

На правах рукописи



ИСЛАМОВ Бахтияр Рамилевич

**РОЛЬ ЭКСТРАКЛЕТОЧНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ
ФИТОПАТОГЕННОЙ БАКТЕРИИ *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043
В ФОРМИРОВАНИИ РАСТИТЕЛЬНО-МИКРОБНОЙ
ПАТОСИСТЕМЫ**

1.5.21 – физиология и биохимия растений

1.5.11 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Казань

2021

Работа выполнена в лаборатории молекулярной биологии Казанского института биохимии и биофизики – обособленного структурного подразделения Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии наук» (КИББ ФИЦ КазНЦ РАН), а также в лаборатории инфекционных заболеваний растений ФИЦ КазНЦ РАН

Научный руководитель: **Горшков Владимир Юрьевич**
кандидат биологических наук, заведующий лабораторией инфекционных заболеваний растений КИББ ФИЦ КазНЦ РАН, г. Казань

Официальные оппоненты: **Цыганов Виктор Евгеньевич**
доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной биологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», г. Санкт-Петербург.

Федоненко Юлия Петровна
кандидат биологических наук, доцент, заведующий лабораторией биохимии института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук», г. Саратов.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

Защита состоится « » декабря 2021 г. в ч
на заседании диссертационного совета Д 24.1.225.02 на базе ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук»».

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке ФИЦ КазНЦ РАН и на официальном сайте КИББ – обособленного структурного подразделения ФИЦ КазНЦ РАН <http://www.kibb.knc.ru>

Автореферат разослан « » ноября 2021 г.

Отзывы на автореферат в 2-х экземплярах просим направлять по адресу: 420111, г. Казань, ул. Лобачевского, д. 2/31, КИББ – обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН, учёному секретарю диссертационного совета (e-mail: dissovet@kibb.knc.ru)

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Пономарева Анастасия Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Постановка проблемы и ее актуальность. Необходимым условием развития ряда инфекционных заболеваний растений, вызываемых фитопатогенными бактериями, является способность микроорганизмов формировать *in planta* «многоклеточные» структуры, называемые биопленками (Ramey et al., 2004; Srivastava et al., 2017). Основную часть матрикса биопленок, объединяющего отдельные клетки микроорганизма в единую структуру, составляют экстраклеточные полисахариды бактерий (экзополисахариды или ЭПС) (Flemming et al., 2010; Ghafoor et al., 2011). Помимо выполнения структурных функций в составе матрикса биопленок, ЭПС могут выступать в качестве иммуномодуляторов (элиситоров) или иммуносупрессоров, а также защищать клетки микроорганизмов от различных стрессоров, в том числе защитных метаболитов растений (Yun et al., 2006; Aslam et al., 2008; Nwodo et al., 2012; Kakkar et al., 2015; Wang et al., 2019; Zainab et al., 2020). На примере ряда фитопатогенных бактерий продемонстрировано, что ЭПС служат в качестве факторов вирулентности (Condemine et al., 1999; Vuong et al., 2004).

У одних из наиболее вредоносных фитопатогенных бактерий – представителей рода *Pectobacterium* – ЭПС не идентифицированы и не рассматриваются в качестве факторов, определяющих их взаимодействие с растениями. Однако на наличие этих полимеров у пектобактерий, а также на их важную роль в патогенезе указывает ряд фактов. Во-первых, в геноме этих микроорганизмов есть гены, аннотированные как кодирующие ферменты биосинтеза ЭПС. Во-вторых, экспрессия этих генов индуцируется в условиях *in planta* (Gorshkov et al., 2018). И, в-третьих, в сосудах первичной ксилемы растения-хозяина пектобактерии образуют особые биопленко-подобные структуры – бактериальные эмболы, в которых отдельные клетки микроорганизма объединены в целостную структуру при помощи экстраклеточного матрикса (Gorshkov et al., 2014).

В качестве первичного экстраклеточного матрикса бактериальных эмболов служат полимеры не бактериального происхождения, как в случае типичных биопленок, а растительного, а именно высокомолекулярные фрагменты пектинового полисахарида рамногалактуронана I (РГ-I) (Gorshkov et al., 2016). Такие фрагменты высвобождаются из растительных клеточных стенок в люмены сосудов в результате патоген-индуцируемой реакции растения-хозяина (Gorshkov et al., 2016; Tsers et al., 2020). В люмене сосудов фрагменты РГ-I формируют полимерную сеть, в которой удерживаются клетки пектобактерий, образуя плотную «многоклеточную» структуру. В связи с этим, бактериальные эмболы можно рассматривать как продукт интерграции патогена и хозяина, поскольку в его формировании оба организма принимают активное участие. Исследование биогенеза бактериальных эмболов представляет большую важность для понимания

процессов взаимодействия пектобактерий и растений, а также развития мягких гнилей – заболеваний, вызываемых этими фитопатогенами.

В ходе развития бактериального эмбола РГ-I постепенно разрушается, но, несмотря на это, экстраклеточный матрикс не исчезает и дезинтеграции бактериального эмбола не происходит. В связи с этим, мы выдвинули гипотезу, что первичный матрикс из РГ-I, по мере «созревания» бактериального эмбола, замещается полимерной сетью, состоящей из ЭПС, которые принимают на себя функцию удерживания клеток пектобактерий в рамках «многоклеточной» структуры. Кроме того, поскольку при развитии бактериальных эмболов в сосудах первичной ксилемы увеличивается содержание активных форм кислорода (Gorshkov et al., 2016), мы предположили, что ЭПС могут играть роль антиоксидантов и иммуносупрессоров, предохраняющих клетки пектобактерий от защитных реакций растений.

Цель и задачи исследования. Целью настоящего исследования являлась идентификация экзополисахаридов (ЭПС) *Pectobacterium atrosepticum* и структурно-функциональная характеристика этих полимеров, направленная на выяснение их роли во взаимодействии пектобактерий с растениями. Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Выделить ЭПС *P. atrosepticum* и расшифровать структуру их регулярного звена.
2. Оценить наличие ЭПС *P. atrosepticum* в составе матрикса бактериальных эмболов, образующихся в сосудах первичной ксилемы растений, инфицированных этим фитопатогеном.
3. Определить способность ЭПС *P. atrosepticum* влиять на реологические свойства водных растворов и формировать надмолекулярные агрегаты.
4. Проверить возможность участия ЭПС *P. atrosepticum* в детоксикации активных форм кислорода.
5. Оценить влияние ЭПС *P. atrosepticum* на фитоиммунные реакции растений.

Научная новизна работы. Впервые у представителей рода *Pectobacterium* обнаружены ЭПС. Впервые расшифрована структура регулярного звена ЭПС *P. atrosepticum*. Впервые показано, что ЭПС *P. atrosepticum* входят в состав экстраклеточного матрикса бактериальных эмболов – биопленко-подобных структур, образуемых этими бактериями в сосудах первичной ксилемы инфицированных растений. Впервые продемонстрировано, что ЭПС *P. atrosepticum* обладают такими физическими свойствами (способность увеличивать вязкость водных растворов, а также образовывать крупные надмолекулярные агрегаты), которые могут способствовать поддержанию структурной целостности бактериальных эмболов в сосудах ксилемы растений-хозяев. Впервые выяснено, что ЭПС *P. atrosepticum* обеспечивают детоксикацию активных форм кислорода и

повышают устойчивость клеток к действию окислителей. Впервые показано, что ЭПС *P. atrosepaticum* обладают фитоиммуносупрессорными свойствами, которые выражаются способностью этих полимеров подавлять защитные реакции растений, индуцируемые экзогенными элиситорами (ПАМП, патоген-ассоциированный молекулярный паттерн). Впервые установлено, что ЭПС *P. atrosepaticum* играют важную роль в формировании системы паразит-хозяин.

Научно-практическая значимость работы. Полученные данные вносят вклад в понимание процессов взаимодействия растений с фитопатогенными бактериями и развития инфекционных заболеваний растений, а также роли экстраклеточных полисахаридов бактерий в растительно-микробном взаимодействии. Выявлены неописанные ранее метаболиты фитопатогенных пектобактерий, которые во многом определяют их способность колонизировать организм растения-хозяина и вызывать патологический процесс. Результаты работы могут служить основой для создания новых способов контроля мягких гнилей, вызываемых пектобактериями.

Показано, что ЭПС *P. atrosepaticum* обладают способностью увеличивать вязкость водных растворов, образовывать крупные надмолекулярные агрегаты, а также обеспечивать детоксикацию активных форм кислорода и защищать клетки от действия окислителей – то есть свойствами, которые могут быть востребованы в различных отраслях промышленности, медицины и сельского хозяйства.

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

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследования. Работа проводилась с 2014 по 2021 гг. в соответствии с планом научных исследований КИББ ФИЦ КазНЦ РАН по теме «Развитие геномных и постгеномных исследований для выяснения молекулярных механизмов функционирования живых систем и создания организмов с заданными свойствами» (гос. регистрационный номер АААА-А18-118022790082-2). Исследования автора частично поддержаны грантами РФФИ № 19-34-90124, МК-2191.2017.4., МК-7359.2015.4., РНФ № 15-14-10022, а также мегагрантом Министерства науки и высшего образования (соглашение № 075-15-2019-1881). Научные положения диссертации и выводы базируются на результатах собственных исследований автора или на данных, полученных при его непосредственном участии. Расшифровка спектров ЯМР и анализ данных динамического светорассеяния проведены совместно с к.б.н. Микшиной П.В. (КИББ ФИЦ КазНЦ РАН) и Шашковым А.С. (ИОХ им. Зелинского). Реологические свойства полимеров оценены совместно с к.т.н. Кадыровым А.И. (ИЭПТ ФИЦ КазНЦ РАН). Анализ с помощью электронной и флуоресцентной микроскопии проведен совместно с к.б.н.

Агеевой М.В. (КИББ ФИЦ КазНЦ РАН). Поликлональные антитела против целевых полимеров получены совместно с к.б.н. Бурьгиным Г.Л. (ИБФРМ РАН).

Положения, выносимые на защиту:

1. Фитопатогенные бактерии *Pectobacterium atrosepticum* способны синтезировать разветвленные ЭПС, остов которых состоит из остатков α -галактопиранозы, α -маннопиранозы и α -рамнопиранозы, а боковые цепи из остатков α -галактопиранозы, ацетилированной по О-2 положению, и эрвиниозы.

