина) происходит индукция системы кворума. Несмотря на это, экспрессия кворум-зависимого гена *dspE* репрессируется (рис. 4). Это предполагает возможность регуляции его экспрессии за счет альтернативных систем под влиянием факторов специфического хозяина.

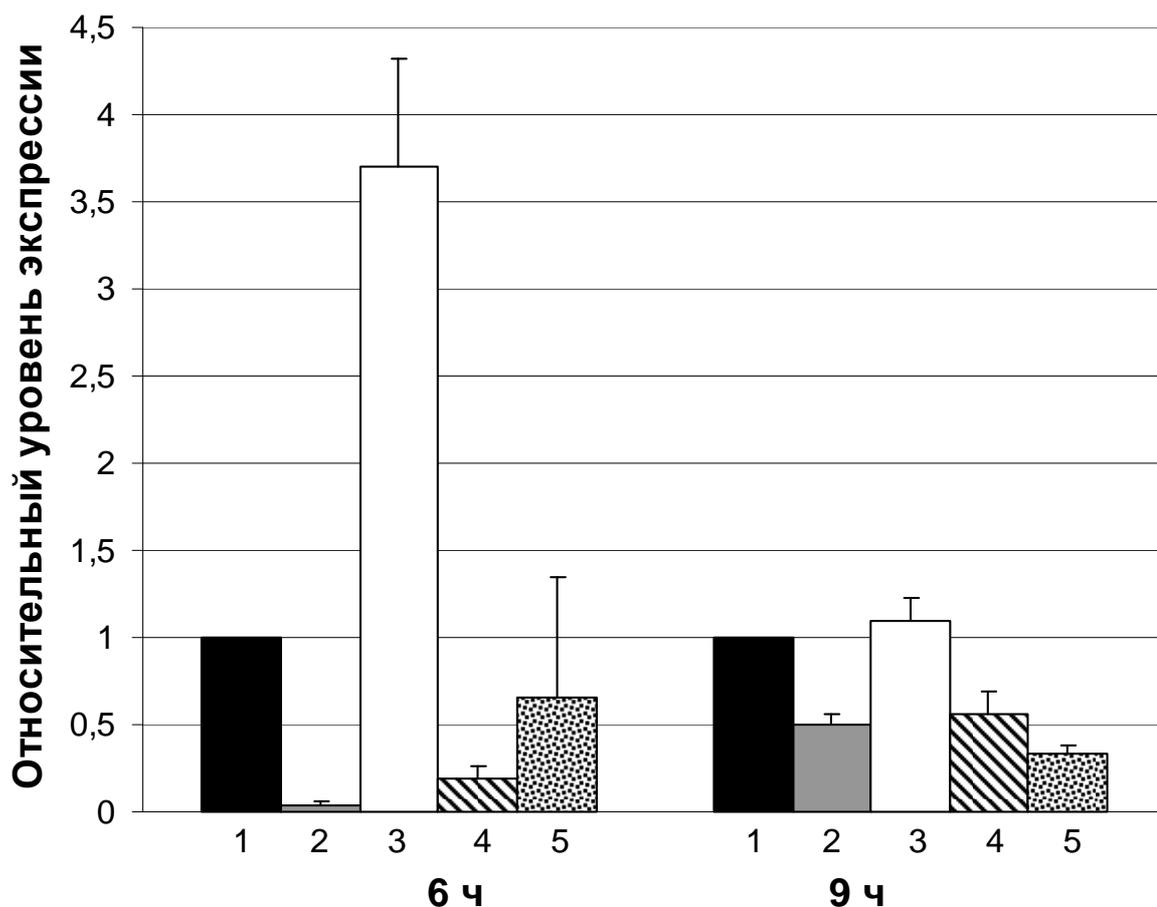


Рис. 4. Экспрессия гена *dspE* *E. carotovora* при культивировании микроорганизмов на индукционной среде ИМ (1), на среде ИМ в присутствии тканей картофеля (2) и табака (3), на среде ИМ, обогащенной LB-бульоном (4) и на синтетической среде D5 (5). Представленные значения соответствуют средним из четырех независимых экспериментов. В качестве разброса указано стандартное отклонение средней.

Механизм индукции системы секреции третьего типа *in vivo* остается на сегодняшний день не до конца расшифрованным. Существующие модельные системы не предполагают наличия универсального механизма ее активации у различных родов и даже видов патогенных бактерий. Для бактерий рода *Erwinia*, считается, что индукция экспрессии генов *hrp* осуществляется комплексом физических факторов, имитирующих среду апопласта, а также регулируется системой кворума. Для патогена плодовых

деревьев *Erwinia amylovora* продемонстрирована роль факторов специфичного растения-хозяина в репрессии всех исследованных генов кластера *hrp* [27], что согласуется с результатами проведенных нами экспериментов. Однако в нашей работе также показано, что экспрессия генов системы секреции третьего типа *E. carotovora* регулируется дифференцировано под влиянием индукторов/репрессоров специфичного растения-хозяина.

Необходимо также отметить, что экспрессия генов системы секреции третьего типа активируется при участии кворум-зависимой регуляции, то есть может индуцироваться только при высокой плотности популяции бактериальных клеток. Однако ключевую роль этот фактор вирулентности играет на ранних стадиях инфекции при низкой плотности популяции. Таким образом, возникает противоречие. Существование альтернативного механизма активации межклеточной коммуникации через растение-хозяина может способствовать частичной активации системы кворума именно на ранних стадиях инфекционного процесса, что позволяет бактериям использовать растительные ткани в качестве источника питательного субстрата. Активация фитоиммунитета под действием элиситоров при этом, вероятно, ингибируется системой секреции третьего типа, которая активируется на ранних стадиях инфекционного процесса и приводит к блокировке сигнальных систем растения-хозяина. Таким образом, по нашему предположению, частичная индукция системы кворума метаболитами хозяина на ранней стадии инфекционного процесса может привести к активации системы секреции третьего типа и умеренной продукции экстраклеточных ферментов, способствуя как получению питания микроорганизмами, так и блокировке сигнальных систем хозяина.

Важно отметить, что трансгенные растения картофеля, экспрессирующие ген АГЛ-синтазы, проявляли большую восприимчивость к *E. carotovora*, чем растения дикого типа [24]. Следовательно, преждевременное накопление АГЛ и активация продукции факторов

вирулентности не всегда приводит к угнетению бактерий *in planta*. С другой стороны, трансгенные растения табака, синтезирующие АГЛ, были более устойчивы к тому же патогену [18]. По-видимому, репрессорная функция системы кворума на продукцию факторов вирулентности при низкой плотности бактериальной популяции характерна не для всех типов взаимодействия; возможно, эта регуляторная система может выполнять и ряд других функций. Эти данные согласуются с нашими представлениями о функционировании системы межклеточной коммуникации в условиях специфического хозяина.

Недавние исследования по выявлению кворум-зависимых генов для штамма *E. carotovora* показали, что все компоненты системы секреции третьего типа, а также пектолитические ферменты находятся под контролем системы кворума [15]. Однако их синхронная активация (при достижении пороговой плотности популяции клеток) не согласуется с их основным функциям (продукция разных факторов вирулентности характерна для разных стадий инфекции), и противоречит представлениям об условиях успешного развития инфекционного процесса. Несмотря на глобальную зависимость продукции факторов вирулентности от системы кворума, эффект различной концентрации АГЛ и наличие альтернативных индукторов и репрессоров, возможно, определяют дифференцированный характер синтеза различных детерминант патогенности в тех или иных условиях. Так, в наших экспериментах, несмотря на существенную активацию системы кворума *E. carotovora* в присутствии тканей картофеля, наблюдалась практически полная репрессия гена эффекторного белка системы секреции третьего типа *dspE*.

При достижении достаточной плотности популяции, система кворума может дополнительно активироваться, приводя к сверхпродукции экстраклеточных ферментов, что характерно для острой стадии инфекции. Вероятно, что при этом также происходит репрессия системы секреции третьего типа, которая на поздних стадиях инфекционного процесса, как

принято считать, становится менее востребованной. Это предположение подтверждается полученными нами результатами по определению динамики экспрессии генов *hrp*.

2.2. Характеристика особенностей нуклеинового обмена микробных клеток, разнородных по морфофизиологическим свойствам популяций.

По имеющимся представлениям активация физиологической программы стрессового ответа бактерий регулируется на популяционном уровне и требует достаточно высокой плотности популяции [19]. Однако в естественных условиях бактериальные клетки испытывают стресс, в том числе вызванный голоданием, как при высокой, так и при низкой концентрации клеток. В связи с этим, мы оценили стратегию поведения клеток *E. carotovora* в условиях голодания по углероду и фосфору при различной исходной плотности популяции (от 10^3 до 10^9 КОЕ/мл).

Голодающие клетки получали по схеме, разработанной в нашей лаборатории (рис. 5). Клетки культуры, находящиеся на поздней логарифмической стадии роста, собирали центрифугированием при 11 000 g, дважды отмывали в безуглеродной среде АВ, содержащей (г/л): NH_4Cl , 1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0.62; KCl , 0.15; $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 0.013; $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0.005, pH 7.5 и суспендировали до 1×10^9 титра КОЕ. Полученные клетки инокулировали в среду АВ (не содержащую углерода и фосфора) до значений численности $1 \times 10^3 - 1 \times 10^8$ КОЕ/мл. Клеточные суспензии инкубировали в стеклянных

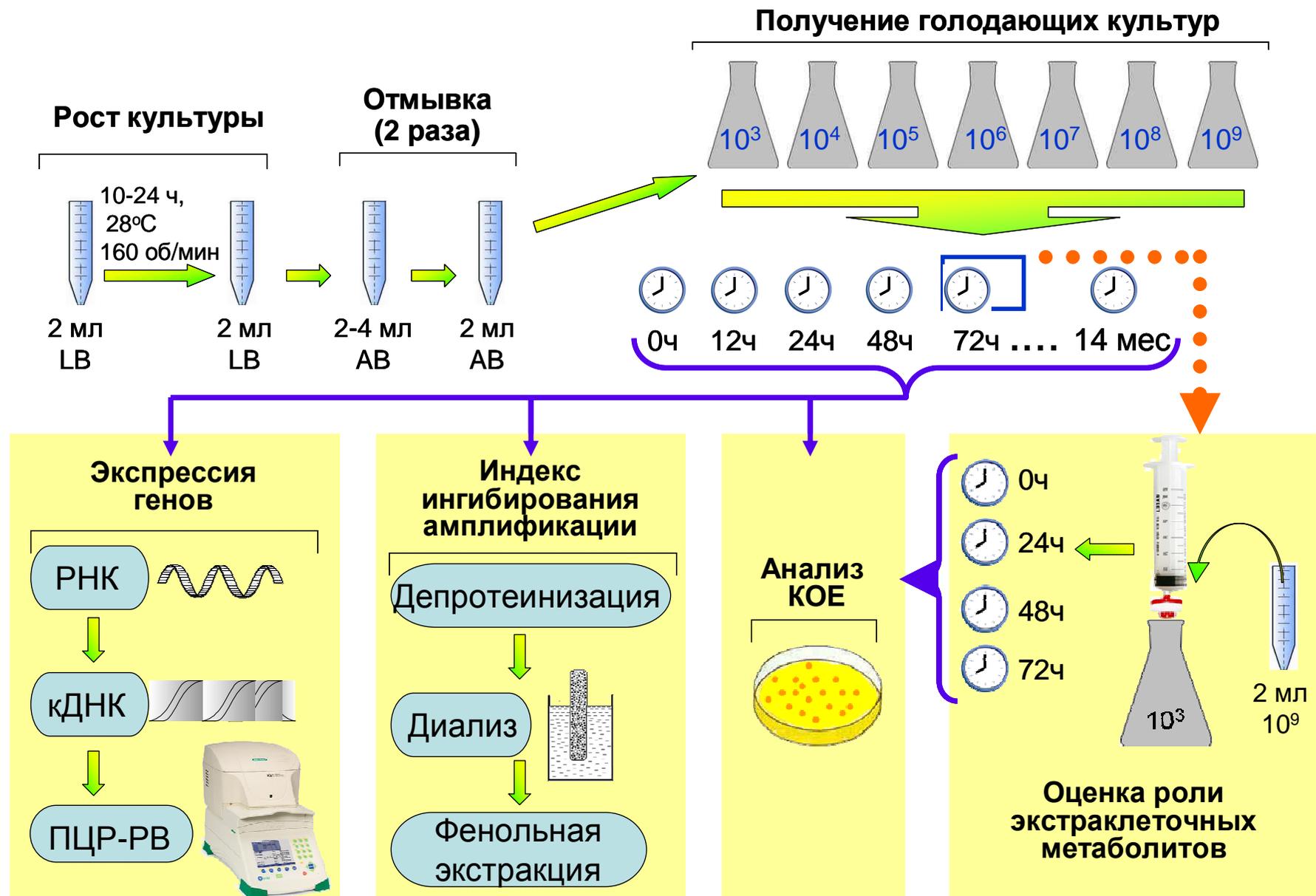


Рис. 5 – Схема опыта по оценке адапционных механизмов голодающих клеток *E. carotovora* при голодании.