2. ЭПС *P. atrosepticum* входят в состав экстраклеточного матрикса бактериальных эмболов, образующихся в сосудах первичной ксилемы растений, инфицированных этими патогенами.

3. ЭПС *P. atrosepticum* являются многофункциональными полимерами, которые обеспечивают структурную целостность бактериальных эмболов, защищают клетки бактерий от действия окислителей и подавляют фитоиммунные ответы растений-хозяев.

Апробация работы. По материалам диссертации опубликовано 11 работ, из которых 2 статьи в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 155 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы. В работе представлено 4 таблицы и 22 рисунка. Список литературы включает 322 источника, из которых 316 – иностранных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

В обзоре литературы приводится информация о заболеваниях, вызываемых бактериями рода *Pectobacterium*, в том числе о критериях устойчивости/восприимчивости растений и вирулентности микроорганизмов, а также о структуре, синтезе и функциях ЭПС. В конце обзора литературы аргументируется важность исследования биогенеза бактериальных эмболов – «многоклеточных» структур, которые формируются в сосудах ксилемы инфицированных пектобактериями растений и представляют собой продукт растительно-микробного взаимодействия. Указывается, что одним из важных пробелов в понимании процессов развития бактериальных эмболов является неопределенность состава и свойств вторичного матрикса этих структур. Выдвигается гипотеза о том, что важными компонентами этого матрикса служат ЭПС, которые у пектобактерий ранее описаны не были.

Глава 2. Материалы и методы исследования

Штаммы *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 (*Pba*) и *Pseudomonas syringae* DSM 50256 культивировали в среде Lysogeny broth. Для анализа полисахаридов

использовали культуры клеток, растущих в синтетической среде Д5 (13,6 г/л KH_2PO_4 ; 1 г/л NH_4Cl ; 10 мМ MgSO_4 , 2 г/л сахара; рН 7,5), и голодающие культуры, инкубируемые в безуглеродной среде АВ (1 г/л NH_4Cl ; 0,62 г/л $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; 0,15 г/л KCl ; 0,013 г/л $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$; рН 7,5). Растения табака (*Nicotiana tabacum* сорт Petit Havana SR1) и картофеля (*Solanum tuberosum* сорт Кондор) выращивали либо в стерильных условиях на среде Мурасиге-Скуга, либо в почве при 22 °С, 16-ти часовом световом дне и освещении 5000 люкс.

Полисахариды выделяли из супернатантов культур *Pba*. Клетки удаляли центрифугированием и затем фильтрованием через нитроцеллюлозные фильтры (диаметр пор 0,22 мкм). Затем супернатанты нагревали (100°С, 10 мин), центрифугировали и фильтровали. Жидкость выпаривали на роторном испарителе, и полученный образец диализовали против деионизированной воды.

Для расшифровки структуры ЭПС *Pba*, а также для анализа их свойств использовали очищенный с помощью гель-проникающей хроматографии препарат ЭПС: 100->400 кДа – фракция, соответствующая объемам элюции 9-18 мл с учетом вычета мертвого объема (8 мл), а также деацетилированную форму ЭПС. Деацетилирование ЭПС проводили в 12% NH_4OH (37°С, 16 ч).

Гель-проникающую хроматографию проводили на колонке (12×400 мм) с сефарозой CL-4В (Pharmacia, Швеция); элюент – 10 мМ пиридин-уксуснокислый буфер (рН 4,5). Количество углеводов определяли по Дюбуа (Dubuois, 1956). Моносахаридный состав полисахаридов определяли (после гидролиза 2 М ТФУ 120°С, 1 ч) при помощи высокоэффективной анионообменной хроматографии на колонке CarboPac PA-1 (4×250 мм, Dionex, США). Содержание 3-дезоксид-манно-2-октулозоновой кислоты (КДО) в образцах ЭПС и липополисахарида (ЛПС) *Pba* анализировали колориметрически по реакции с тиобарбитуровой кислотой (Karkhanis et al., 1978). ЛПС экстрагировали из клеток горячим водным раствором 45% фенола (Кульшин, 1987) и выделяли согласно ранее описанному протоколу (Senchenkova et al., 2003).

Для установления структуры ЭПС *Pba* снимали одномерные (^1H , ^{13}C , ^{13}C -JMOD), двумерные гетероядерные (HSQC, HMBC) и гомоядерные (COSY, TOCSY, ROESY) спектры ЯМР с использованием ЯМР-спектрометра Bruker AVANCE III. Обработку и анализ данных проводили с помощью программного обеспечения Topspin 2.1 (Bruker, Германия).

Поликлональные антитела, специфичные к ЭПС *Pba*, получали совместно с к.б.н., с.н.с. Бурыгиным Г.Л. на базе ИБФРМ РАН путем трехразовой иммунизации кроликов. Фракцию иммуноглобулина G получали из антисыворотки крови осаждением $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Иммунодетекцию *Pba* ЭПС проводили на полутонких или ультратонких срезах стеблей контрольных и инфицированных *Pba* растений табака и картофеля (Gorshkov et al., 2017). Полисахариды буфер-экстрагируемой фракции

выделяли из неинфицированных и инфицированных *Pba* растений картофеля по описанному протоколу (Gorshkov et al., 2016).

Реологические свойства водных растворов ЭПС *Pba* оценивали на реометре MCR 102 (Anton Par, Австрия) с использованием измерительной системы плита-плита PP50 при 20 °С и скоростях сдвига 1-120 с⁻¹. Экспериментальные данные аппроксимировали моделью Кросса. Гидродинамические радиусы частиц ЭПС *Pba* определяли методом динамического светорассеяния с помощью многоуглового спектрометра Photocor Complex (Photocor Instruments Inc., Россия) при 20°С и положении счетчика фотонов под углом 150°. Усредненный гидродинамический радиус частиц рассчитывали с использованием уравнения Стокса – Эйнштейна. Весовой вклад частиц каждого типа в общую интенсивность светорассеяния образцом рассчитывали согласно теории Шибаяма (Shibayama, 2006).

Антиоксидантные свойства ЭПС *Pba* оценивали по их способности ингибировать 1) окисление салицилата натрия гидроксил-радикалом, 2) окисление пирогаллола супероксид-радикалом, 3) перекисное окисление липидов (Wang et al., 2007). Для оценки способности ЭПС *Pba* защищать клетки *Pba* от действия окислителей клетки инкубировали в присутствии или в отсутствие ЭПС (0,05%) в присутствии или в отсутствие H₂O₂ (1, 2, или 4 мМ). Через 24 часа после внесения H₂O₂ и/или ЭПС в клеточных суспензиях определяли титры КОЕ.

Для проверки способности ЭПС *Pba* индуцировать или репрессировать реакцию гиперчувствительности (качественная устойчивость) листья табака инфильтровали: 1) 10 мМ MgSO₄ (контроль); 2) 0,05% ЭПС *Pba*; 3) клетками *Pseudomonas syringae* DSM 50256, суспендированными в 10мМ MgSO₄ (~10⁸ КОЕ/мл); 4) 0,05% ЭПС *Pba* и через 12 часов клетками *P. syringae*. Проявление реакции гиперчувствительности оценивали визуально через 1-3 суток после инфильтрации.

Для проверки способности ЭПС *Pba* индуцировать или репрессировать ПАМП-индуцируемый иммунитет (количественная устойчивость) листья табака инфильтровали: 1) водой (контроль); 2) 0,02% или 0,05% ЭПС *Pba*; 3) 0,02% или 0,05% деацетилованным (деОАц) ЭПС *Pba*; 4) 1 мкМ раствором хитогексаозы (ХО) (Carbosynth China Ltd., Китай); 5) 0,02% или 0,05% ЭПС *Pba* и через 12 часов 1 мкМ ХО; 6) 0,02% или 0,05% деОАц ЭПС *Pba* и через 12 часов 1 мкМ ХО. Через 6 часов после обработок в инфильтрированных участках листьев измеряли уровни H₂O₂ и каталазной активности. Уровень H₂O₂ определяли методом, основанным на пероксид-зависимом окислении Fe²⁺, с использованием ксиленолового оранжевого (Bellincampi et al., 2000). Каталазную активность измеряли по скорости разложения H₂O₂ (Aeby, 1984).

Статистический анализ данных проводили программе Microsoft Excel-2007. Достоверность различий оценивали по критерию Манна-Уитни ($P < 0,05$).

Глава 3. Результаты и обсуждение

3.1. Идентификация, выделение и первичная характеристика экзополисахаридов (ЭПС) *Pectobacterium atrosepticum* (*Pba*)

Для получения препарата ЭПС *Pba* проведен подбор условий *in vitro*, в которых пектобактерии синтезируют эти полимеры. В ростовых условиях в супернатантах культур *Pba* обнаруживали лишь следовые количества высокомолекулярных углеводов. При голодании клеток в безуглеродной среде в супернатантах культур *Pba* накапливались углеводы, которые разделялись на две основные фракции с молекулярными массами 50->400 кДа и менее 50 кДа (Рис. 1). В состав более высокомолекулярной фракции входили рамноза, галактоза и манноза в соотношении 1:2:1. Более низкомолекулярная фракция включала рамнозу, галактозу, глюкозу и маннозу в соотношении 2:1:4:3.

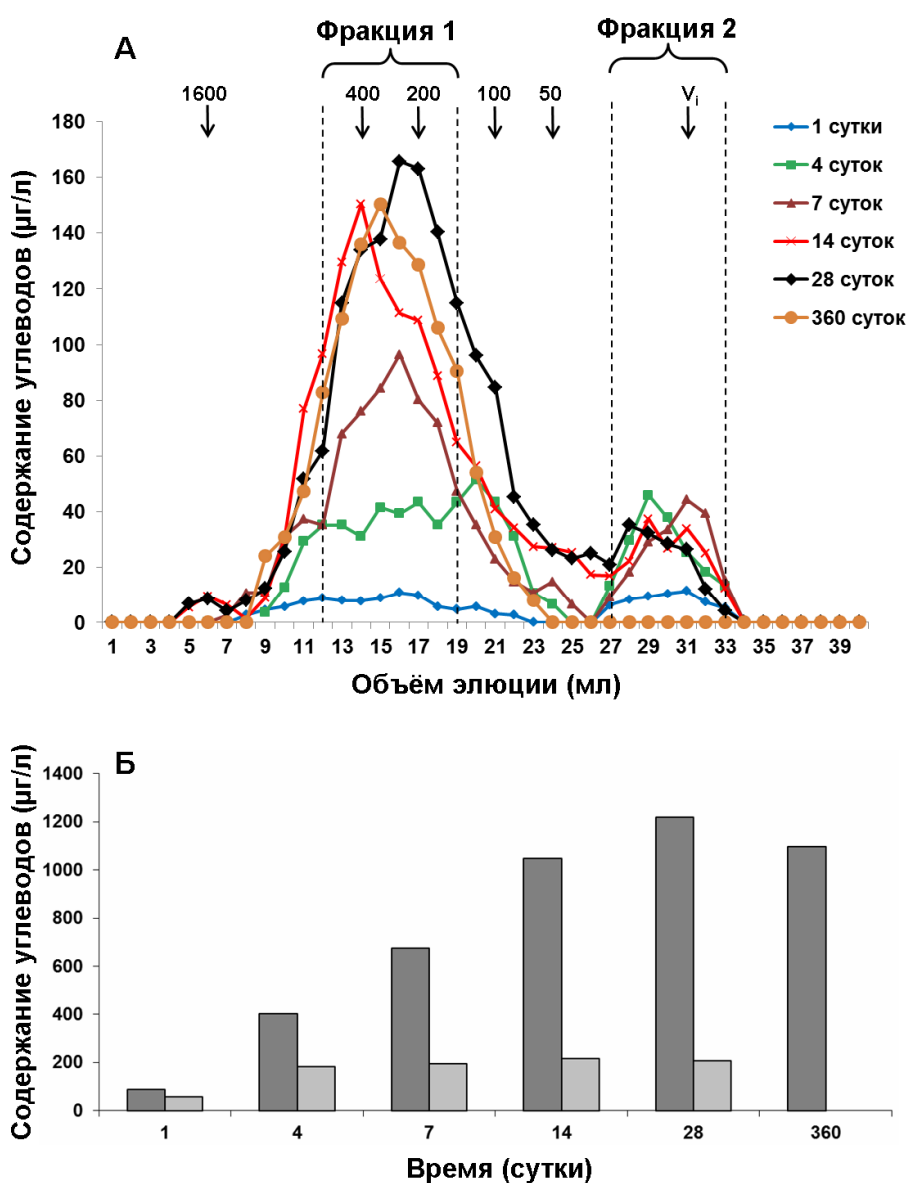


Рис. 1. Профили элюции (А) и содержание (Б) углеводов, накапливающихся в супернатантах голодающих культур *Pba* через 1 (синяя линия), 4 (зеленая линия), 7 (коричневая линия), 14 (красная линия), 28 (черная линия) и 360 (оранжевая линия) суток голодания. Разделение проводили на колонке с сефарозой CL-4В. Маркеры молекулярной массы – пуллуланы. V_i – объем растворителя внутри частиц геля. Содержание углеводов на рисунке Б приведено отдельно для фракций 1 (темно-серый) и 2 (светло-серый), обозначенных на рисунке А.

В процессе голодания доля высокомолекулярных полимеров в общем пуле внеклеточных углеводов увеличивалась, а низкомолекулярных снижалась. После

одного года голодания в супернатантах культур детектировали углеводы только более высокомолекулярной фракции (Рис. 1). В связи с этим, мы акцентировали свое внимание только на полимерах более высокомолекулярной фракции. Поскольку целевые полимеры (фракция 1, объем элюции 9-18 мл, Рис. 1) были выявлены нами в супернатантах голодающих культур, в которых проходят процессы клеточного лизиса, мы экспериментально подтвердили, что появление этих полимеров в супернатантах не связано с гибелью клеток и высвобождением внутриклеточного содержимого в окружающую среду.

Таким образом, нами впервые выявлено, что представители рода *Pectobacterium* (*Pba*) синтезируют ЭПС. Продукция этих полимеров репрессирована в ростовых условиях, но активируется в процессе голодания. В связи с этим, для наработки целевых полимеров с целью характеристики их структуры и свойств мы использовали голодающие культуры *Pba*.

3.2. Расшифровка структуры регулярного звена ЭПС *Pba*

При анализе ЭПС *Pba* с помощью ЯМР спектроскопии выявлено, что регулярность структуры полимера замаскирована из-за присутствия в одном из моносахаридных остатков нестехиометрического *O*-ацетата (δ 21,6 м.д., Рис. 2А).

Для установления точной структуры ЭПС *Pba* были получены *O*-деацетилированные производные этих полимеров, для которых были записаны одномерные (^1H , ^{13}C , ^{13}C JMOD) и двумерные (COSY, TOCSY, HSQC, HMBC, ROESY) ЯМР спектры (Рис. 3). Сопряжение совокупности всех данных, полученных с помощью ЯМР спектроскопии и анализа моносахаридного состава ЭПС *Pba*, позволило установить, что остов регулярного звена этого полисахарида построен из трисахарида $[\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow]$, а боковые цепи, присоединенные к остаткам маннопиранозы в положении *O*-3, состоят из димера $\beta\text{-D-Erw(эрвиниоза)-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow$ (Рис. 3).

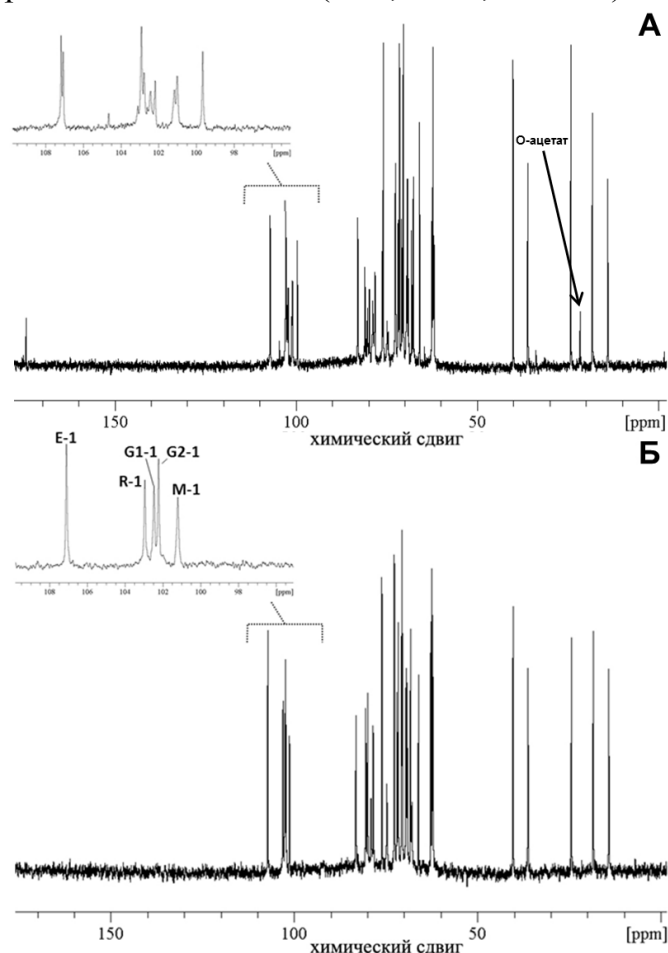


Рис. 2. ^{13}C спектры исходного (А) и *O*-деацетилированного (Б) ЭПС *Pba*.

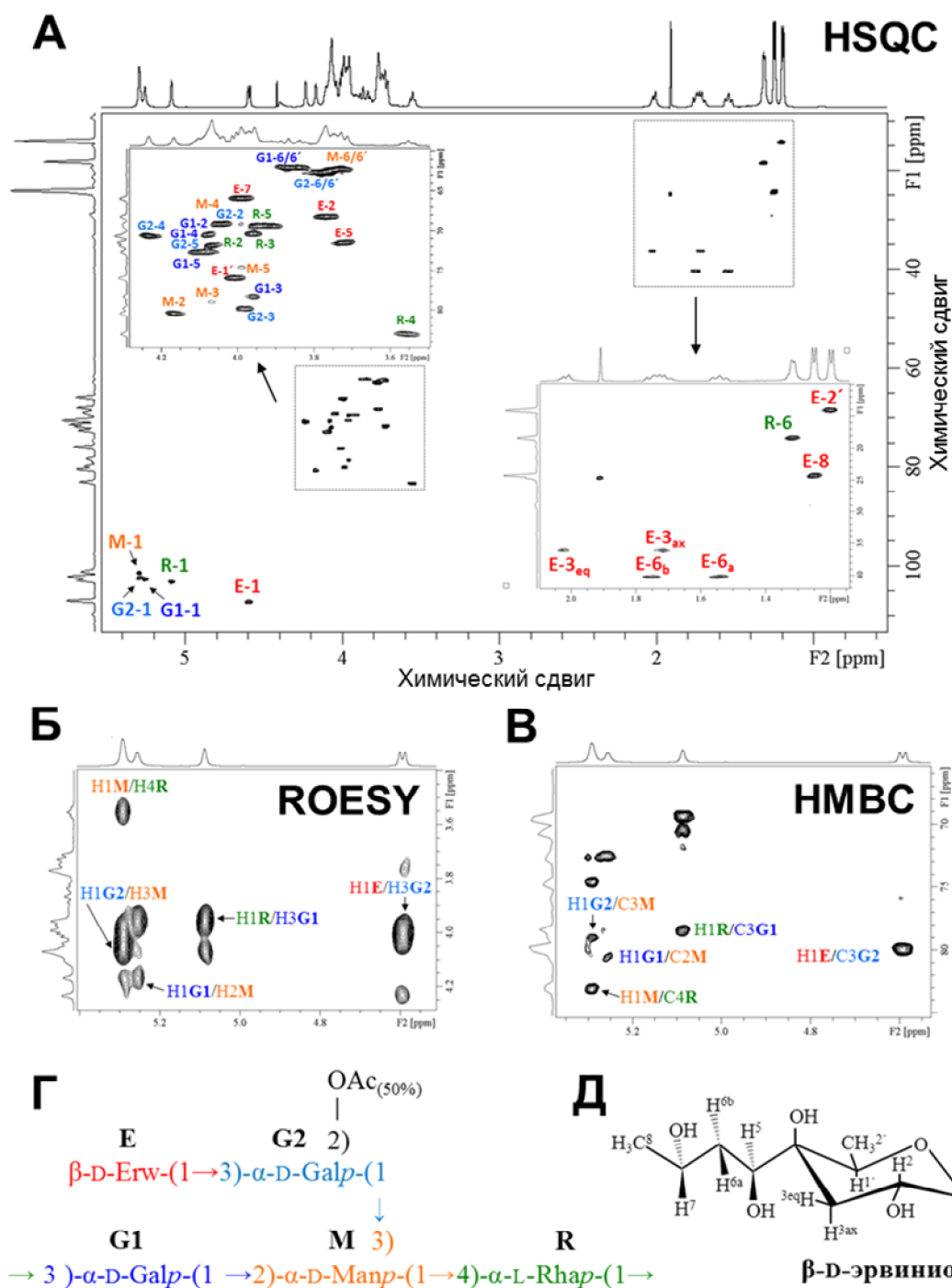


Рис. 3. Фрагменты HSQC (А), ROESY (Б), HMBC (В) ЯМР спектров *O*-деацетилированного ЭПС *Pba*, структура регулярного звена ЭПС *Pba* (Г) и структура эрвиниозы (Erw, 3,6,8-тридезоксид-4-С-(*R*-1-гидроксиэтил)-*D*-гуло-октоза) (Д).