флаконах при 28 °С и на разных этапах голодания отбирали аликвоты для определения КОЕ, экспрессии генов и оценки индекса ингибирования амплификации. Также получали кондиционированные среды от культур, инкубированных трое суток в условиях голодания. Эти среды инокулировали клетками от культур растущих на богатых средах для проверки на наличие в них факторов, влияющих на систему кворума (рис. 5).

Результаты опытов по определению динамики титра культивируемых клеток *E. carotovora* в среде АВ показали, что в условиях голодания по углероду и фосфору титр культур, инокулированных с начальной

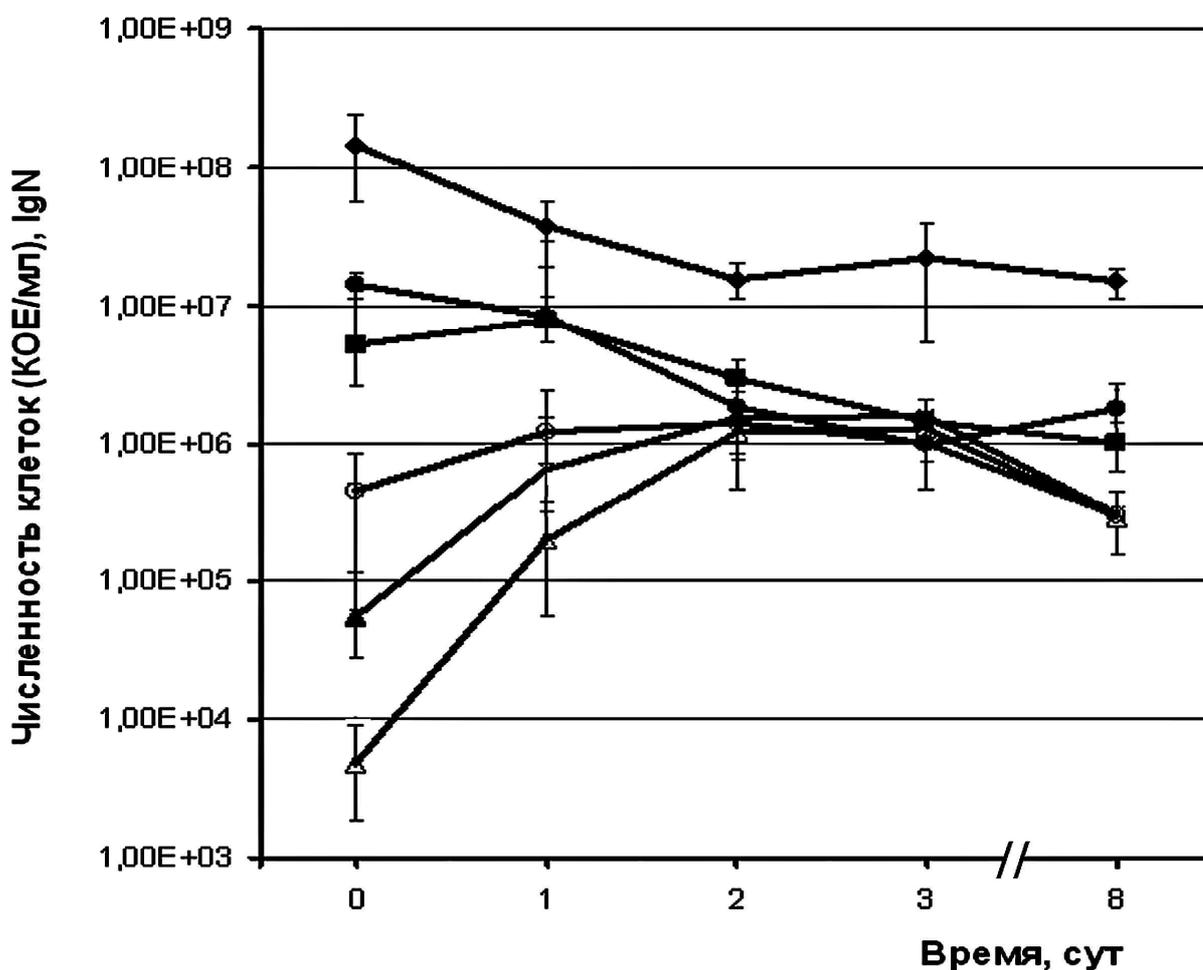


Рис. 6 – Динамика численности КОЕ/мл в культурах *E. carotovora*, инкубированных в минеральной безуглеродной среде АВ при различной плотности инокуляции: 5×10^8 (◆), 4×10^7 (●), 5×10^6 (■), 5×10^5 (○), 6×10^4 (▲), 6×10^3 (△) КОЕ/мл.

плотностью 10^3 – 10^5 КОЕ/мл, повышался до значений 5×10^5 – 1×10^6 КОЕ/мл в течение первых трех суток (рис. 6). При этом, чем ниже был исходный титр, тем значительнее было его увеличение в ходе культивирования. В культурах с начальным титром 10^6 – 10^7 КОЕ/мл концентрация культивируемых клеток оставалась практически неизменной. При более высокой начальной плотности популяции, 10^8 и 10^9 КОЕ/мл, происходило снижение титра КОЕ до значений 2×10^6 и 1×10^7 соответственно (рис. 6).

Параллельно с подсчетом титра КОЕ проводили анализ титра геномных копий голодающих культур различной начальной плотности на основе ПЦР в реальном времени (рис. 7). Динамика титра КОЕ культур голодающих при

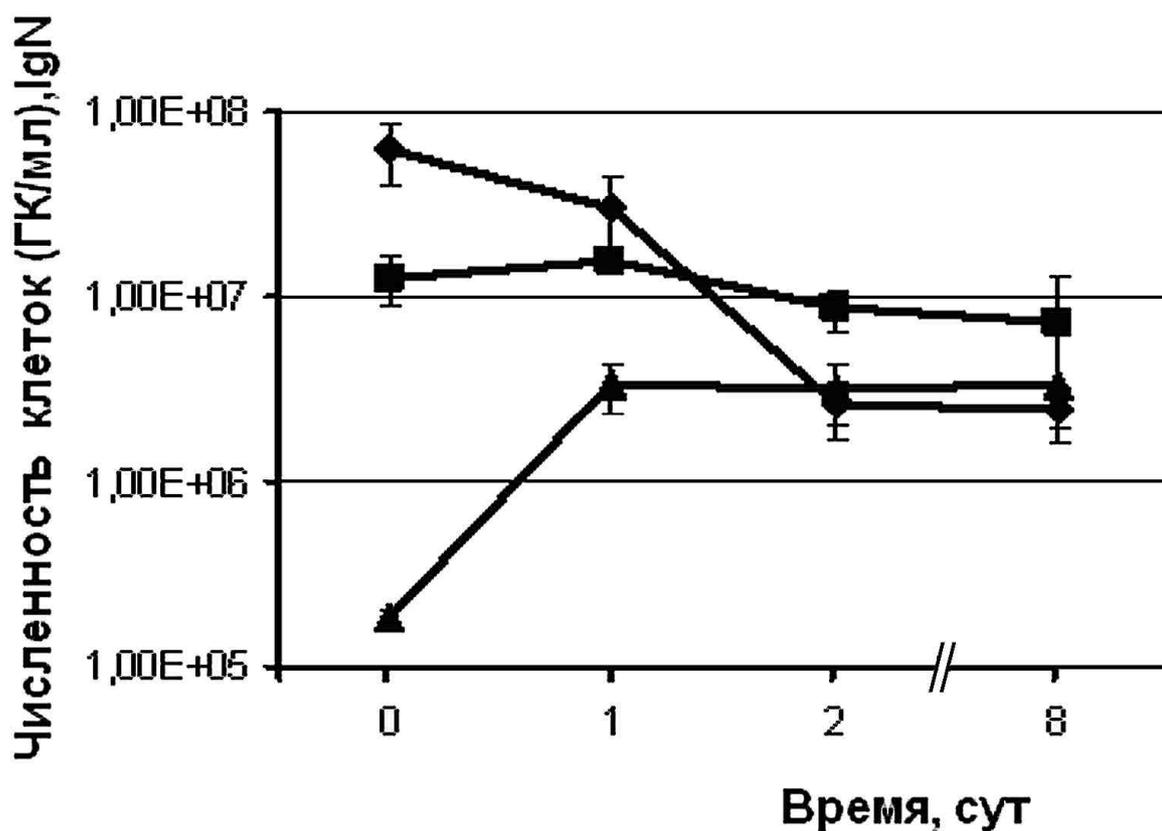


Рис. 7 – Динамика титра геномных копий в культурах *E. carotovora*, инкубированных в минеральной безуглеродной среде АВ при различной плотности инокуляции: 4×10^7 (◆), 5×10^6 (■), 6×10^4 (▲) КОЕ/мл.

начальной плотности 10^4 – 10^7 КОЕ/мл соответствовала динамике титра геномных копий, определяемых при помощи ПЦР РВ. Следовательно, увеличение численности клеток на безуглеродной среде сопряжено с процессами репликации ДНК (рис. 7).

В культурах высокой плотности инокуляции происходило уменьшение количества выявляемых геномных копий. При этом снижение показателей титра геномных копий опережало уменьшение титра КОЕ, т.е. титр пролиферативно активных клеток превышал титр клеток, детектируемых при помощи ПЦР-РВ (рис. 7). Мы предположили, что снижение уровня ПЦР-сигнала от целевой ДНК в лизатах клеток может быть связано с накоплением в культурах ингибитора(ов) ПЦР, либо с устойчивостью клеток к лизирующим агентам, используемым при выделении ДНК. И в том и другом случае проблема может заключаться в непригодности рутинных способов приготовления препаратов ДНК покоящихся клеток. Ранее было отмечено снижение эффективности амплификации в ПЦР некоторых участков ДНК у некультивируемых клеток *Vibrio vulnificus* [23, 25] и микоплазм (*Acholeplasma laidlawii*) [10]. Авторы связывали это с изменением матричных свойств надмолекулярных комплексов ДНК или с ее особой структурной организацией в покоящихся клетках, возникающей при компактизации нуклеоида. Также существуют сведения, что в бактериальных клеточных суспензиях накапливаются низкомолекулярные индукторы, проявляющие шаперонную активность в отношении некоторых белков и способные в значительной степени модифицировать структуру нуклеопротеинового комплекса бактерий [3]. Помимо этого известно, что у голодающих клеток бактерий происходит изменение спектра ДНК-связывающих гистоноподобных белков, которые делают определенные участки ДНК недоступными для полимераз [25].

Для выявления природы ингибитора(ов) ПЦР, накапливающегося в голодающих клетках, мы использовали последовательную многостадийную очистку ДНК в лизатах покоящихся клеток *E. carotovora* (рис. 8) После

каждой стадии очистки отбирали образцы для оценки количества выявляемых ДНК-мишеней. Одной из возможных причин снижения способности к амплификации ДНК покоящихся клеток, по нашему мнению, могло быть утолщение их клеточных оболочек, что затрудняло лизис и высвобождение нуклеиновых кислот. Поэтому клеточные суспензии продавливали через «фрэнч-пресс» (Cell Disrupter, Thermo, США) при давлении 500 атмосфер. Далее проводили лизис либо по стандартной методике – кипячение в 1% растворе Triton X-100 [13], либо с предварительной обработкой лизоцимом и инкубацией в 1% растворе SDS при 60 °С.