Для определения положения ацетильных групп в структуре ЭПС *Pba* проводили сопоставление ^{13}C спектров исходного полисахарида и его деацетилированного производного. Сравнение ^{13}C спектров ЭПС до и после деацетилирования позволило выявить существенное смещение положения химических сдвигов, относящихся к С-1 и С-2 атомам остатка галактопиранозы боковой цепи, в более слабое поле, что свидетельствует об ацетилировании остатка галактозы боковой цепи полисахарида (G2) по О-2 положению (Рис. 3Г). Степень

изменения интенсивности сигнала С-2 предполагает, что в структуре ЭПС доля ацетилированной галактозы боковых цепей составляет порядка 50%.

Поскольку структура регулярного звена выделенного нами ЭПС оказалась идентична структуре регулярного звена *O*-полисахаридной цепи липополисахарида (ЛПС) *P. atrosepticum* GSPB 9205 (Senchenkova et al., 2005), мы проверили, не являются ли целевые полимеры ЛПС, а не ЭПС. Для этого мы сравнили содержание 2-кето-3-дезоксиктоновой кислоты (КДО) в препаратах ЛПС и ЭПС *Pba*. КДО представляет собой характерный для ЛПС восьмиуглеродный сахар, который связывает углеводную часть ЛПС (ОПС) с липидом А. В препарате ЛПС содержание КДО составило $2,2 \pm 0,1\%$; при этом в препарате ЭПС были выявлены лишь следовые количества КДО. Таким образом, обнаруженные нами ЭПС *Pba* отличаются от ЛПС *Pba*, несмотря на идентичность структуры регулярного звена этих полимеров.

3.3. Иммунодетекция ЭПС *Pba* в сосудах ксилемы инфицированных растений

На следующем этапе исследования мы выясняли, входят ли выявленные нами в культурах *in vitro* ЭПС *Pba* в состав матрикса бактериальных эмболов – «многоклеточных» биопленкоподобных структур, образуемых клетками *Pba* в сосудах первичной ксилемы растений табака. Для этого в сотрудничестве с с.н.с. ИБФРМ РАН к.б.н. Бурыгиным Г.Л. были получены кроличьи поликлональные антитела, специфичные к ЭПС *Pba* (Gorshkov et al., 2017).

Полости сосудов ксилемы, колонизированных пектобактериями, интенсивно метились полученными ЭПС-специфичными антителами (Рис. 4 А); при этом особенно интенсивно метился внеклеточный матрикс (Рис. 4 Г, Д). Иммуномечения не наблюдали на срезах неинфицированных растений (Рис. 4 В), а также инфицированных растений после обработки срезов только вторичными антителами (Рис. 4 Б, Е, Ж). Таким образом, нами показано, что ЭПС действительно входят в состав экстраклеточного матрикса бактериальных эмболов, образуемых клетками *Pba* в сосудах первичной ксилемы растений табака.

Ранее было показано, что первичный матрикс бактериальных эмболов состоит из пектинового полисахарида растения-хозяина – рамногалактуронана I (РГ-I), точнее из его фрагментов (50-400 кДа) с низким уровнем замещения остова боковыми цепями из галактозы (Gorshkov et al., 2016). Такие фрагменты образуются и высвобождаются из растительных клеточных стенок в результате восприимчивого ответа растения-хозяина (Tsers et al., 2020) и экстрагируются буфером из гомогенизированных тканей растений (в отличие от «нативного» РГ-I, удерживаемого растительными клеточными стенками) (Gorshkov et al., 2016). Однако, по мере развития бактериальных эмболов, фрагменты РГ-I постепенно разрушаются, и вопрос о соединениях, поддерживающих структурную целостность бактериальных эмболов, оставался открытым. Наше исследование демонстрирует,

что в качестве таких соединений могут выступать ЭПС *Pba*, которые, по мере разрушения РГ-I, накапливаются в матриксе бактериальных эмболов.

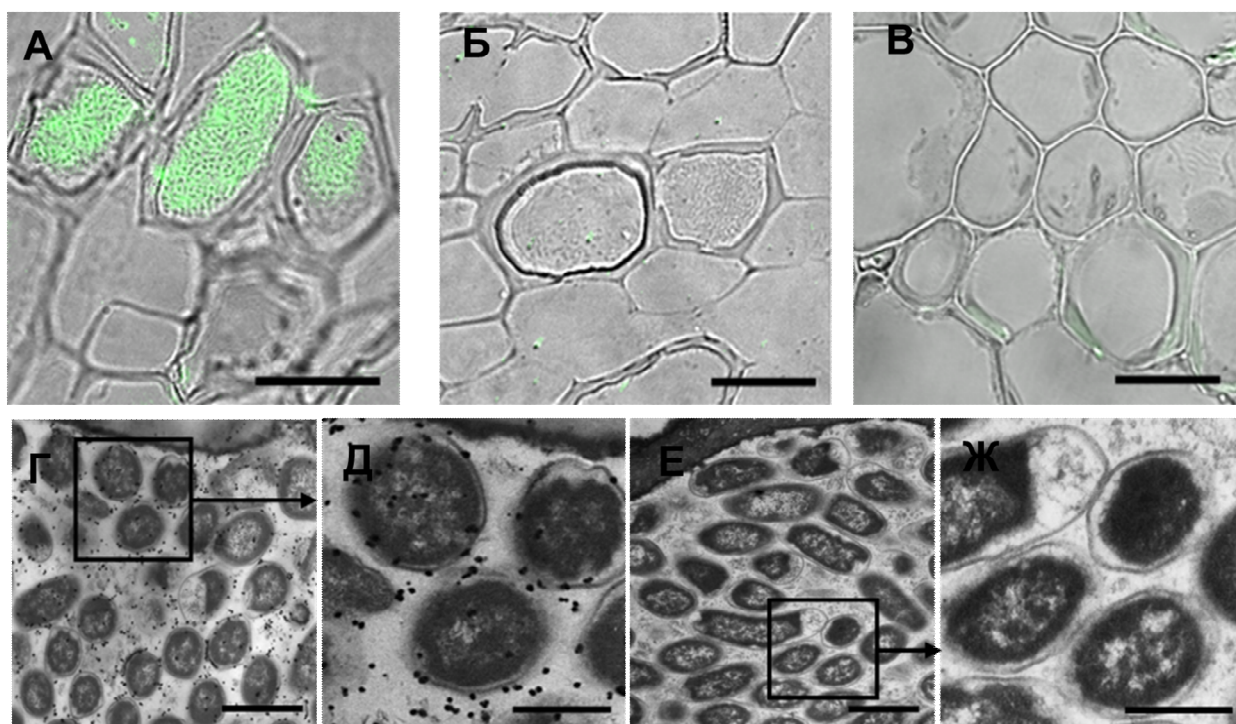


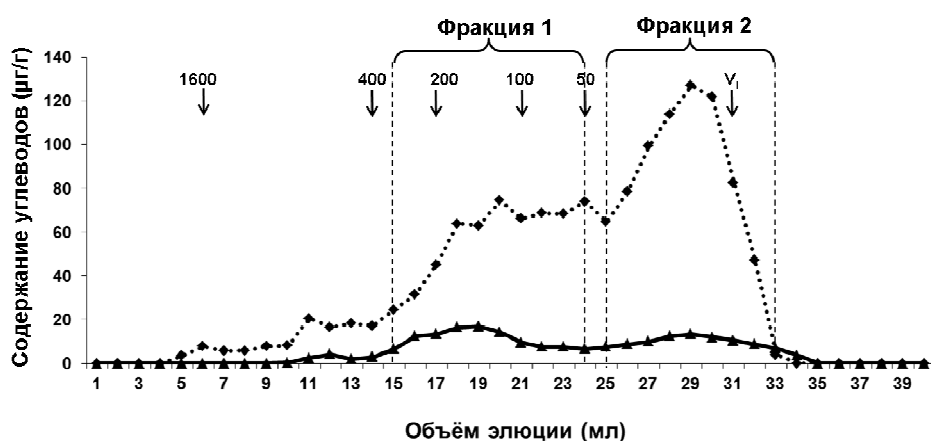
Рис. 4. Иммунодетекция ЭПС *Pba* в сосудах первичной ксилемы растений табака, инфицированных *Pba* (2 суток после инфицирования). Срезы инфицированных растений, обработанные и первичными, и вторичными антителами – А, Г, Д. Срезы инфицированных растений, обработанные только вторичными антителами – Б, Е, Ж. Срез неинфицированного растения, обработанный и первичными, и вторичными антителами – В. Масштабная метка соответствует: А-В – 20 мкм, Г, Е – 1 мкм, Д, Ж – 0,5 мкм.

Образование бактериальных эмболов клетками *Pba* было описано в ходе взаимодействия этих бактерий только с неспецифичным растением-хозяином – табаком. При этом возможность образования этих структур в специфичном хозяине (картофеле) не была продемонстрирована. Не было также выяснено, образуются ли компоненты матрикса бактериальных эмболов (низкозамещенные фрагменты РГ-I и бактериальные ЭПС) в инфицированных *Pba* растениях картофеля. Для проверки этого мы проанализировали состав буфер-экстрагируемых полисахаридов растительной клеточной стенки инфицированных *Pba* растений картофеля и провели иммунодетекцию ЭПС *Pba* в сосудах первичной ксилемы.

Содержание углеводов в буфер-экстрагируемой фракции стеблей растений картофеля, инфицированных *Pba*, было в 6 раз больше, чем во фракции, полученной аналогичным образом из контрольных растений. При этом и для контрольных, и для инфицированных растений было выявлено две основные фракции буфер-экстрагируемых полисахаридов (Рис. 5), соответствующие молекулярным массам 50-400 кДа (фракция 1) и менее 50 кДа (фракция 2).

Более высокомолекулярная фракция (фракция 1, Рис. 5) контрольных растений в основном состояла из фрагментов РГ-I, поскольку соотношение

содержания рамнозы и галактуроновой кислоты (Rha/GalA) было примерно равно единице, что характерно для остова РГ-I, состоящего из чередующих остатков этих двух моносахаридов. В контрольных растениях у буфер-экстрагируемых фрагментов РГ-I была высокая степень замещения галактозными и арабинозными боковыми цепочками, о чем свидетельствует высокое содержание в этой фракции соответствующих моносахаридов (Gal, Ara). В более низкомолекулярной фракции (фракция 2, Рис. 5) контрольных растений доминировали фрагменты полигалактуроновой кислоты, поскольку соотношение Rha/GalA было 0,25.



		Содержание моносахаридов (моль %)						
		Rha	Ara	Gal	Glc	Xyl	GalA	GlcA
Фракция 1	Контроль	15 ± 1	27 ± 3	49 ± 4	0	0	9 ± 1	0
	Инфекция	29 ± 2	25 ± 3	20 ± 1	1 ± 0	1 ± 0	24 ± 3	0
Фракция 2	Контроль	10 ± 1	15 ± 1	34 ± 2	0	0	41 ± 5	0
	Инфекция	14 ± 1	16 ± 1	16 ± 1	0	0	54 ± 4	0

Рис. 5. Профили элюции и моносахаридный состав углеводов, экстрагируемых 50 мМ Na/K-фосфатным буфером из гомогенизированных тканей стеблей контрольных неинфицированных (сплошная линия) и инфицированных *Pba* растений картофеля (3 суток после инфицирования). Разделение проводили на колонке с

сефарозой CL-4В. Маркеры молекулярной массы – пуллуланы. V_i – объем растворителя внутри частиц геля.

В инфицированных растениях более высокомолекулярная фракция (фракция 1, Рис. 5), так же как и в контрольных растениях, состояла преимущественно из фрагментов РГ-I (соотношение Rha/GalA ≈ 1); однако содержание углеводов в этой фракции в инфицированных растениях было более чем в 5 раз выше, чем в контрольных растениях. Кроме того, в контрольных растениях буфер-экстрагируемые фрагменты РГ-I имели высокую степень замещения галактозными боковыми цепочками (соотношение Gal/Rha ≈ 3,2), а в инфицированных растениях степень замещения остова буфер-экстрагируемого РГ-I была значительно меньше (соотношение Gal/Rha ≈ 0,7). Более низкомолекулярная фракция инфицированных растений (фракция 2, Рис. 5) содержала преимущественно полигалактуроновую кислоту (соотношение Rha/GalA ≈ 0,25).

ЭПС *Pba* не детектировали в контрольных неинфицированных растениях картофеля с помощью иммуномечения ЭПС-специфичными антителами (Рис. 6). После обработки срезов инфицированных *Pba* растений картофеля первичными и вторичными антителами происходило интенсивное иммуномечение полостей сосудов ксилемы (Рис. 6Б), содержащих бактериальные эмболы (Рис. 7). При обработке срезов инфицированных растений только вторичными (но не первичными) антителами иммуномечения не наблюдали (Рис. 6В).

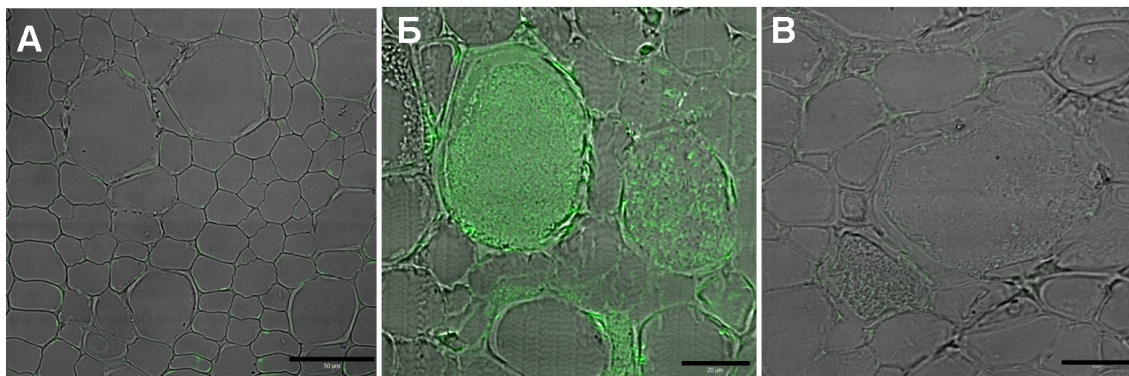


Рис. 6. Иммунодетекция ЭПС *Pba* в сосудах первичной ксилемы растений картофеля, инфицированных *Pba* (3 суток после инфицирования). Срез неинфицированного растения, обработанный первичными и вторичными антителами – А. Срезы инфицированных растений, обработанные и первичными, и вторичными (Б) или только вторичными (В) антителами. Масштабная метка: А – 50 мкм, Б, В – 20 мкм.

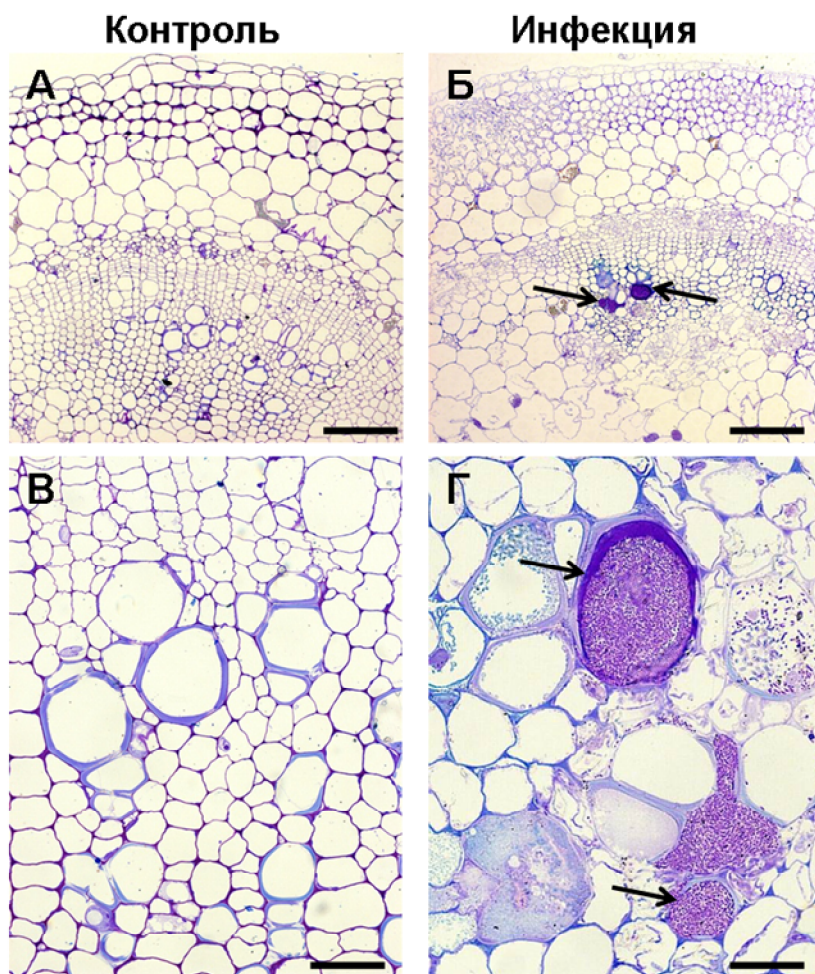


Рис. 7. Срезы контрольных неинфицированных (А, В) и инфицированных *Pba* (Б, Г) растений картофеля (3 суток после инфицирования). Бактериальные эмболы в сосудах первичной ксилемы инфицированных растений обозначены стрелками. Срезы окрашены метиленовым синим. Масштабная метка соответствует: А, Б – 200 мкм, В – 50 мкм, Г – 25 мкм.

Таким образом, нами показано, что в инфицированных *Pba* растениях картофеля (специфичный хозяин) формируются бактериальные эмболы. При этом в инфицированных растениях картофеля (как и табака) накапливаются компоненты матрикса бактериальных эмболов: фрагменты РГ-I (высокомолекулярные, низкозамещенные галактозными цепочками и не удерживаемые растительными клеточными стенками), а также ЭПС *Pba*.

3.4. Определение вязкости растворов ЭПС *Pba*

Увеличение концентрации ЭПС *Pba* приводило к повышению вязкости водного раствора (Рис. 8). Растворы ЭПС *Pba* в концентрациях 1,25-5,0% проявляли неньютоновские свойства (псевдопластичное поведение) в исследуемом диапазоне скоростей сдвига ($1-120 \text{ c}^{-1}$). Псевдопластичное поведение водных растворов ЭПС становилось более выраженным по мере увеличения концентрации ЭПС. Различия между максимальным (η_0) и минимальным (η_∞) значениями эффективной вязкости в исследуемом диапазоне скоростей сдвига были небольшие (например, для 5% раствора ЭПС это различие составляло менее 7%).