Далее клеточные лизаты, полученные последним способом, диализовали через мембраны с пропускной способностью до 10 кДа против деионизованной воды при 60 °С в течение 4 часов; обрабатывали РНКазой А (20 мкг/мл); протеиназой К (50 мкг/мл); проводили экстракцию органическими растворителями (фенолом, насыщенным 0.5М буфером Tris-HCl pH 8,0 и хлороформом). После этих процедур проводили повторный диализ и преципитацию этиловым спиртом (рис. 8).

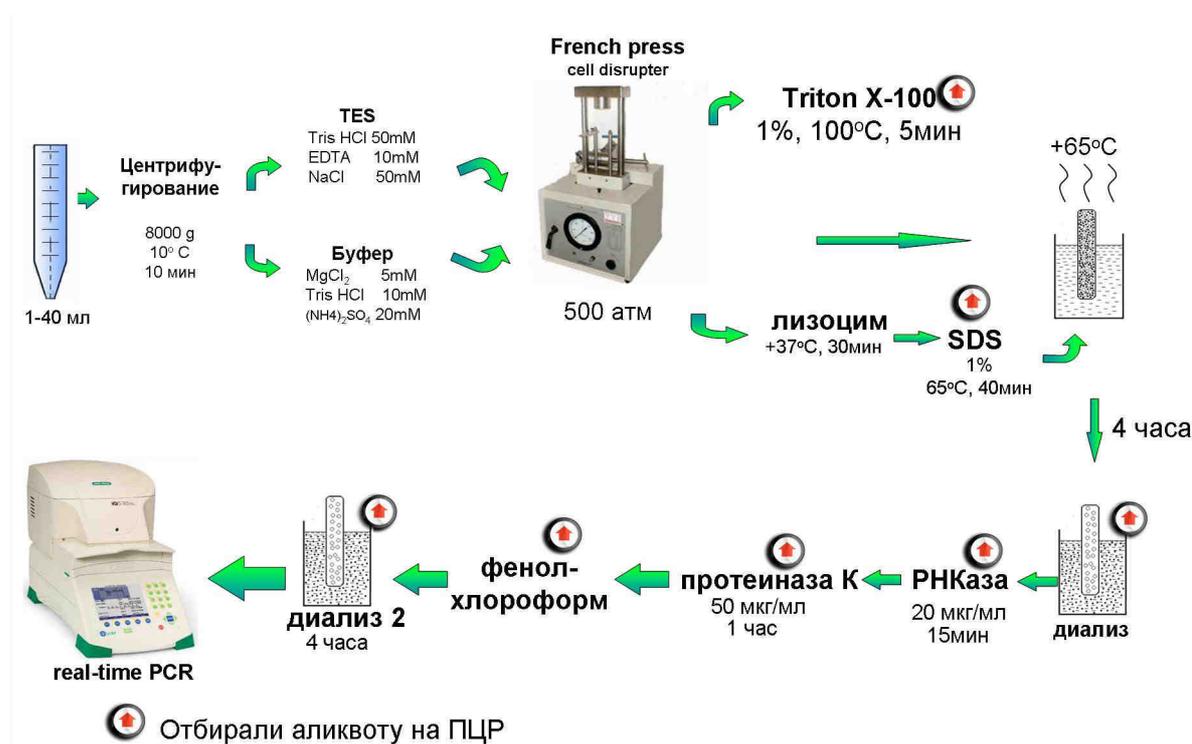


Рис. 8– Схема проведения опыта по очистке ДНК в лизатах клеток *E. carotovora* и подготовке образцов к ПЦР-РВ.

В связи с обнаруженными нами трудностями детекции целевой ДНК голодающих клеток *E. carotovora* был введен термин «индекс ингибирования амплификации». Данный параметр является информативным показателем свойств покоящихся клеток, в которых происходят значительные перестройки экспрессии генома. Индексом ингибирования амплификации ДНК является соотношение количества выявляемых копий ДНК в очищенных и неочищенных лизатах клеток. Для вегетативных клеток этот показатель равен единице, так как очистка лизатов вегетативных клеток не приводит увеличению числа выявляемых копий.

Индекс ингибирования амплификации в голодающих культурах клеток логарифмической фазы роста был выше аналогичного параметра клеток стационарной фазы (рис. 9). При этом соотношение между показателями геномных копий и титра КОЕ было выше в культурах, инокулированных стационарными клетками (рис. 9). Другими словами, в культурах *E. carotovora*, инокулированных клетками стационарной фазы роста, происходило динамичное образование покоящихся клеток, не выявляемых при помощи высевов на плотную питательную среду, но выявляемых при помощи ПЦР. В случае клеток логарифмической фазы, в качестве адаптивной стратегии использовалась модификация генетического аппарата клетки, которая выражается в сложности детектирования целевой ДНК при помощи ПЦР-РВ.

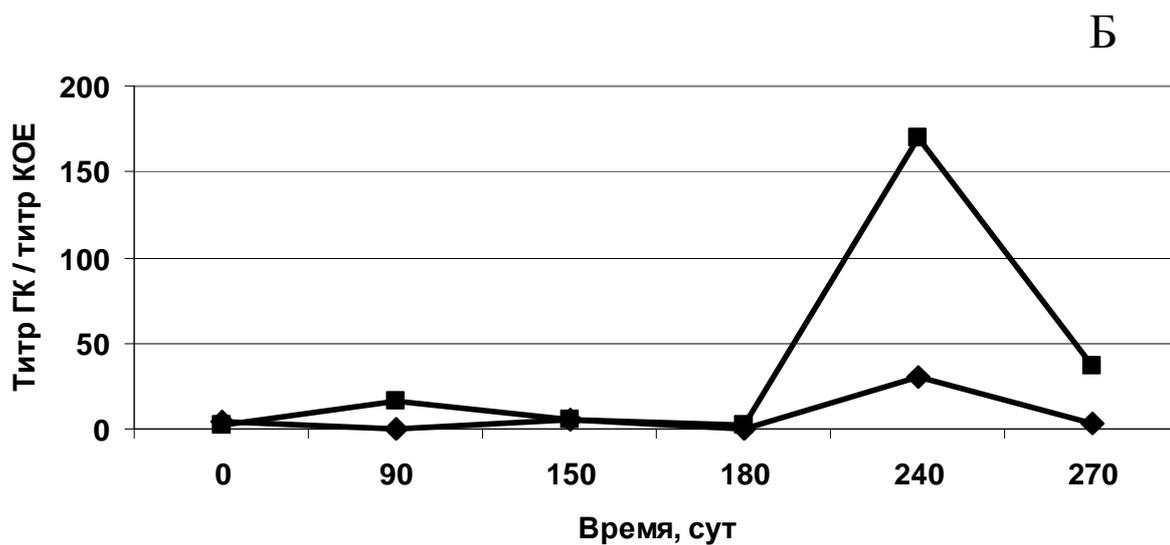
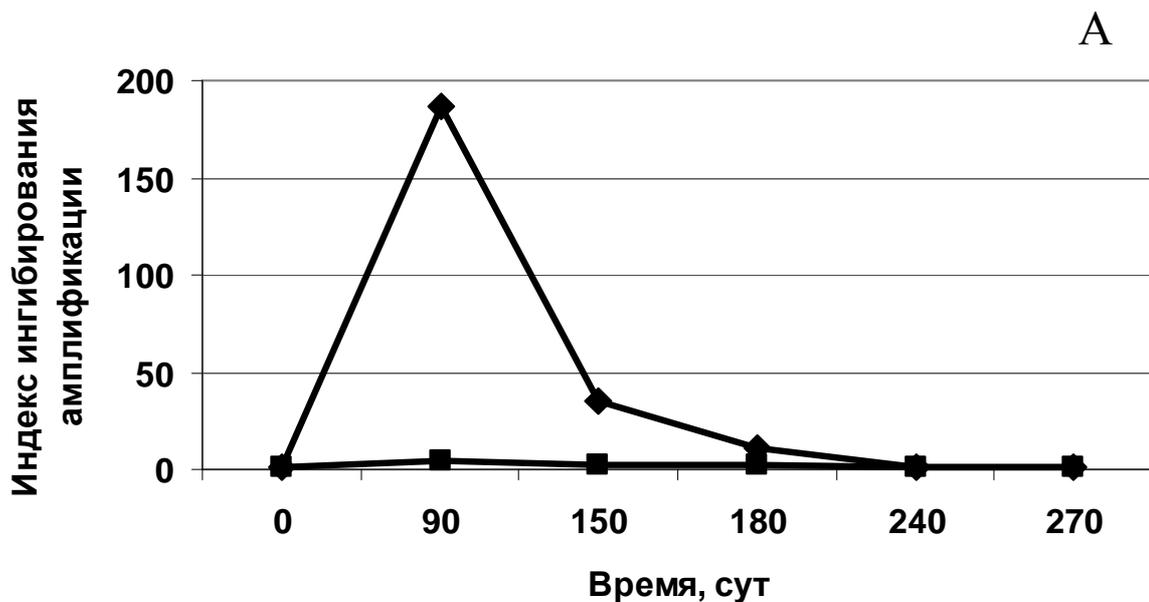


Рис. 9– Индекс ингибирования амплификации (А) и динамика образования покоящихся клеток (Б) в культурах *E. carotovora*, инокулированных клетками стационарной (◆) и логарифмической (■) стадии роста.

При инокулировании в безуглеродную среду бактерий низкого исходного титра наблюдали значительное снижение пролиферативной активности клеток уже на десятые сутки инкубирования. Об этом свидетельствует достаточно высокие показатели титра ГК по сравнению

титром КОЕ в этих культурах. При этом индекс ингибирования амплификации сохранялся на постоянном уровне в пределах единицы (рис. 10). Таким образом, для формирования адаптивного ответа на голодание в культурах клеток *E. carotovora* низкого и высокого исходного титра накапливаются не одинаковые метаболиты, имеющие различные функции, и ответственные за различные процессы. Это подтверждает наше предположение о различных стратегиях и способах переживания неблагоприятных условий популяциями бактерий низкой и высокой плотности.

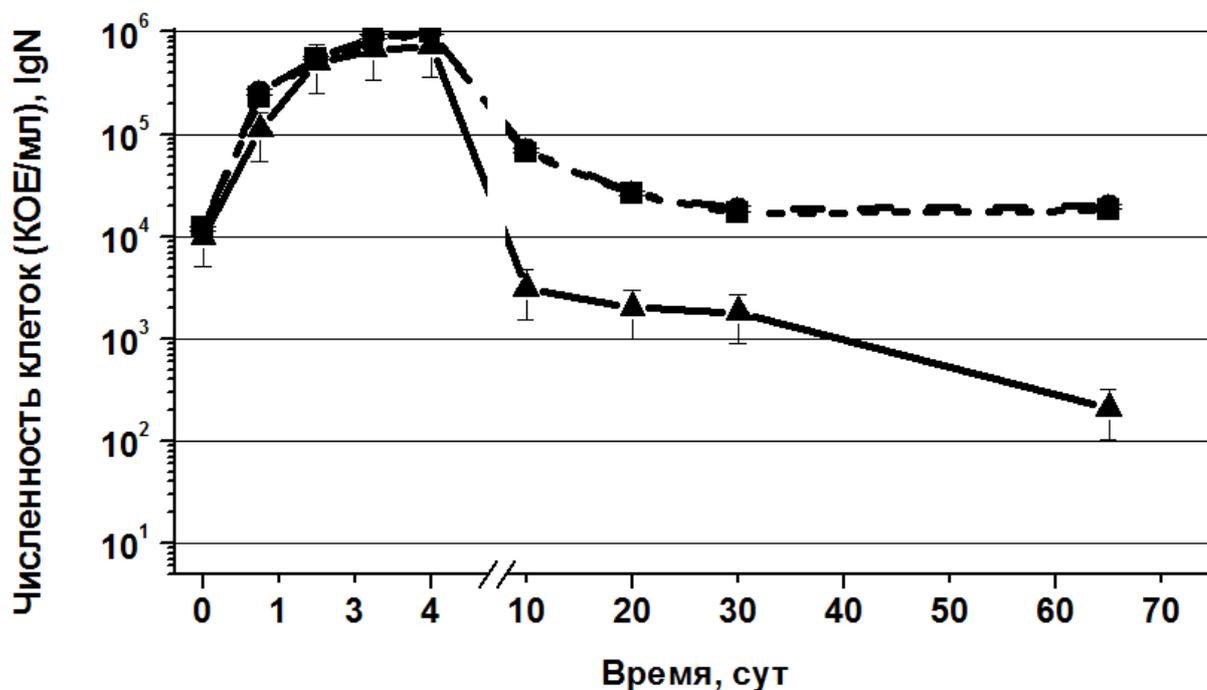


Рис. 10– Динамика титра КОЕ/мл (—▲—) и титра ГК/мл в очищенных (—■—) и в неочищенных лизатах (—●—) клеток голодающих культур *E. carotovora* низкого исходного титра.