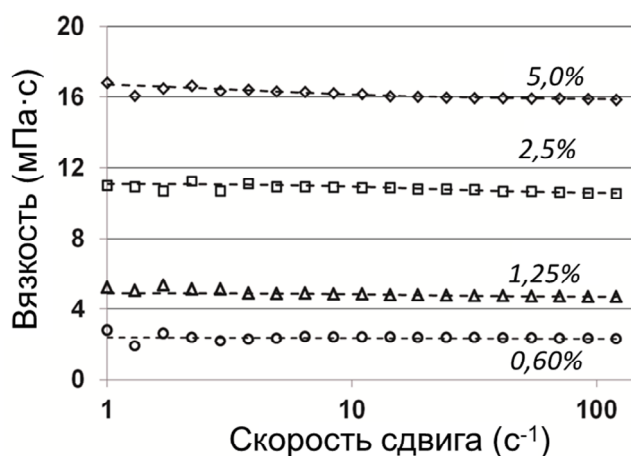


Рис. 8. Зависимость эффективной вязкости растворов ЭПС *Pba* от скорости сдвига

Полученные результаты свидетельствуют о том, что структура раствора ЭПС *Pba* в состоянии покоя существенно не отличается от упорядоченной структуры раствора, возникающей из-за сдвигового напряжения, которое, в частности, может создаваться током жидкости. Это означает, что водные растворы ЭПС *Pba*, несмотря на то, что характеризуются небольшими значениями эффективной вязкости, могут поддерживать этот уровень вязкости даже при интенсивном воздействии сдвигового течения омываемой жидкости. Это свойство ЭПС, по всей видимости, позволяет бактериям противостоять периферийному омыванию жидкости, что особенно важно для колонизации сосудов ксилемы растения.

3.5. Оценка способности ЭПС *Pba* к формированию супрамолекулярных агрегатов

При низких концентрациях (0,05%) молекулы ЭПС *Pba* формировали два типа частиц со средними гидродинамическими радиусами 11,4 нм (малые частицы, R_3) и 60,3 нм (средние частицы, R_2) (Рис. 9). Гидродинамический радиус средних частиц монотонно увеличивался по мере увеличения концентрации ЭПС в растворе. При

наибольших (из проанализированных) концентрациях ЭПС *Pba* (2,5 и 5,0%) в растворе также формировались крупные агрегаты с гидродинамическим радиусом более 8000 нм (R_1) (Рис. 9).

Весовой вклад разных по размеру частиц в общий уровень светорассеяния различался в зависимости от концентрации ЭПС *Pba* в растворе. Весовой вклад малых частиц уменьшался при увеличении концентрации, а средних частиц – увеличивался в диапазоне концентраций 0,05-1,25%. При более высоких концентрациях (2,5 и 5,0%), когда в растворе появлялись крупные агрегаты около 8000 нм (R_1), весовой вклад средних по размеру частиц (R_2) уменьшался. Это означает, что крупные частицы (R_1) формировались в результате агрегации средних частиц (R_2).

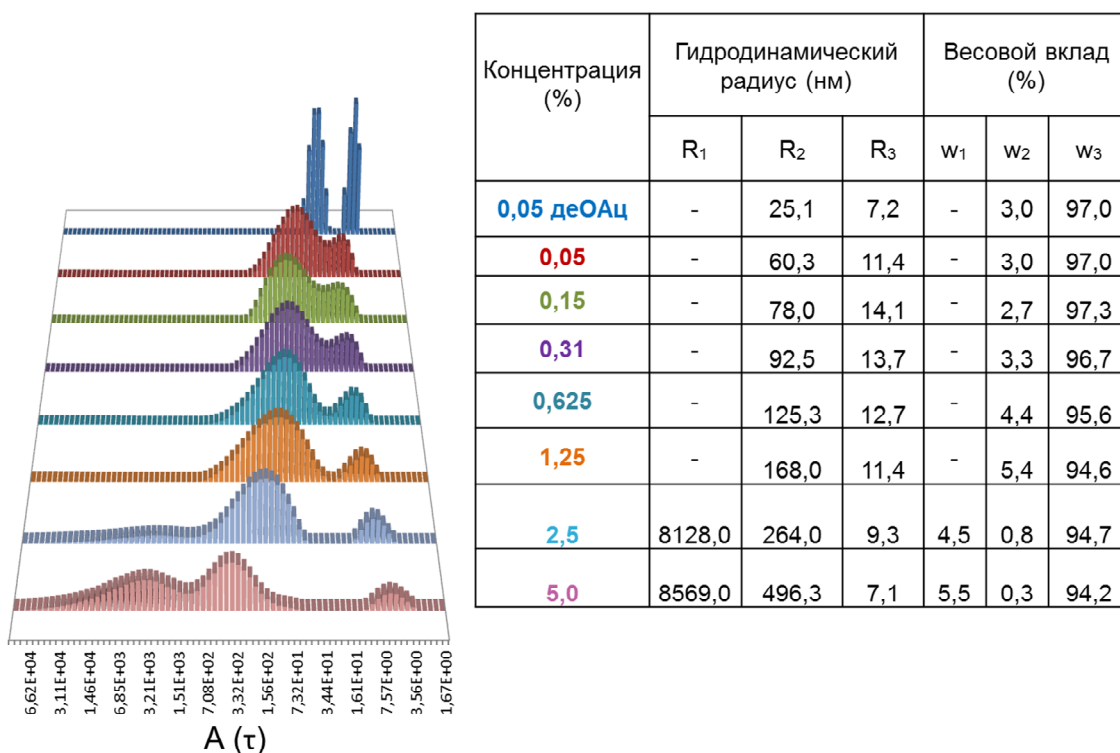


Рис. 9. Гидродинамический радиус и весовой вклад в общий уровень светорассеяния частиц ЭПС *Pba*, образующихся в водном растворе при разных концентрациях полимеров. A (τ) – амплитуда от времени. 0,05 деОАц – данные для частиц деацетилированной формы ЭПС при концентрации 0,05%. Весовые вклады частиц в общий уровень светорассеяния рассчитаны по формуле Шибаямы.

Поскольку модифицирующие группы могут определять структурные свойства полисахаридов (Lima et al., 2018), мы проанализировали гидродинамические радиусы частиц деацетилированной формы ЭПС (деАОц). Деацетилированные ЭПС, как и нативные (ацетилированные), формировали два типа частиц. Однако гидродинамические радиусы частиц деацетилированных ЭПС были меньше (7,2 и 25,1 нм), чем нативных полимеров (11,4 и 60,3) (Рис. 9). Это означает, что ацетильные группы вносят вклад в агрегацию молекул ЭПС *Pba*.

Таким образом, нами выяснено, что ЭПС *Pba* обладают свойствами, которые могут обеспечить структурную целостность бактериальных эмболов (даже когда их первичный матрикс из фрагментов РГ-I разрушается). К сожалению, мы не можем определить точную концентрацию ЭПС *Pba* в составе матрикса бактериальных эмболов или в целом *in planta*. Однако анализируемые нами концентрации, судя по всему, являются физиологическими. Из голодающих культур мы выделяли значительно меньшее количество очищенного препарата ЭПС – 1-1,5 мг/л (0,0001%). Однако в голодающих культурах титр клеток примерно в 50 меньше, чем титр бактерий в инфицированных растениях (Gorshkov et al., 2014). При этом распределение бактериальных клеток в тканях инфицированных растений неравномерное, и в составе бактериальных эмболов плотность клеток *Pba* как минимум на порядок величин больше, чем в среднем в тканях растения-хозяина. Кроме того, удельная (в пересчете на одну бактериальную клетку) продукция ЭПС *in planta* примерно в пять раз больше, чем *in vitro* (Gorshkov et al., 2017). В дополнение к этому, при выделении ЭПС из супернатантов культур мы удаляли бактериальные клетки, с поверхностью которых может быть ассоциировано большее количество ЭПС, чем находится в растворе, а очистка препарата, безусловно, приводила к его частичной потере. Принимая все это во внимание можно сделать заключение, что анализируемые концентрации ЭПС (в том числе самые высокие) характерны для матрикса бактериальных эмболов.

3.6. Анализ антиоксидантных свойств ЭПС *Pba*

Нативные (ацетилированные) ЭПС *Pba* (но не деацетилированные формы) подавляли окисление салицилата натрия гидроксил-радикалом, пирогаллола супероксид-радикалом, а также перекисное окисление липидов *in vitro* (Рис. 10).

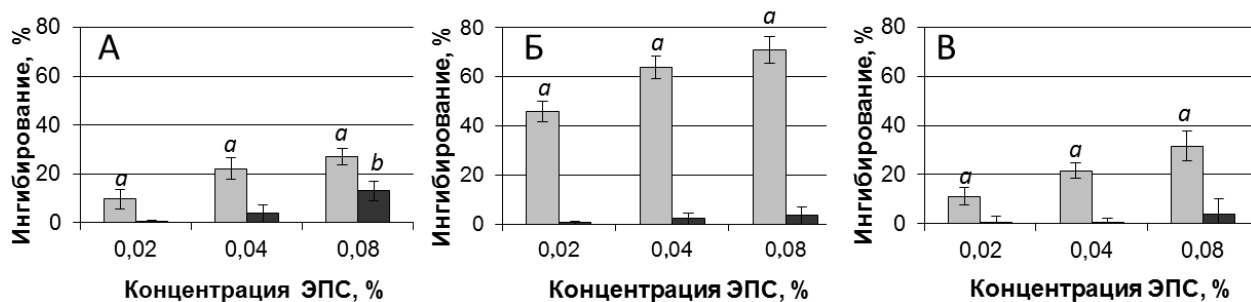


Рис. 10. Антиоксидантные свойства ЭПС *Pba*. На диаграммах представлены уровни ингибирования окисления салицилата натрия гидроксил-радикалом (А), окисления пирогаллола супероксид-радикалом (Б), а также перекисного окисления липидов (В) в присутствии ЭПС *Pba* (светло-серые столбцы) или деацетилированных ЭПС *Pba* (темно-серые столбцы). Эксперименты проведены в пяти повторностях; *a* и *b* указывают на статистически значимые различия (тест Манна-Уитни, $P < 0.05$).

Экзогенное добавление нативных ЭПС *Pba* в суспензии клеток повышало устойчивость *Pba* к действию окислителей (H_2O_2). При 4 мМ H_2O_2 титр КОЕ в суспензиях клеток, не содержащих экзогенно добавленные ЭПС, был ниже

детектируемого уровня, а в суспензиях с экзогенно добавленными ЭПС (до 0,05%) составлял 2×10^3 КОЕ/мл (Рис. 11). При более низких концентрациях H_2O_2 (1 и 2 мМ) титр КОЕ в суспензиях с экзогенными ЭПС был в 5 и 250 раз, соответственно, больше, чем без экзогенных ЭПС. Деацетилированные ЭПС тоже защищали клетки *Pba* от действия H_2O_2 ; однако титр КОЕ в суспензиях с экзогенными нативными ЭПС был в 7-10 раз больше, чем в суспензиях с экзогенными деацетилированными ЭПС (Рис. 11).

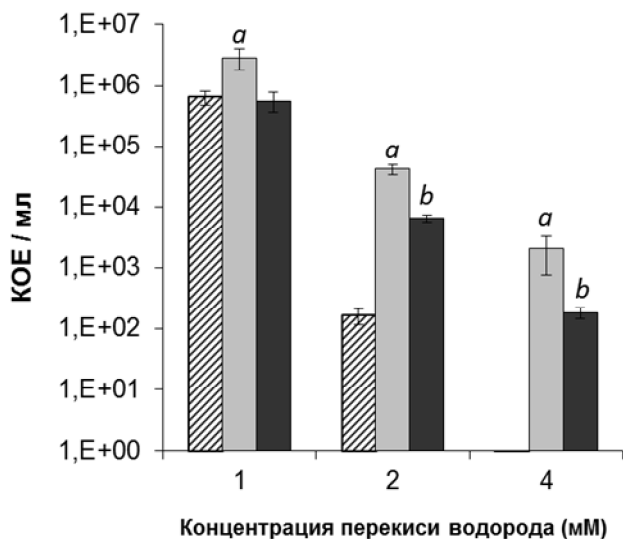


Рис. 11. Влияние ЭПС *Pba* на устойчивость клеток *Pba* к H_2O_2 . Клетки инкубировали в отсутствие (заштрихованные столбцы) или в присутствии нативных (ацетилированных) ЭПС (светло-серые столбцы) или деацетилированных ЭПС (темно-серые столбцы). Титр КОЕ определяли через 24 часа после внесения перекиси водорода (1, 2 или 4 мМ). Эксперимент проведен в трех биологических повторностях; *a* и *b* указывают на статистически значимые различия (тест Манна-Уитни, $P < 0.05$).

Таким образом, нами выяснено, что ЭПС *Pba* обладают выраженными антиоксидантными свойствами и способны защищать клетки пектобактерий от действия окислителей. Ацетильные группы, входящие в состав ЭПС, вносят значительный вклад в антиоксидантные свойства этих полимеров.

3.7. Анализ фитоиммунных свойств ЭПС *Pba*

ЭПС *Pba* при инфильтрации в листья табака не индуцировали реакцию гиперчувствительности (качественная устойчивость) и не подавляли развитие этой реакции при ее экзогенной индукции с помощью инфильтрации клеток *Pseudomonas syringae* (Рис. 12).

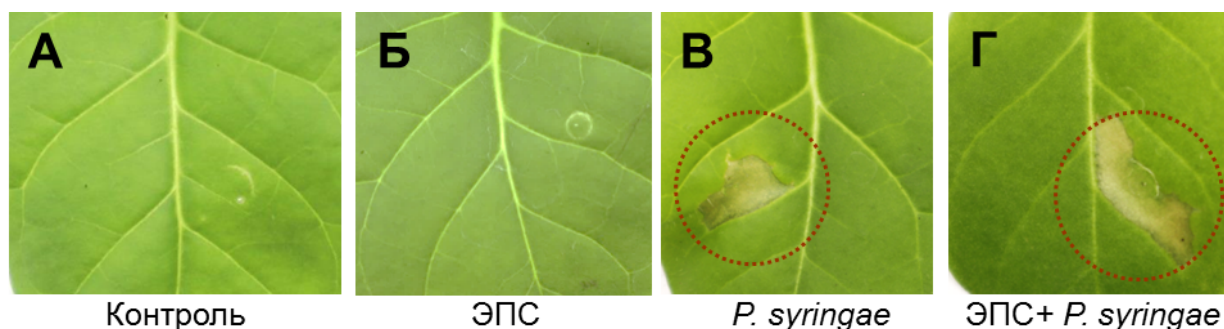


Рис. 12. Влияние ЭПС *Pba* на развитие реакции гиперчувствительности у растений табака. Листья табака инфильтрировали 10 мМ $MgSO_4$ (контроль) (А); 0,05% ЭПС (Б); клетками *Pseudomonas syringae* (В); 0,05% ЭПС и через 12 часов клетками *P. syringae* (Г).

Для оценки влияния ЭПС (и их деацетилированных производных) на ПАМП-индуцируемый фитоиммунитет (количественная устойчивость) мы измеряли уровни H_2O_2 и каталазной активности в листья табака после инфильтрации: 1) воды (контроль); 2) ЭПС *Pba*; 3) деацетилированных ЭПС *Pba*; 4) хитоолигосахаридов (ХО); 5) ЭПС *Pba* и затем 1 мкМ ХО; 6) деацетилированных ЭПС *Pba* и затем 1 мкМ ХО.

Инфильтрация ЭПС *Pba* (нативных и деацетилированных) в листья табака не приводила к увеличению уровня H_2O_2 (Рис. 13 А) и каталазной активности (Рис. 13 Б). Инфильтрация ХО приводила к увеличению содержания H_2O_2 (Рис. 13 А) и к индукции каталазной активности (Рис. 13 Б). Если инфильтрации ХО предшествовала обработка нативными ЭПС, содержание H_2O_2 увеличивалось в гораздо меньшей степени, чем без предварительной обработки ЭПС (Рис. 13 А), а каталазная активность вовсе не индуцировалась по сравнению с контролем, необработанным ХО (Рис. 13 Б).

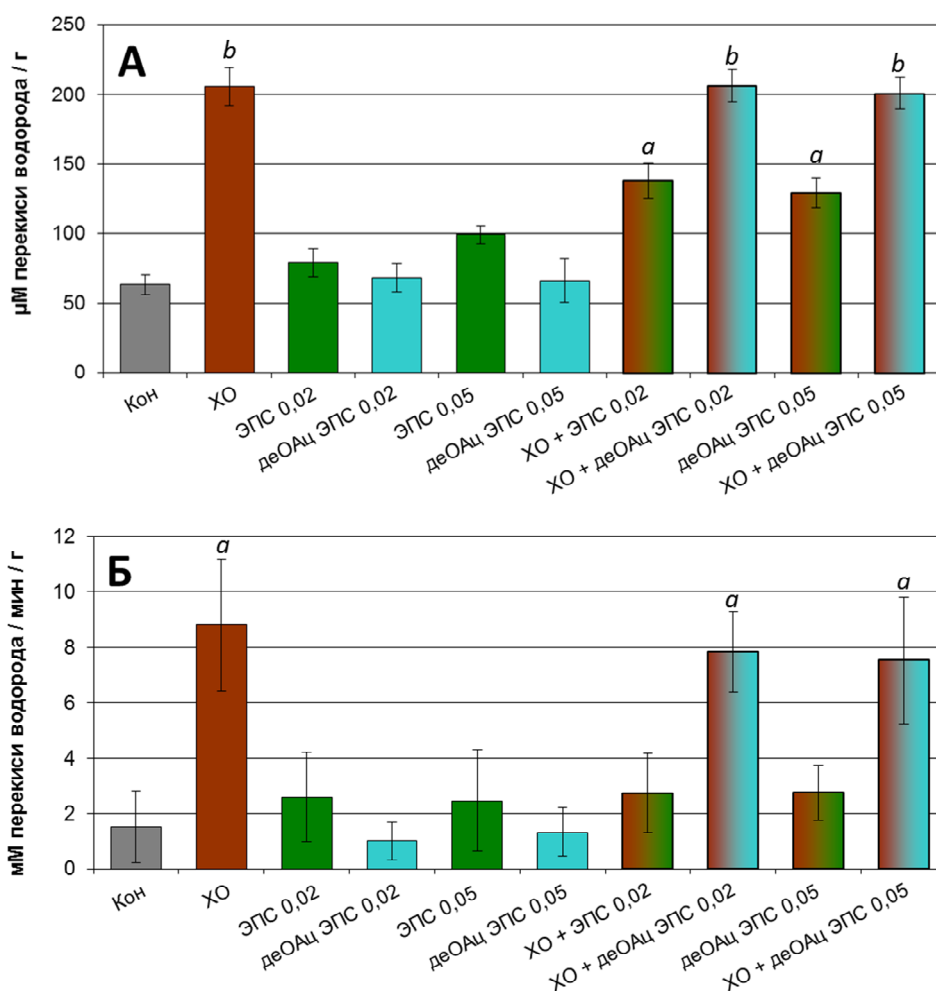


Рис. 13. Влияние ЭПС *Pba* на ПАМП-индуцируемый иммунный ответ растений табака. А – содержание H_2O_2 , Б – каталазная активность в листьях после инфильтрации воды (контроль, серые), 1 мкМ хитоолигосахаридов (ХО, коричневые), 0,02% или 0,05% ЭПС *Pba* (ЭПС 0,02 / ЭПС 0,05, зеленые), 0,02% или 0,05% деацетилированных ЭПС *Pba* (деОАц ЭПС 0,02 / деОАц ЭПС 0,05, бирюзовые), 1 мкМ ХО и

0,02% или 0,05% ЭПС *Pba* (ХО + ЭПС 0,02 / ХО + ЭПС 0,05, коричнево-зеленые), 1 мкМ ХО и 0,02% или 0,05% деацетилированных ЭПС *Pba* (ХО + деОАц ЭПС 0,2 / ХО + ЭПС 0,5, коричнево-бирюзовые). Содержание H_2O_2 и каталазную активность определяли через 6 часов после обработки в пяти биологических повторностях. *a* и *b* указывают на статистически значимые различия (тест Манна-Уитни, $P < 0.05$).

В то же время, если предобработку листьев табака проводили деацетилированными (а не нативными) ЭПС, последующая инфильтрация ХО приводила к увеличению уровней H_2O_2 и каталазной активности в той же степени как в непредобработанных ЭПС (или предобработанных водой) листьях.