Полученные данные позволяют заключить, что в голодающих клетках *E. carotovora* происходят изменения в способности к амплификации ДНК по сравнению с вегетативными клетками. Они обусловлены появлением новых белковых компонентов, а также низкомолекулярных соединений, удаляемых

при диализе и экстракции органическими растворителями. Это, по-видимому, приводит к изменению профиля экспрессии генов и способствует включению физиологической программы переживания условий, неблагоприятных для роста.

Выбор той или иной стратегии переживания неблагоприятных условий клетками *E. carotovora* во многом зависит от их физиологического состояния на момент стрессового воздействия. При этом, на ранних этапах переживания стрессовых условий адаптивный ответ определяется главным образом начальной плотностью популяции. Все это позволяет заключить, что при попадании в условия, неблагоприятные для роста, клетки *E. carotovora* запускают различные программы реализации стрессового ответа. Выбор этих программ определяется физиологическим состоянием клеток и плотностью их популяции и контролируется системой межклеточной коммуникации.

2.3. Разработка рекомендаций по усовершенствованию подходов для диагностики бактериозов растений. Создание теоретической модели развития бактериозов растений. Обобщение и оценка результатов исследования.

Формирование растительно-микробных сообществ в естественных экосистемах является сложным и динамичным процессом, в результате которого возникают различные типы взаимоотношений между макро- и микроорганизмами. При развитии бактериозов растений микроорганизмы могут выступать в роли инфекционных агентов, способных служить причиной угнетения роста, нарушения развития макроорганизма и его гибели. Фитопатогенные бактерии обладают внушительным арсеналом факторов вирулентности (ферменты, разрушающие клетки и ткани растений-хозяев, фитотоксины, блокаторы сигнальных систем макроорганизма и т.д.). Их продукция во многом определяет патогенный потенциал бактерий. На сегодняшний день исследования биохимических и молекулярных основ патогенности *E. carotovora*, обладающей уникальными адаптивными

способностями, обеспечивающими их персистенцию и связанных с нею инфекций у растений, остаются совершенно не освещенными. В связи с этим, развитие работ по мониторингу бактериальных популяций *in planta*, включающих характеристику отдельных морфофизиологических вариантов с применением разнообразных методических подходов, представляется актуальной проблемой. Проявление многих признаков патогенных микроорганизмов, определяющих их вредоносность, в большой степени регулируется не на уровне единичных клеток, а является результатом координированного действия целой популяции. Поэтому процессы, определяющие структурную и функциональную организацию популяций бактерий в природных и искусственных системах, требуют детального изучения.

Для реализации Проекта был выбран референтный штамм широкораспространенной фитопатогенной бактерии *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* SCRI1043, вызывающей бактериозы у широкого круга растений, в том числе некроз стеблей («черная ножка») и мягкую гниль клубней картофеля [4]. Фитопатогенность этого штамма была экспериментально подтверждена в отношении неспецифического (табак) и специфического (картофель) растения-хозяина.



Рис. 11. Инфицированные растения табака (*N. tabacum* сорт «Havana») и картофеля (*Solanum tuberosum* сорт Дезире) клетками *E. carotovora* SCRI1043.

Для количественной оценки клеток *E. carotovora* в инфицированных растениях табака нами была разработана тестовая система на основе ПЦР-РВ с видоспецифичными праймерами и флуоресцентными зондами. Эффективность данной тестовой системы была экспериментально подтверждена с использованием препаратов ДНК и модельных культур *in vitro*. Был разработан протокол для очистки клеточных лизатов с целью увеличения эффективности количественной ДНК-диагностики. Этот протокол включает: 1) лизис клеток в 1% растворе Triton X-100; 2) экстракцию полученных лизатов смесью фенола, насыщенного 0,5 М Tris-HCl pH 8.0 с хлороформом в соотношении 1:1; 3) повторную экстракцию хлороформом с изоамиловым спиртом в соотношении 24:1. В полученных таким образом препаратах оценивали содержание ДНК при помощи ПЦР-РВ. Наряду с этим проводили оценку количества пролиферативно активных клеток при помощи определения титра колониеобразующих единиц (КОЕ).

После инфицирования растений клетками *E. carotovora* происходило увеличение численности популяции микроорганизмов до значений 10^9 КОЕ/г; после гибели растения-хозяина клетки микроорганизмов переходили в стадию пролиферативного покоя, что, по-видимому, является необходимым условием для переживания неблагоприятного периода и последующего инфицирования нового растения (рис. 12).

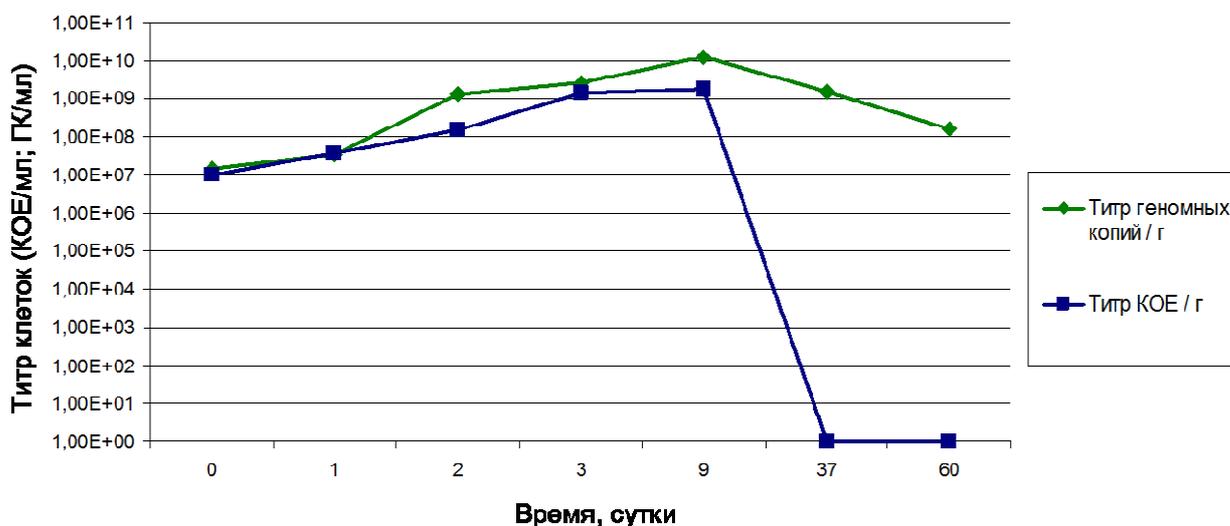


Рис. 12. Динамика титра КОЕ и титра геномных копий ДНК *E. carotovora* в инфицированных растениях табака.

Особенности структуры бактериальных и растительных клеток и тканей табака изучали с использованием электронной и конфокальной микроскопии. После инфицирования растений клетками *E. carotovora* происходила диссоциация микробных популяций. Клетки *E. carotovora*, локализованные внутри паренхимных клеток растения-хозяина, на ранней стадии инфекции были заключены в везикулярные образования растительного происхождения, что представляет собой патоген-индуцируемую защитную реакцию макроорганизма.

В межклетниках коровой паренхимы инфицированных растений, где происходило значительное увеличение численности бактериальных клеток, клетки *E. carotovora* на поздних стадиях инфицирования (9 суток и более) претерпевали значительные ультраструктурные изменения. Многие клетки были плазмоллизированы и имели конденсированный нуклеоид, т.е. приобретали морфологические признаки, характерные для покоящихся форм бактерий. Таким образом, после гибели растения-хозяина клетки этой субпопуляции патогена трансформировались в различные морфотипы, отличные от вегетативных клеток. Эти данные согласуются с результатами,

описанными выше, указывающими на переход клеток бактерий после гибели хозяина в состояние пролиферативного покоя.

Процесс колонизации сосудов ксилемы был сопряжен с формированием особых структур бактериального происхождения, названные нами «бактериальными тромбами». Часть клеток в тромбах была деформирована и отличалась по морфологическим особенностям от основной части популяции. При формировании таких структур клетки *E. carotovora* SCRI1043 соединялись друг с другом, образуя межклеточные контакты и экстраклеточный матрикс (рис. 13).

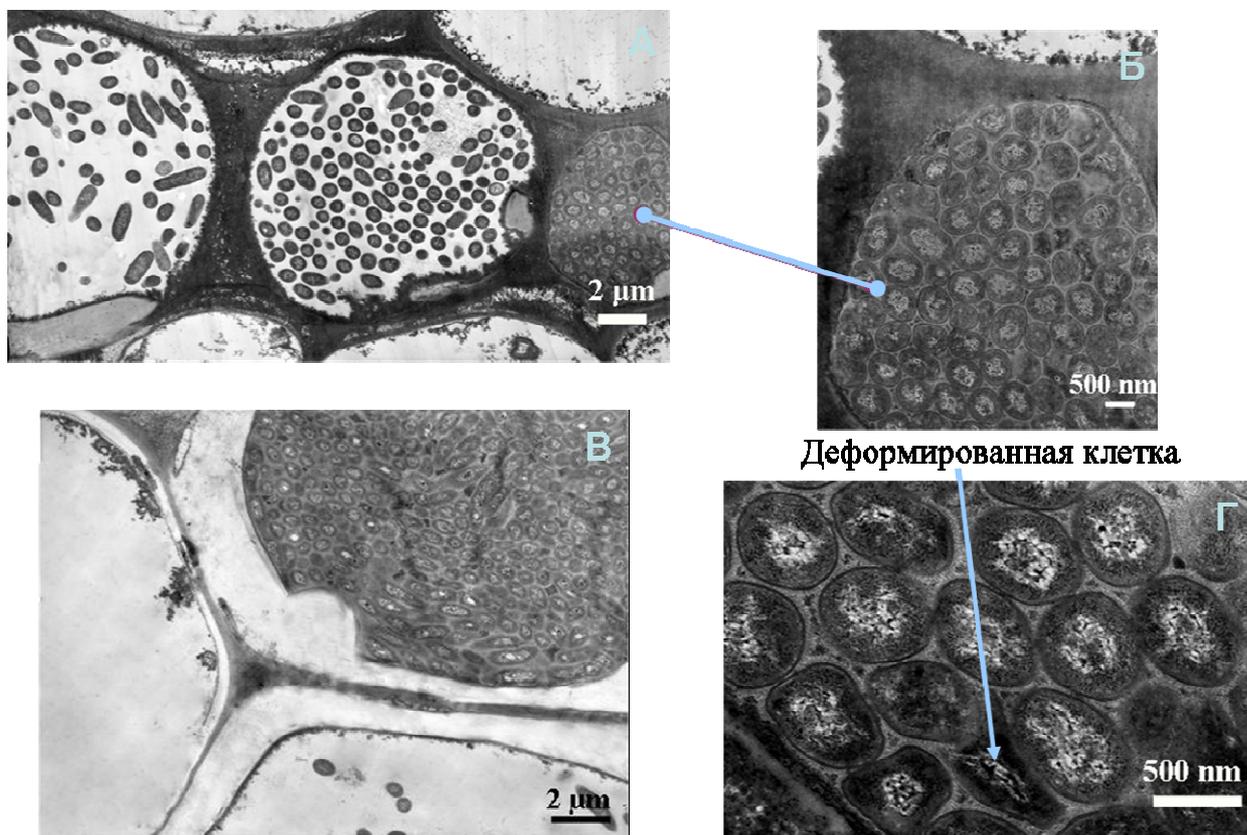


Рис. 13. Микрофотографии срезов сосудов ксилемы стебля растений табака (*N. tabacum* «Навана»), инфицированного клетками *E. carotovora* SCRI1043 через 3 суток.