Таким образом, нами продемонстрировано, что ЭПС *Pba* обладают иммуносупрессорными свойствами в отношении ПАМП-индуцируемого иммунитета (количественная устойчивость) и обеспечивают снижение уровня АФК в инфицированном растении. Ацетильные группы, входящие в состав ЭПС, вносят значительный вклад в фитоиммуносупрессорные свойства этих полимеров.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное нами исследование позволило заполнить важный пробел в понимании биогенеза бактериальных эмболов – структур, которые являются продуктом взаимодействия *Pba* и растений-хозяев. Для инициации бактериальных эмболов и начальных этапов их развития растение-хозяин «поставляет строительный материал» – специфические фрагменты пектинового полисахарида рамногалактуронана I. Эти фрагменты формируют первичный внеклеточный матрикс бактериальных эмболов, который, однако, постепенно разрушается, и благодаря каким метаболитам сохраняется структурная целостность бактериальных эмболов – базовых компонентов исследуемой растительно-микробной патологической системы, оставалось неизвестным.

Мы предположили, что полимерная сеть в составе вторичного матрикса бактериальных эмболов может состоять из ЭПС, синтезируемых *Pba*. Для детекции и дальнейшей характеристики целевых полимеров мы подобрали условия *in vitro*, в которых пектобактерии продуцируют ЭПС. Оказалось, что пектобактерии не синтезируют эти полимеры в ростовых условиях, и продукция ЭПС *in vitro* индуцируется при голодании клеток. Затем мы получили чистый препарат ЭПС пектобактерий, расшифровали структуру регулярного звена целевых полимеров и показали, что они действительно входят в состав матрикса бактериальных эмболов. При этом мы продемонстрировали, что бактериальные эмболы могут образовываться не только в неспецифичном для пектобактерий растении-хозяине (табак), но и в специфичном хозяине (картофель). Причем принцип образования бактериальных эмболов в специфичном и неспецифичном хозяине, по-видимому, сходный, поскольку в инфицированных растениях картофеля, так же как и в инфицированных растениях табака, накапливаются «затравки» для формирования бактериальных эмболов – специфические фрагменты рамногалактуронана I. В состав вторичного матрикса бактериальных эмболов, формируемых в обоих видах растений, входят ЭПС пектобактерий.

При анализе физических свойств ЭПС пектобактерий мы продемонстрировали, что эти полимеры, действительно, могут вносить вклад в

структурную целостность бактериальных эмболов. ЭПС способствуют увеличению вязкости водных растворов, причем вязкость растворов ЭПС сохраняется даже при интенсивном воздействии сдвигового течения омываемой жидкости. Это свойство ЭПС, по всей видимости, позволяет пектобактериям противостоять периферийному омыванию жидкости, что имеет большую значимость для колонизации водопроводящей системы растения-хозяина. Кроме того, ЭПС пектобактерий способны формировать крупные супрамолекулярные агрегаты. Вяжущие свойства молекул, а также их агрегация являются результатом межмолекулярных взаимодействий, которые, по всей видимости, обеспечивают формирование полимерной сети, необходимой для поддержания структурной целостности бактериальных эмболов.

Кроме того, мы выяснили, что ЭПС *Pba* обеспечивают детоксикацию АФК и предохраняют клетки пектобактерий от действия окислителей. Это свойство имеет важное значение для выживания клеток бактерий в составе бактериального эмбола, поскольку формирование этих структур сопряжено с накоплением АФК в сосудах первичной ксилемы. В дополнение к этому, ЭПС способны снижать уровень АФК в растении-хозяине. Эти полимеры обладают фитоиммуносупрессорными свойствами и подавляют активацию защитных систем при действии экзогенных элиситоров.

Таким образом, проведенное нами исследование демонстрирует, что ЭПС можно рассматривать как фактор вирулентности пектобактерий и один из ключевых участников взаимодействия этих микроорганизмов с растениями.

ВЫВОДЫ

1. Фитопатогенные бактерии *Pectobacterium atrosepticum* способны синтезировать экзополисахариды (ЭПС), структура регулярного звена которых представляет собой разветвленный пентасахарид; остов ЭПС построен из остатков α -галактопиранозы, α -маннопиранозы и α -рамнопиранозы, соединенных 1,2, 1,4 и 1,3 типами связи, соответственно, а боковые цепи, присоединенные к α -маннопиранозильному остатку остова в положении О-3, состоят из ацетилированной по О-2 положению α -галактопиранозы и десяти-углеродного разветвленного моносахарида эрвиниозы, соединенных 1,3-связью.

2. ЭПС *P. atrosepticum* присутствуют в составе экстраклеточного матрикса бактериальных эмболов, образующихся в сосудах первичной ксилемы растений табака и картофеля, инфицированных этим патогеном.

3. ЭПС *P. atrosepticum* увеличивают вязкость водных растворов и формируют надмолекулярные агрегаты.

4. ЭПС *P. atrosepticum* обеспечивают детоксикацию активных форм кислорода и повышают устойчивость клеток к действию окислителей.

5. ЭПС *P. atrosepticum* обладают фитоиммуносупрессорными свойствами, подавляя ПАМП-индуцируемое накопление активных форм кислорода и предотвращая индукцию каталазной активности в тканях растений.

6. Наличие ЭПС в составе матрикса бактериальных эмболов обеспечивает поддержание их структурной целостности и защиту клеток микроорганизмов от иммунных ответов растений-хозяев.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК

1. *Pectobacterium atrosepticum* exopolysaccharides: identification, molecular structure, formation under stress and *in planta* conditions / V. Gorshkov, **B. Islamov**, P. Mikshina, O. Petrova, G. Burygin, E. Sigida, A. Shashkov, A. Daminova, M. Ageeva, B. Idiyatullin, V. Salnikov, Y. Zuev, T. Gorshkova, Y. Gogolev // *Glycobiology*. – 2017. – V. 27. – P. – 1016-1026.

2. The modification of plant cell wall polysaccharides in potato plants during *Pectobacterium atrosepticum*-caused infection. V. Gorshkov, I. Tsers, **B. Islamov**, M. Ageeva, N. Gogoleva, P. Mikshina, O. Parfirova, O. Gogoleva, O. Petrova, T. Gorshkova, Y. Gogolev // *Plants*. – 2021. – V. 10. – P. 1407.

Работы, опубликованные в материалах научных мероприятий

1. **Исламов Б.Р.** Образование экзополисахаридов *Pectobacterium atrosepticum* при формировании системы растение-патоген / Б.Р. Исламов, В.Ю. Горшков, О.Е. Петрова, П.В. Микшина, Г.Л. Бурьгин, А.Г. Даминова, А.С. Шашков, М.В. Агеева, Ю.В. Гоголев // В книге: Фитоиммунитет и клеточная сигнализация у растений. – Казань, Россия, 2016. – С. 73-74.

2. **Исламов Б.Р.** Экстраклеточные полисахариды *Pectobacterium atrosepticum*: идентификация, определение структуры, образование при колонизации растения-хозяина / Б.Р. Исламов, В.Ю. Горшков, О.Е. Петрова, П.В. Микшина, Г.Л. Бурьгин, А.Г. Даминова, А.С. Шашков, М.В. Агеева, Ю.В. Гоголев // Сборник тезисов. VIII Всероссийская конференция молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой». – Саратов, Россия, 2016. – С. 55.

3. **Islamov B.** Structure and functions of extracellular polysaccharides of the phytopathogenic bacterium *Pectobacterium atrosepticum* / B.R. Islamov, V. Gorshkov, O. Petrova, P.V. Mikshina, V. Vorob'ev, M. Ageeva, G. Burygin, Y. V. Gogolev // The Abstract Book of the XVIII congress IS-MPMI 2019 (International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions). – Glasgow, Scotland, 2019. – P. 165.

4. **Islamov B.** Extracellular polysaccharides of the phytopathogenic bacterium *Pectobacterium atrosepticum*: identification, structure, functions / B. Islamov, V.

Gorshkov, O. Petrova, P. Mikshina, V. Vorob'ev, M. Ageeva, G. Burygin, Y. Gogolev // 8th Congress of European Microbiologists FEMS 2019 (Federation of European Microbiological Societies). – Glasgow, Scotland, 2019. – P. 1057.

5. **Исламов Б.Р.** Экзополисахариды фитопатогена *Pectobacterium atrosepticum*: молекулярная структура, локализация *in planta*, роль во взаимодействии с растением-хозяином / Б.Р. Исламов, В.Ю. Горшков, О.Е. Петрова, П.В. Микшина, Г.Л. Бурьгин, В.Н. Воробьев, К.А. Мандрик, Ю.В. Гоголев // Тезисы докладов IX Съезд общества физиологов растений России «Физиология растений – основа создания растений будущего» – Казань, Россия, 2019. – С. 193.

6. **Исламов Б.Р.** Функциональные роли экзополисахаридов пектобактерий в их взаимодействии с растениями / Б.Р. Исламов, В.Ю. Горшков, О.Е. Петрова, П.В. Микшина, Г.Л. Бурьгин, В.Н. Воробьев, К.А. Мандрик, Ю.В. Гоголев // IX Всероссийская конференция молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой» – Саратов, Россия, 2019. – С.58.

7. **Исламов Б.Р.** Модификация полисахаридов растительной клеточной стенки при инфекции, вызываемой фитопатогеном *Pectobacterium atrosepticum* / Б.Р. Исламов // Экобиотех. – 2020. – Т. 3. – С. 213-219.

8. **Исламов Б.Р.** Роль экзополисахаридов пектобактерий в растительно-микробном взаимодействии / Б.Р. Исламов, В.Ю. Горшков, О.Е. Петрова, П.В. Микшина, Г.Л. Бурьгин, А.И. Кадыйров, В.Н. Воробьев, Ю.В. Гоголев // В книге: Клеточная сигнализация: итоги и перспективы. – Казань, Россия, 2021. – С. 40-41.

9. **Исламов Б.Р.** Роль полисахаридов растений и микроорганизмов в формировании бактериальных эмболов в сосудах ксилемы при развитии мягких гнилей / Б.Р. Исламов, П.В. Микшина, О.Е. Петрова, А.И. Кадыйров, В.Н. Воробьев, Т.А. Горшкова, В.Ю. Горшков // Сборник тезисов V Всероссийской конференции «Фундаментальная гликобиология». – Гатчина, Россия, 2021. – С. 7.