Для выяснения природы образующегося в сосудах геля (матрикса) было проанализировано содержание и моносахаридный состав

полисахаридов клеточной стенки в различных фракциях контрольных и инфицированных растений. В инфицированных растениях высокомолекулярные пектиновые вещества, входящие в состав клеточной стенки, в значительной степени разрушались. Это хорошо согласуется с общепринятой точкой зрения, что основной мишенью эрвиний являются пектины. Однако не все пектиновые вещества разрушались до низкомолекулярных соединений. Разные типы пектиновых веществ – рамногалактуронан и полигалактуроновая кислота – расщеплялись до разных по размеру соединений размером от 20 до 120 кДа (рис. 14).

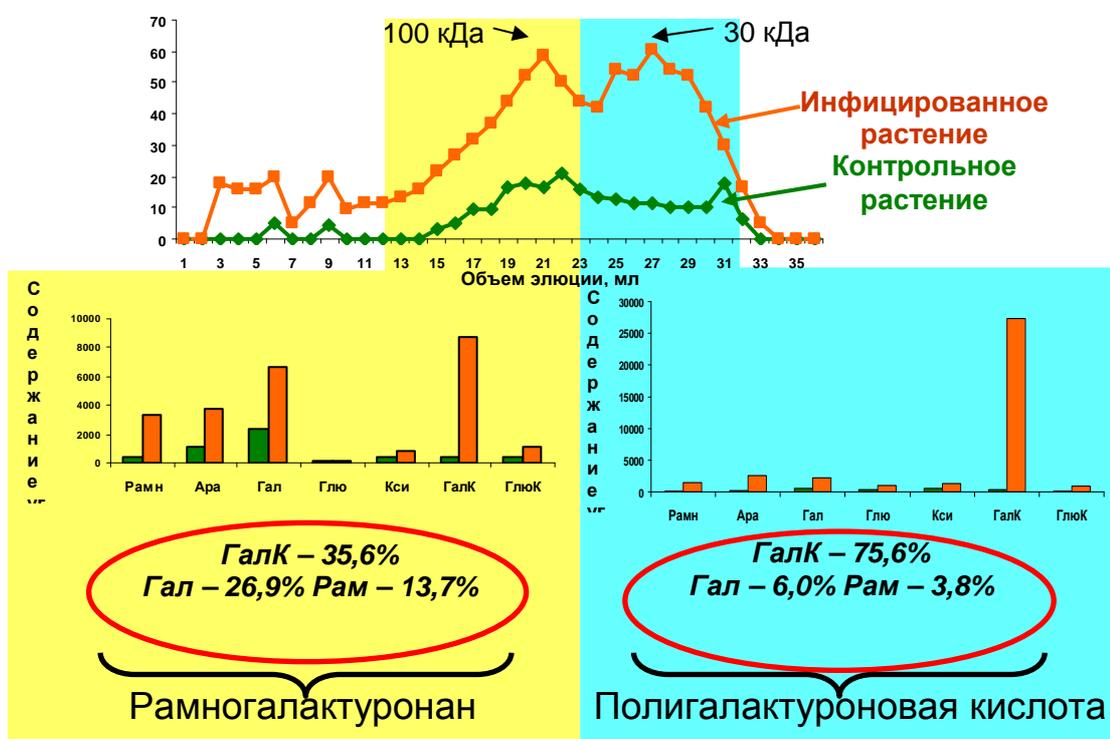


Рис. 14 – Характеристика полисахаридов буфер-экстрагируемой фракции полимеров матрикса клеточных стенок у стерильных и инфицированных растений. А – гель-хроматография на колонке Sepharose 4В CL. Б – Содержание различных моносахаридов в полимерах, элюируемых в области масс выше (выделено желтым) и ниже (выделено синим) 60 кДа.

Такие соединения потенциально способны служить строительными блоками при формировании матрикса бактериальных тромбов. Иммуноцитохимический анализ выявил эпитопы полигалактуроновой кислоты и рамногалактуронана с помощью антител LM19 Jim5 и RGI LM22 в полости сосудов ксилемы инфицированных растений табака, тогда как на срезах контрольных растений свечения не наблюдали (рис. 15).

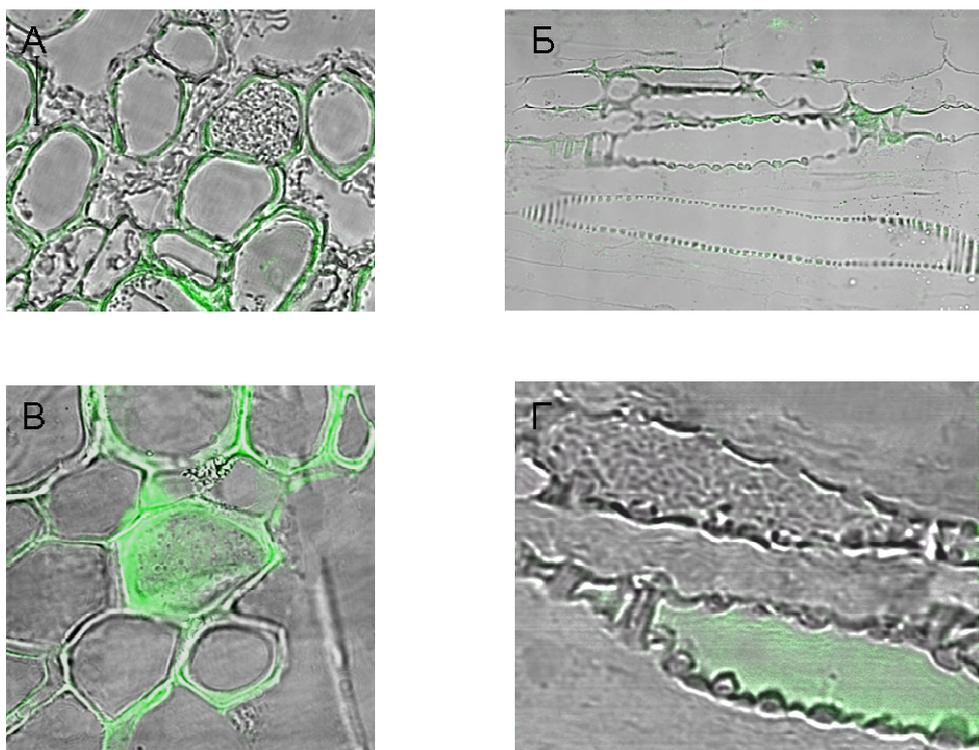


Рис. 15 – Срезы сосудов ксилемы контрольных и инфицированных растений, обработанные антителами LM19 Jim5 и RGI LM22.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что бактерии используют материал растительной клеточной стенки не только как питательный субстрат, но и как строительный материал для формирования специализированных структур – бактериальных тромбов, необходимых для закупорки сосудов.

Создание теоретической модели развития бактериозов растений

Результаты нашей работы однозначно свидетельствуют о сложности и многостадийности процессов взаимодействия фитопатогенных эрвиний с растениями-хозяевами. Применение комплексных подходов, основанных на комбинировании методов молекулярной биологии, различных видов микроскопии и традиционных методов контроля бактериозов позволило нам проводить мониторинг развития популяции фитопатогенного микроорганизма в тканях растения-хозяина. Это, в свою очередь, способствовало выявлению ключевых стадий развития эрвиниоза табака.

Исходя из полученных нами данных мы предполагаем следующую последовательность событий, происходящих в тканях растений при развитии эрвиниоза табака (рис. 16). После проникновения клеток патогена через покровы растения-хозяина и первичной колонизации коровой паренхимы, бактериальные клетки проникают в сосуды ксилемы. В проводящей системе растения происходит прикрепление клеток и образование тромбов. Это затрудняет транспорт воды по растению, ослабляет его иммунный статус и благоприятствует развитию инфекции. В ослабленном растении начинается активное размножение фитопатогена в межклетниках коровой паренхимы. Увеличение численности микроорганизмов приводит к значительным ультраструктурным изменениям клеток хозяина и их последующему разрушению. После гибели растения-хозяина происходит дезинтеграция бактериальных тромбов, основная функция которых – создание водного дефицита в растении – на этой стадии инфекции не актуальна. В тоже время, большая часть субпопуляции *E. carotovora* SCRI1043, локализованная в межклетниках коровой паренхимы преобразуется в особые морфотипы, которые, предположительно, необходимы для переживания межвегетационного периода. То есть исходно однородные бактериальные клетки в зависимости от типа колонизируемой ткани дифференцируются по-разному. Разные морфотипы при этом выполняют определенные задачи.

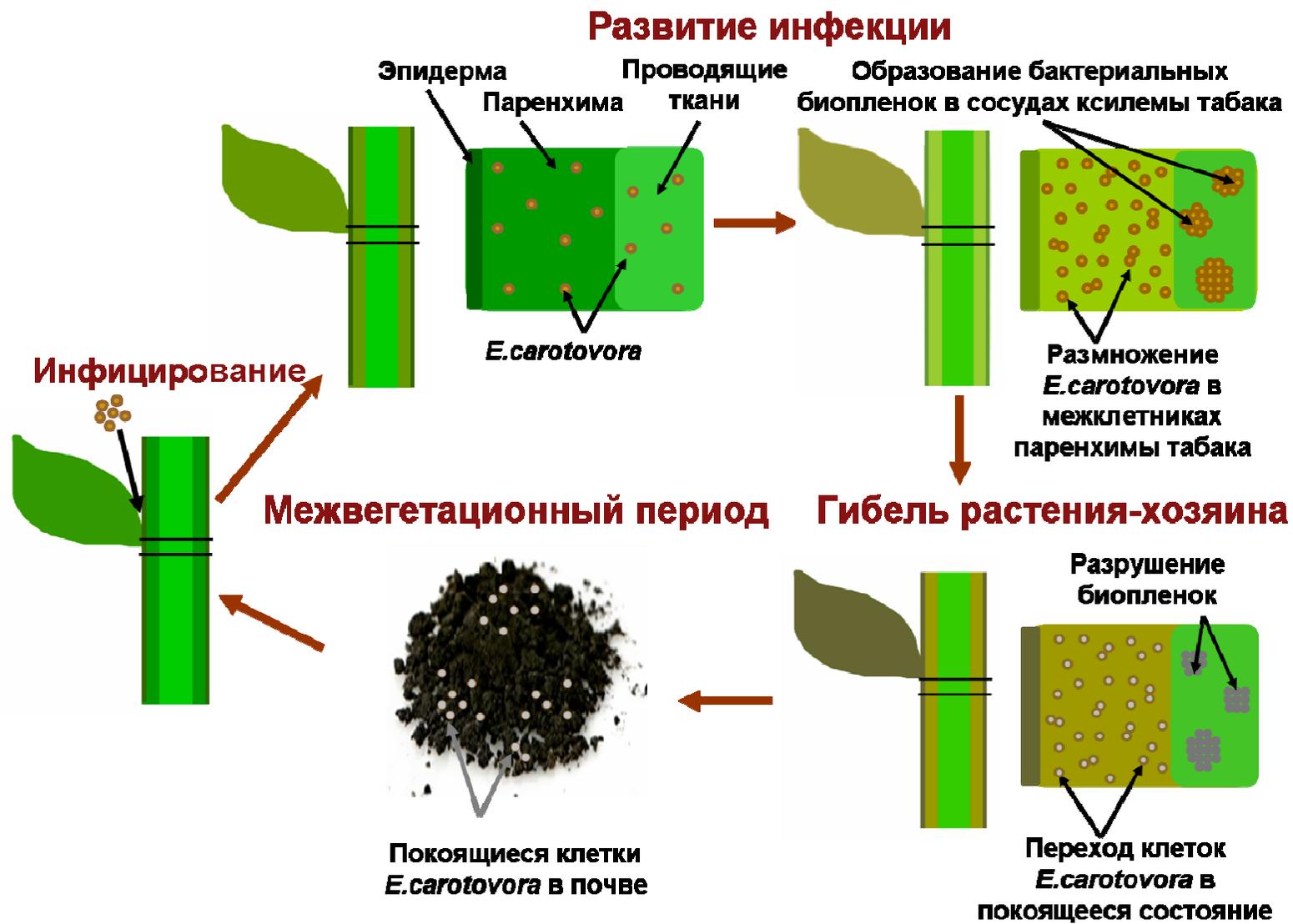


Рис. 16. Гипотетическая схема событий, происходящих в растительных тканях при развитии эрвиниоза табака.

Одни нарушают водный обмен растения, ослабляя его иммунный статус, другие активно колонизируют наиболее богатые ткани, обеспечивают увеличение численности популяции, часть которой, трансформируясь в покоящиеся формы, способствует сохранению микроорганизмов в межвегетационный период и обеспечивает инфицирование нового растения. Полученные в результате реализации Проекта результаты позволили нам смоделировать полный жизненный цикл исследуемого фитопатогена и расширить представление о способах переживания невегетационного периода фитоассоциированными бактериями, что обеспечивает сохранение устойчивых растительно-микробных сообществ.

Для решения фундаментальных проблем биологии, заключающихся в выяснении причин и механизмов, приводящих к неоднородности свойств микробных популяций, остаются не исследованными. В связи с этим были разработаны структурные модели популяций микроорганизмов, отражающих в динамике как групповые характеристики популяции, так и физиологическую, морфологическую и функциональную индивидуальность ее членов (отдельных клеток). Это позволило выявить взаимосвязь структуры бактериальной популяции и свойств составляющих ее клеток с функциональными характеристиками микробного сообщества, а также создать теоретические предпосылки для расшифровки механизмов возникновения и поддержания цитодифференцировки и диссоциации одноклеточных микроорганизмов.

Для изучения адаптивных стратегий микроорганизмов использовались модельные культуры с различным титром инокуляции (10^3 КОЕ/мл – 10^9 КОЕ/мл). При этом клетки инкубировали на голодной среде, что имитирует условия невегетационного периода. В ходе эксперимента было установлено, что в зависимости от плотности популяции в бактериальных культурах реализуются альтернативные адаптивные стратегии. При титре инокуляции более 10^7 КОЕ/мл концентрация клеток постепенно снижалась до значений

10^6 ; при титре инокуляции менее 10^6 КОЕ/мл, наоборот, увеличивалась. В результате во всех вариантах достигалась одна и та же плотность популяции, которая, по всей вероятности, способствует длительной персистенции микроорганизмов в условиях, неблагоприятных для роста (рис. 17).

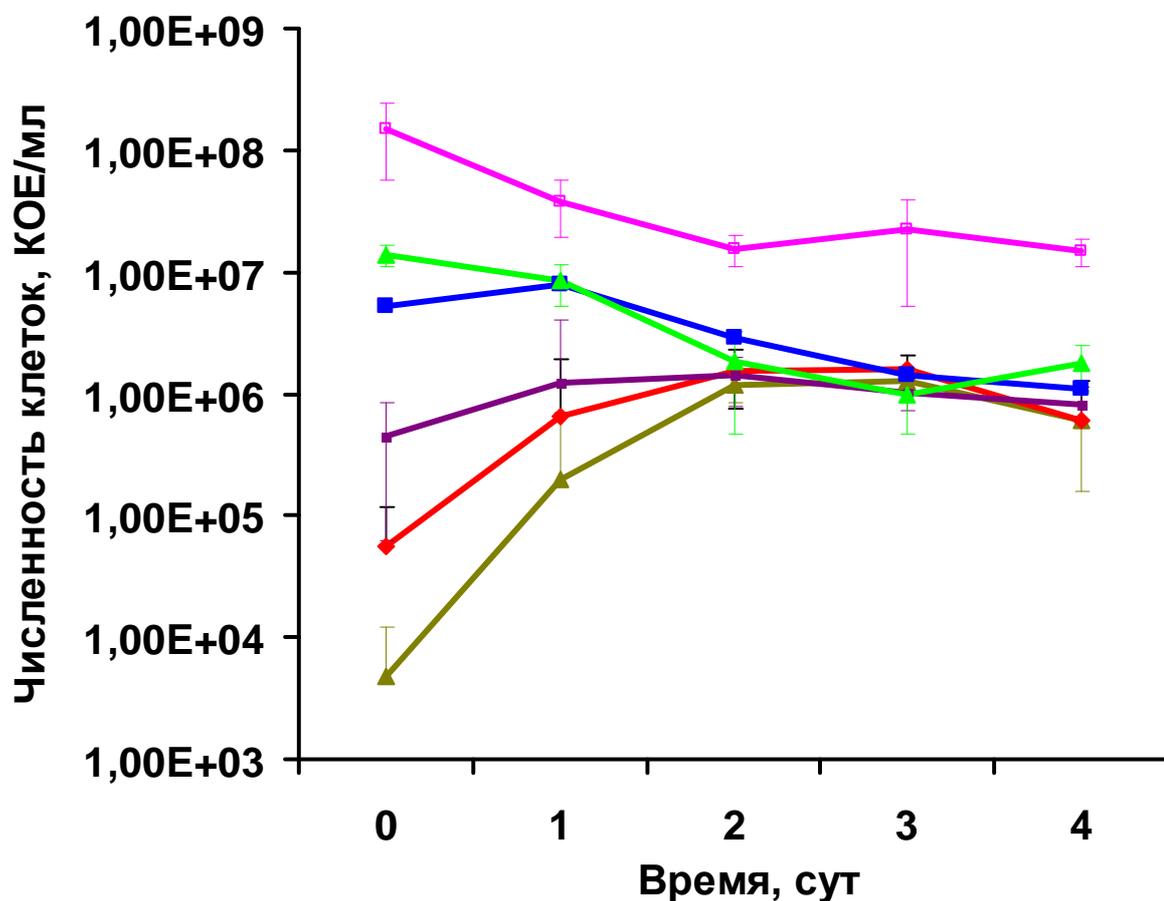


Рис. 17. Динамика численности КОЕ/мл в культурах *E. carotovora*, инкубированных в минеральной безуглеродной среде АВ при различной плотности инокуляции.

Выявленные закономерности были подтверждены при помощи молекулярной диагностики: титр геномных копий снижался и увеличивался в культурах высокого и низкого титра инокуляции, соответственно. На более поздних сроках инкубации в культурах как высокого, так и низкого титра инокуляции снижение титра КОЕ значительно опережало уменьшение титра геномных копий. Это свидетельствует о переходе большей части клеток

популяции бактерий в состоянии пролиферативного покоя. В зависимости от выбранной адаптивной программы в популяциях бактерий происходило формирование неоднородных морфологических вариантов клеток. При инкубации культуры с высоким начальным титром клетки приобретали сферическую форму. По сравнению с вегетативными клетками они характеризовались наружным электронно-плотным слоем, ограничивающим обширное пространство низкой электронной плотности клеточной оболочки. Необходимо отметить на срезах клеток наличие крупно-гранулированной цитоплазмы, в которой нуклеоид морфологически не выражен. Во многих клетках видно развитие процесса плазмолиза. Ультраструктура клеток в голодающих культурах низкой исходной плотности популяции значительно отличалась от клеток, голодающих при высокой плотности популяции. В культурах низкого титра была отмечена явная гетерогенность популяции (рис. 18).

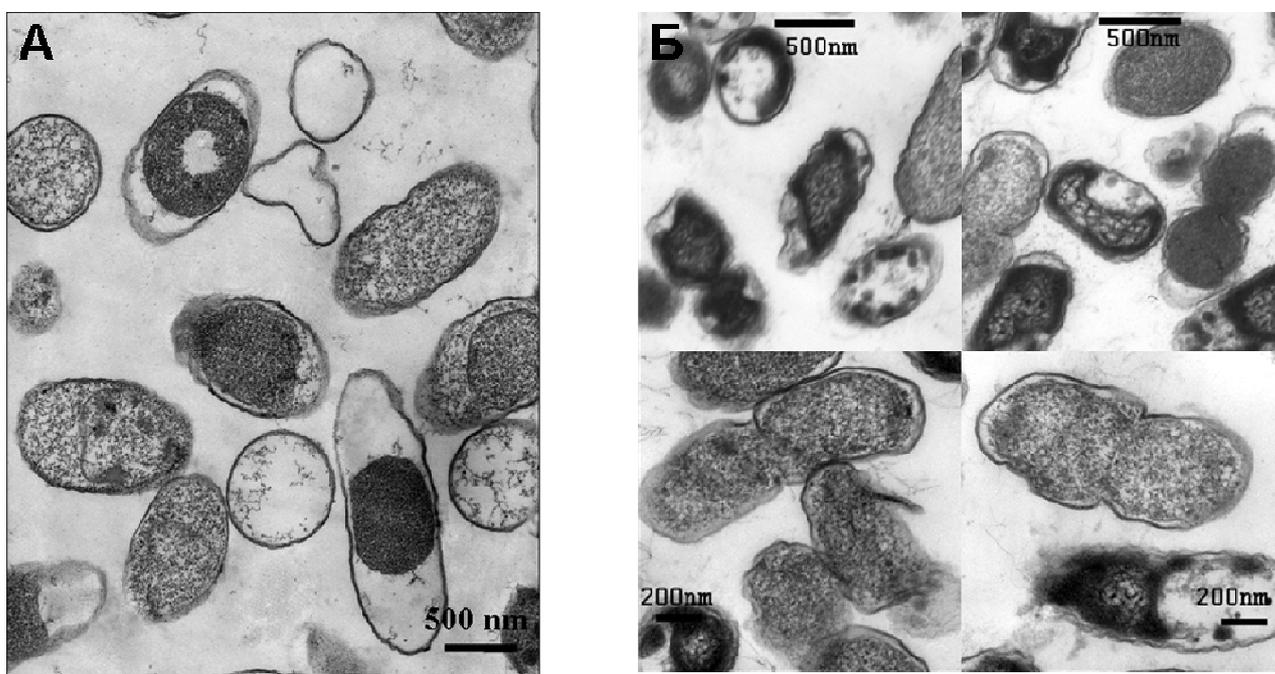


Рис. 18. Микрофотографии срезов клеток культуры *E. carotovora*, инокулированных при исходной низкой плотности популяции.

Было выявлено несколько типов клеток: присутствовали клетки как с однородным, так и с неоднородным электронноплотным содержимым. У клеток последней субпопуляции был выражен плазмолиз. В обеих субпопуляциях встречались делящиеся клетки. Таким образом, разные адаптивные реакции бактерий приводят к формированию разнородных клеточных морфотипов. Были установлены закономерности адаптивных стратегий *E. carotovora* в условиях дефицита ростового субстрата, важные с точки зрения мониторинга, контроля и прогнозирования поведения патогенных микроорганизмов в природных очагах инфекции.

Как было сказано выше, секреция ферментов, разрушающих клеточную стенку растения-хозяина при патогенезе, контролируется как сенсорами факторов растительного происхождения, так и системой межклеточной коммуникации. При исследовании уровня пектатлиазной активности фитопатогена *E. carotovora* была обнаружена различная степень активации его системы кворума в присутствии метаболитов специфичного и неспецифичного растения-хозяина, причем ткани специфичного растения-хозяина оказывали более значительный эффект: пектатлиазная активность была в 3 раза выше, чем в присутствии тканей неспецифичного хозяина. Для выяснения роли межклеточной коммуникации в регуляции плотности популяции *E. carotovora* SCRI1043 при различных условиях были исследованы особенности функционирования системы кворума *E. carotovora* SCRI1043 под влиянием метаболитов растений (табак и картофель). При определении особенностей функционирования системы секреции третьего типа *Erwinia carotovora* ssp. *atrosepticum* SCRI1043 были исследованы относительные уровни экспрессии генов, различных по функциям компонентов кластера *hrp* в присутствии тканей растений. Например, индукция экспрессии генов структурного и регуляторного компонентов системы секреции третьего типа у *E. carotovora* - *hrpA* и *hrpL* происходит на начальных этапах взаимодействия с растительными тканями как специфичного так и неспецифичного растения-хозяина. В то же время в

присутствии тканей картофеля наблюдалась значительная репрессия гена эффекторного белка (*dspE*). Метаболиты специфического растения-хозяина оказывали больший индуцирующий эффект на экспрессию гена АГЛ-синтазы (регулирует образование сигнальных молекул *E. carotovora*) по сравнению с таковыми неспецифического хозяина. Была отработана модельная система для оценки степени индукции системы кворума *E. carotovora* SCRI1043, основанная на детекции АГЛ с помощью репортерного АГЛ-сенсорного штамма, а также на анализе экспрессии генов системы кворума (*expI*). Максимальная индукция репортерной системы АГЛ-сенсорного штамма в наших экспериментах также происходила при добавлении экстрактов супернатантов культур *E. carotovora* SCRI1043, инкубированных в присутствии тканей картофеля. Метаболиты табака оказывали существенно меньший эффект на индукцию синтеза АГЛ у *E. carotovora* SCRI1043. Для первичной характеристики метаболитов растений, обладающих способностью активировать продукцию АГЛ *E. carotovora* SCRI1043, были приготовлены и фракционированы экстракты растений табака и картофеля. Полученные данные указывают на то, что в тканях табака и картофеля содержатся водорастворимые, термостабильные соединения размером менее 5 кДа, влияющие на систему межклеточной коммуникации *E. carotovora*. В условиях, неблагоприятных для роста, бактерии *E. carotovora* SCRI1043 используют стратегию регуляции плотности популяции клеток при участии систем межклеточной коммуникации. При этом достижение максимального значения титра КОЕ сопровождается индукцией экспрессии гена АГЛ-синтазы. Увеличение численности клеток ингибируется факторами, содержащимися в супернатантах голодающих культур. Это также свидетельствует об участии межклеточной коммуникации в регуляции плотности популяции *E. carotovora* SCRI1043 в условиях голодания.

Для определения свойств резистентности к различным стрессовым факторам клетки *E. carotovora* инкубировали в условиях, имитирующих

условия вневегетационного периода, при которых микроорганизмам необходимо выживать вне организма хозяина и, следовательно, отсутствии субстрата для роста. Клетки голодающих популяций вне зависимости от начальной плотности были более устойчивыми к температурному шоку (50°C, 5 мин) по сравнению с вегетативными и способны восстанавливать численность популяции после снятия стрессового фактора (рис. 19).

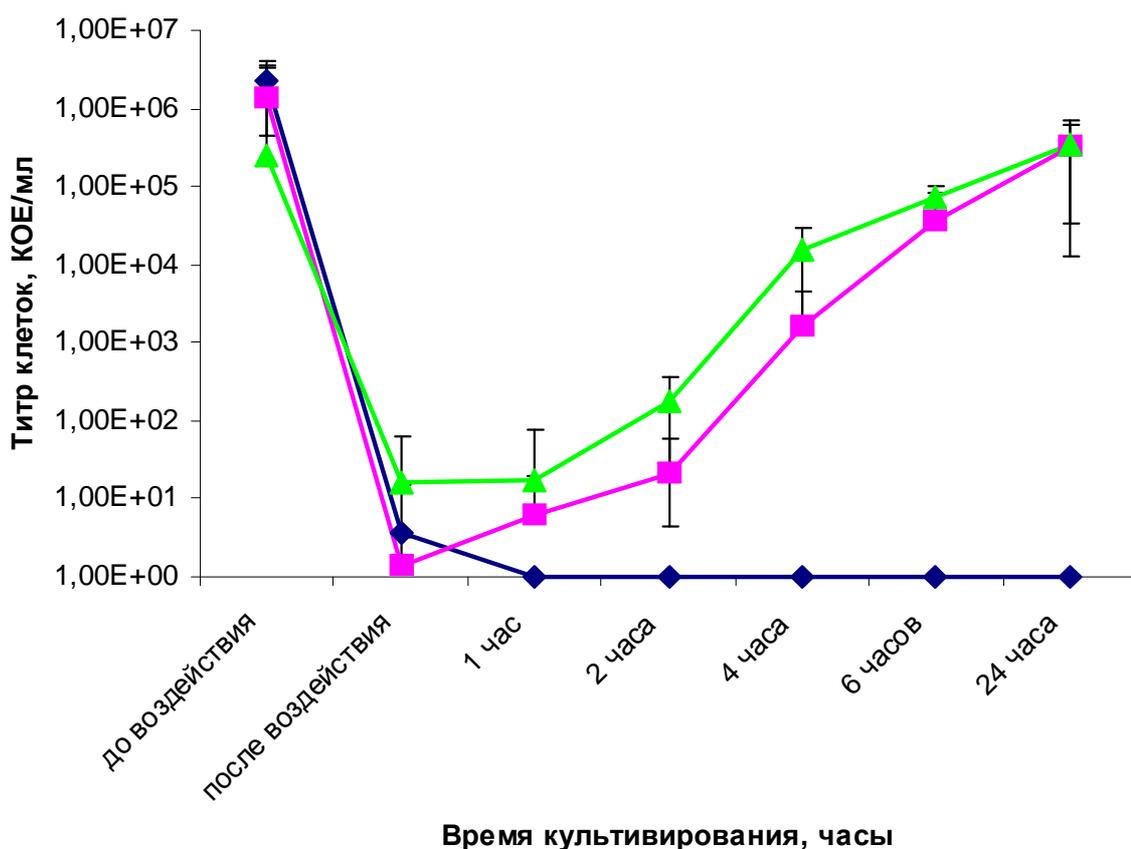


Рис. 19 – Динамика численности популяции *E. carotovora* ssp. *atroseptica* SCRI1043 после воздействия высокой температуры (50°C, 5 мин): популяции с начальным титром 10³ (—) и 10⁸ (—) КОЕ/мл; вегетативные клетки, инокулированные в АВ (—).

При воздействии окислительного стресса (0.01% H₂O₂) наиболее устойчивой оказалась культура, голодающая в течение 3 суток, с начальной плотностью 10⁸ КОЕ/мл (рис. 20).

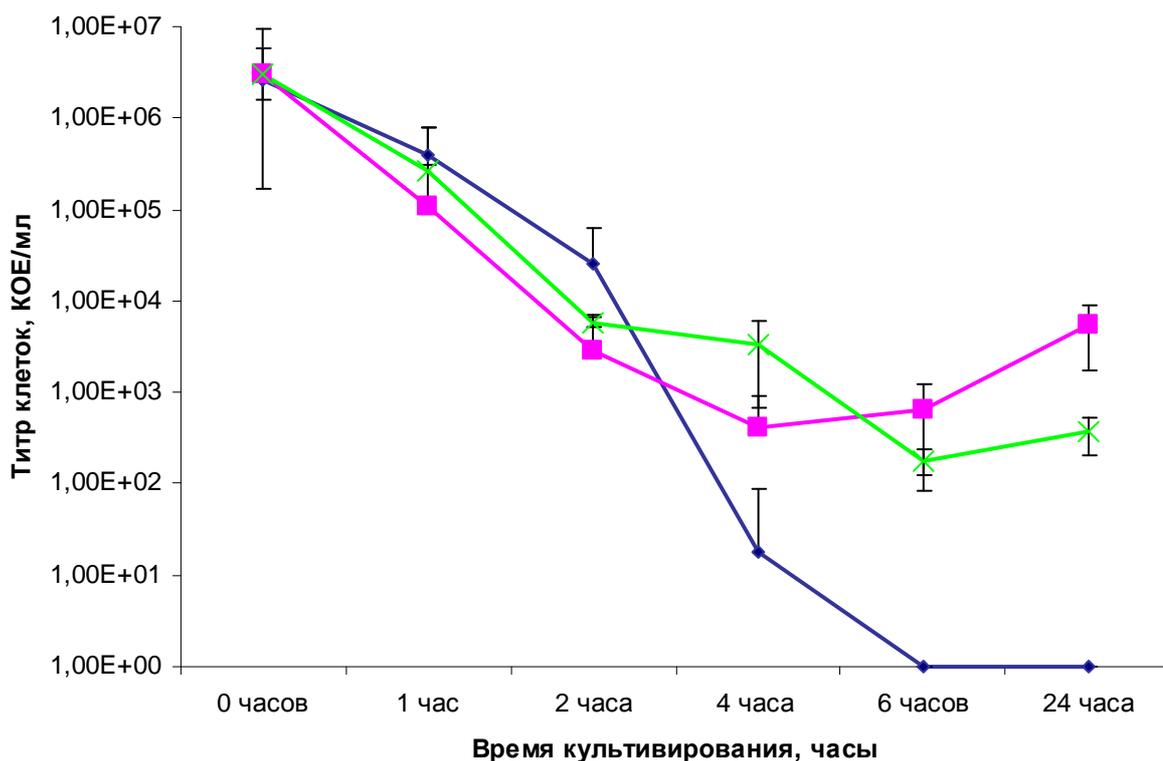


Рис. 20 – Динамика численности популяции *E. carotovora* ssp. *atroseptica* SCRI1043 при окислительном стрессе, вызванном 0.01% раствором H₂O₂: популяции с начальным титром 10³ () и 10⁸ () КОЕ/мл; вегетативные клетки, инокулированные в среду АВ ().

Исследуемые популяции голодающих клеток в условиях осмотического шока вели себя практически идентично. Клетки голодающих культур *E. carotovora* проявляли также резистентность к антибиотику рифампицину. Таким образом, при попадании в неблагоприятную среду популяция голодающих клеток, представленная особыми морфотипами, способна лучше адаптироваться к целому ряду стрессовых факторов. Независимо от выбранной программы адаптации к стрессовым условиям стратегическим результатом в голодающих культурах является формирование резистентных бактериальных фенотипов, обеспечивающих успешное переживание неблагоприятных условий окружающей среды.

Разработка рекомендаций по усовершенствованию подходов для диагностики бактериозов растений.

Формирование адаптивного ответа у бактерий при неблагоприятных для роста условиях приводит к глобальным перестройкам физиологических процессов. Универсальной адаптивной стратегией микроорганизмов принято считать образование покоящихся клеток, для которых характерен сниженный, или даже невыявляемый уровень метаболической и пролиферативной активности. Изменение свойств клеток при стрессе обеспечивается накоплением метаболитов, которые могут приводить к репрограммированию экспрессии генома, благодаря способности взаимодействовать с ДНК или/и ингибировать ферменты нуклеинового обмена. Эти соединения, в частности, являются причиной неэффективности амплификации участков ДНК при проведении современного метода молекулярной биологии по диагностике ПЦР в реальном времени. Для усовершенствования подходов диагностики бактериозов растений с помощью этого метода и восстановления способности к амплификации ДНК, нами была разработана оригинальная методика последовательной многостадийной очистки клеточных лизатов. Данная методика включала в себя диализ, обработку протеиназой и фенольную экстракцию. После этих процедур проводили повторный диализ и преципитацию этиловым спиртом. Этапы очистки, приводившие к увеличению способности ДНК к амплификации, представлены в таблице 1. Культуры клеток, инкубированные в безуглеродной среде в течение двух месяцев, характеризовались низким значением титра ГК, определяемым методом ПЦР РВ при стандартных способах пробоподготовки (лизис клеток кипячением в 1% растворе Triton X-100). При этом титр колониеобразующих единиц (КОЕ) превышал титр ГК. Стократное разведение клеточных лизатов в деионизированной воде приводило к увеличению относительного количества детектируемой ДНК (в пересчете на мл исходной культуры). В тоже время разведение лизатов вегетативных клеток *E. carotovora* не приводило к

увеличению титра ГК. В связи с этим, мы предположили, что в голодающих клетках присутствуют термостабильные ингибиторы ферментов нуклеинового обмена, проявляющиеся в снижении эффективности ПЦР. Действие этих ингибиторов на полимеразу снижается при понижении их концентрации. В результате диализа образцов число детектируемых ДНК-мишеней возрастало, но лишь в малой степени. В свою очередь, последующая обработка лизатов голодающих клеток протеиназой К увеличила количество детектируемых ДНК мишеней на порядок величин и более. Однако и в этом случае полного восстановления способности к амплификации ДНК достичь не удавалось. Дальнейшее восстановление этого показателя происходило после удаления соединений, экстрагируемых органическими растворителями (таблица 1). При инкубировании *E. carotovora* в присутствии синтетического аналога аутоиндуктора анабиоза алкилоксибензола C₁₂-АОБ в концентрации 0.4 мМ ДНК микробных клеток не детектировалась при помощи ПЦР ни в исходных лизатах, ни в их разведениях. Сам по себе данный аутоиндуктор не влиял на эффективность ПЦР даже в концентрации 2.5 мМ. Проведение диализа позволяло детектировать ДНК таких клеток лишь в 10-кратном разведении и при очень низком значении титра ГК/мл (1.2×10^2). Обработка протеиназой усиливала сигнал до 9.6×10^4 ГК/мл. Экстракция органическими растворителями не приводила к существенному увеличению титра детектируемой ДНК, однако позволяла обнаруживать ДНК-мишени не только в 10-кратных разведениях, но и в исходных лизатах (таблица 1). В связи с этим, в дальнейшем очистку лизатов проводили только экстракцией фенолом и хлороформом.. В лизатах вегетативных клеток *E. carotovora* титр ГК хорошо выявлялся; проведение процедур разведения и очистки не приводило к увеличению количества детектируемых ДНК-мишеней. Таким образом, очистку лизатов необходимо проводить экстракцией фенолом и хлороформом для получения качественных ПЦР сигналов.

Таблица 1. Титр ГК/мл в культурах *E. carotovora*. Определение титра ГК проводили в клеточных лизатах после обработки Triton X-100 или SDS, а также в лизатах входе последовательной очистки при помощи диализа, обработки протеиназой К и экстракции фенол-хлороформом

Культура	Проба	Triton X 100	Диализ	Протеиназа	Фенол/ Хлороформ	КОЕ
инкубированная с АОБ в течение 14 месяцев	лизат	0	0	0	$1,0 \times 10^5$	0
	лизат $\times 10^{-1}$	0	$1,2 \times 10^2$	$9,6 \times 10^4$	$1,7 \times 10^5$	
инкубированная при дефиците субстрата в течение 2,5 месяцев	лизат	$7,3 \times 10^4$	0	0	$1,3 \times 10^7$	$3,4 \times 10^6$
	лизат $\times 10^{-1}$	$2,7 \times 10^5$	$1,6 \times 10^6$	$1,4 \times 10^7$	$1,3 \times 10^7$	
	лизат $\times 10^{-2}$	$1,1 \times 10^6$	$5,3 \times 10^6$	$1,4 \times 10^7$	$1,3 \times 10^7$	
на логарифмической стадии роста	лизат	$1,4 \times 10^9$	$5,6 \times 10^8$	$3,9 \times 10^7$	$1,4 \times 10^8$	$4,7 \times 10^8$
	лизат $\times 10^{-1}$	$1,3 \times 10^9$	$6,8 \times 10^8$	$1,4 \times 10^5$	$2,4 \times 10^8$	

В ходе этих процедур число детектируемых ДНК-мишеней на примере исследуемых в рамках Проекта голодающих культур возросло на порядки. Аналогичные процедуры не увеличивали показатели титра ГК культур контрольных вегетативных клеток. Для корректной интерпретации полученных результатов при характеристике возможности детекции ДНК (в рамках Проекта у клеток голодающих культур) был введен термин «Индекс Ингибирования Амплификации». Он определяется отношением числа ДНК-копий, выявляемых в очищенных лизатах к неочищенным. Для вегетативных клеток этот показатель = 1. Полученные данные позволяют заключить, что в голодающих клетках *E. carotovora* происходят изменения в способности к амплификации хромосомной ДНК по сравнению с вегетативными клетками. Они обусловлены появлением новых белковых компонентов, а также низкомолекулярных соединений, удаляемых при диализе и экстракции органическими растворителями. Это, по-видимому, приводит к изменению профиля экспрессии генов и способствует включению физиологической программы переживания условий, неблагоприятных для роста.

Таким образом, разработанный нами способ диагностики позволяет с высокой чувствительностью проводить количественную детекцию злостного фитопатогенного микроорганизма *E. carotovora*, что может эффективно использоваться в сельскохозяйственной практике. Кроме того, разработанный способ пробоподготовки значительно увеличивает информативность диагностики поскольку: 1) позволяет выявлять патогенные микроорганизмы даже в случае накопления в их клетках метаболитов снижающих эффективность молекулярной диагностики; 2) позволяет дифференцировано оценивать титр пролиферативно-активных клеток и клеток, находящихся в состоянии покоя, что зачастую может служить критерием агрессивности патогенных организмов. Применение таких диагностических подходов позволит своевременно выявлять патогенные микроорганизмы и подбирать адекватные подходы для их контроля.

3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для реализации Проекта в рамках четвертого этапа исследования были охарактеризованы молекулярно-генетические особенности клеток в различных по структуре популяциях, произведено обобщение и оценка результатов исследования. Для подготовки экспериментальной базы для работы разработаны и оптимизированы протоколы для микробиологических работ, хроматографии, иммуноцитохимии, анализа экспрессии генов, исследований, с использованием репортерных штаммов.

Были оценены динамики экспрессии генов факторов вирулентности и их регуляторных компонентов у бактерий при развитии различных типов инфекции.

Разработана тест-система на основе ПЦР в реальном времени для определения уровня экспрессии генов вирулентности и их регуляторных компонентов. Результаты работы могут способствовать разработке алгоритмов для мониторинга микроорганизмов, в том числе в ассоциации с высшими организмами, и создана теоретическая модель развития бактериозов растений.

Результаты четвертого этапа и анализ данных литературы позволили подтвердить актуальность и уникальность тематики проекта, не имеющей аналогов в отечественной и мировой литературе, а также соответствие выбранных модельных систем поставленным ранее задачам. Реализация Проекта позволила решить фундаментальные и прикладные проблемы, связанные с развитием бактериозов растений, разработкой новых технологических подходов для их контроля и выяснением механизмов взаимодействия микроорганизмов и растений, что значительно усилило мировые позиции в соответствующих областях отечественной науки и производства. Все примененные методы позволили выполнить все работы по Проекту на высоком техническом уровне. Кроме того, была достигнута цель по содействию развитию научно-образовательной и приборной базы для подготовки студентов, аспирантов и молодых ученых в области

биоинженерии, физико-химической, молекулярной и клеточной биологии, и повышению квалификации специалистов биохимического и молекулярно-биологического профиля. В рамках Проекта были закуплены расходные материалы и химические реактивы, защищены 3 курсовые и 2 дипломные работы. Полученные данные апробированы на российской и зарубежных конференциях. По результатам этих исследований планируется защита кандидатской диссертации руководителя и написана статья, которая в данный момент находится на стадии рецензии в редакции журнала *Phytopathology*

4. СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Дьяков, Ю.Т. Общая и молекулярная фитопатология / Ю.Т. Дьяков и др. М.: О-во фитопатологов. – 2001. – 301 с.
2. Ильина, Т.С. Биопленки как способ существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина: феномен, генетический контроль и системы регуляции их развития / Т.С. Ильина, Ю.М. Романова, А.Л. Гинцбург // Генетика. – 2004. – Т. 40. – № 11. – С. 1445–1456.
3. 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. – № 2. – С. 157–165.
4. 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. – № 6. – С. 782–789.
5. 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. – № 4. – С. 516 – 529.
6. Тарчевский, И.А. Сигнальные системы клеток растений / И.А. Тарчевский. – М.: Наука, 2002 – 294 с.
7. 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. – № 4. – С. 561–565.

8. Barnard, A. L. Quorum sensing, virulence and secondary metabolite production in plant soft-rotting bacteria / A.L. Barnard, S.D. Bowden, T. Burr, S.J. Coulthurst, R.E. Monson, G.C. Salmond // *Phil. Trans. R. Soc. B.* – 2007. – Vol. 362. – № 1483. – P. 1165 – 1183.
9. 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.
10. Chernov, V.M. *Acholeplasma laidlawii* PG8 Culture Adapted to Unfavorable Growth Conditions Shows an Expressed Phytopathogenicity / V.M. Chernov, N.E. Moukhametshina, Y.V. Gogolev, T.N. Nesterova, M.V. Trushin, O.A.Chernova // *The ScientificWorld Journal.* – 2007. – Vol. 7. – P. 1–6.
11. Cui, Y. *rsmC* of the soft-rotting bacterium *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* negatively controls extracellular enzyme and harpin_{Ecc} production and virulence by modulating levels of regulatory RNA (*rsmB*) and RNA-binding protein (RsmA) / Y. Cui, A. Mukherjee, C.K. Dumenyo, Y. Liu, A.K Chatterjee // *Journal of Bacteriology.* – 1999. – Vol. 181. – N.19. – P. 6042–6052.
12. 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.
13. Lee, J.L. Use of ethidium bromide monoazide for quantification of viable and dead mixed bacterial flora from fish fillets by polymerase chain reaction / J.L. Lee, R.E. Levin // *J. Microbiol. Methods.* – 2006. – Vol. 67. – N.3. – P. 456–462.
14. Lewis, K. Persister cells, dormancy and infectious disease / K. Lewis // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2007. – Vol. 5. – P. 48–56.

15. 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.
16. 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.
17. Lou, X. Activin/nodal signaling modulates *XPAPC* expression during *Xenopus* gastrulation / X. Lou, S. Li, J. Wang, X. Ding // *Developmental Dynamics*. – 2008. – Vol. 237. – Issue 3. – P. 683–691.
18. Mae, A. Transgenic Plants Producing the Bacterial Pheromone *N*-Acyl-Homoserine Lactone Exhibit Enhanced Resistance to the Bacterial Phytopathogen *Erwinia carotovora* / A. Mäe, M. Montesano, V. Koiv, E.T. Palva // *MPMI*. – 2001. – Vol. 14. – N.9. – P. 1035–1042.
19. Patankar, A.V. An orphan LuxR homolog of *Sinorhizobium meliloti* affects stress adaptation and competition for nodulation / A.V. Patankar, J.E. González // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2009. – Vol. 75. – N.4. – P. 946–955.
20. 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.
21. Ramey, B.E. Biofilm formation in plant–microbe associations / B.E. Ramey, M. Koutsoudis, S.B von Bodman, C.Fuqua // *Current Opinion in Microbiology*. – 2004. – Vol. 7. – P. 602–609.

22. Shih, Y. The *hexY* genes of *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* and ssp. *atroseptica* encode novel proteins that regulate virulence and motility coordinately / Y. Shih, S.J. Harris, G. Borner, M.M. Rivet, G.P.C. Salmond // *Environmental Microbiology*. – 1999. – Vol. 1. – N.6. – P. 535–547.
23. Smith, B. *In situ* and *in vitro* gene expression by *Vibrio vulnificus* during entry into, persistence within, and resuscitation from the viable but nonculturable state / B. Smith, J.D. Oliver // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2006. – Vol. 72. – N.2. – P. 1445–1451.
24. Toth, I.K. Potato Plants Genetically Modified to Produce *N*-Acylhomoserine Lactones Increase Susceptibility to Soft Rot *Erwiniae* / I.K. Toth, J.A. Newton, L.J. Hyman, A.K. Lees, M. Daykin, C. Ortori, P. Williams, R.G. Fray // *MPMI*. – 2004. – Vol. 17. – N.8. – P. 880–887.
25. 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. – N.8. – P. 3025–3028.
26. 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. – N.8. – P. 3025–3028.
27. 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.