

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
СИБИРСКИЙ ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ И БИОХИМИИ РАСТЕНИЙ
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи



Омеличкина Юлия Викторовна

Ответные реакции растений на действие фитопатогена

Clavibacter michiganensis ssp. *sepedonicus*

при совместимых и несовместимых

взаимоотношениях организмов

03.01.05 – физиология и биохимия растений

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Шафикова Татьяна Николаевна

Иркутск — 2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1. Иммуитет растений	12
1.1.1. Паттерн-активируемый иммунитет	13
1.1.2. Эффектор-активируемый иммунитет	18
1.2. «Зигзаг модель» врожденной иммунной системы растений.....	23
1.3. Реакция сверхчувствительности.....	25
1.3.1. Типы клеточной смерти	26
1.3.2. Молекулярные события реакции сверхчувствительности	30
1.3.3. Ферменты сверхчувствительной гибели клеток	38
1.4. Системная приобретенная устойчивость	43
1.5. Участие белков теплового шока в иммунных реакциях растения.....	47
1.6. Возбудитель кольцевой гнили картофеля.....	51
1.7. Способность к формированию биопленок как фактор патогенности возбудителей заболеваний растений	56
1.8. Выводы из обзора литературы.....	59
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	62
2.1. Объекты исследования.....	62
2.2. Заражение суспензионных культур клеток и растений <i>in vitro</i>	64
2.3. Температурная обработка	65
2.4. Определение выживаемости клеток по реакции восстановления ТТХ...	65
2.5. Изучение изменения морфологических параметров клеток растений при действии <i>Cms</i>	66

2.6.	Определение количества пероксида водорода	67
2.7.	Выделение суммарного белка.....	67
2.8.	Электрофорез в полиакриламидном геле.....	68
2.9.	Окраска и обесцвечивание гелей.....	69
2.10.	Вестерн-блоттинг	69
2.11.	Определение молекулярных масс полипептидов	70
2.12.	Использованные антитела.....	70
2.13.	Определение образования биопленок	71
2.14.	Статистическая обработка результатов	71
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....		72
3.1.	Изучение ответных реакций растений <i>in vitro</i> на действие <i>Cms</i> при совместимых и несовместимых взаимоотношениях организмов.....	72
3.1.1.	Ответные реакции картофеля на воздействие <i>Cms</i>	72
3.1.2.	Ответные реакций растений табака при взаимодействии с <i>Cms</i>	73
3.2.	Развитие системной приобретенной устойчивости у растений табака	76
3.3.	Влияние экзометаболитов <i>Cms</i> на развитие ответных реакций у растений табака	79
3.4.	Выживаемость культур клеток растений при взаимодействии с бактериальным фитопатогеном <i>Cms</i> при совместимых и несовместимых взаимоотношениях организмов	83
3.4.1.	Выживаемость культуры клеток табака при взаимодействии с <i>Cms</i>	83
3.4.2.	Выживаемость культуры клеток картофеля при взаимодействии с <i>Cms</i>	87
3.4.3.	Выживаемость культуры клеток <i>Arabidopsis thaliana</i> при взаимодействии с <i>Cms</i>	88

3.5. Морфологические параметры гибели растительных клеток при действии <i>Cms</i>	91
3.6. Генерация пероксида водорода в суспензионных культурах клеток при взаимодействии с <i>Cms</i>	94
3.6.1. Генерация пероксида водорода в культуре клеток табака при взаимодействии с <i>Cms</i>	94
3.6.2. Генерация пероксида водорода в культуре клеток картофеля при взаимодействии с <i>Cms</i>	97
3.7. Защитные функций белков теплового шока при заражении растительных культур фитопатогеном <i>Cms</i>	102
3.7.1. Влияния теплового шока на индукцию БТШ и жизнеспособность клеток культуры табака	103
3.7.2. Участие БТШ в защитном ответе табака на действие патогена <i>Cms</i>	105
3.7.3. Участие БТШ в защитных реакциях картофеля при заражении <i>Cms</i>	111
3.8. Влияние устойчивости растений на способность фитопатогена <i>Cms</i> формировать биопленки	113
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	120
ВЫВОДЫ	125
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	127

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФК – активные формы кислорода

ЖАК – жасмоновая кислота

ПКС – программируемая клеточная смерть

СК – салициловая кислота

СПУ – системная приобретенная устойчивость

СЧ – реакция сверхчувствительности

АОХ (*alternative oxidase*) – альтернативная оксидаза

Cms – *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*

DAMP (*damage-associated molecular patterns*) – молекулярные паттерны, связанные с повреждением

ETI (*effector-triggered immunity*) – эффектор-активируемый иммунитет

HSP (*heat shock proteins*) – белки теплового шока

ISR (*induced systemic resistance*) – индуцированная системная устойчивость

LRR (*leucine-rich repeats*) – лейцин-обогащенные повторы

MAMP (*microbial-associated molecular patterns*) – микробные молекулярные паттерны

NB-LRR (*nucleotide-binding leucine-rich repeat*) – нуклеотид-связывающие белки, содержащие лейцин-обогащенные повторы

NLR (*Nod-like receptor*) – Nod-подобный рецептор

PAMP (*pathogen-associated molecular patterns*) – молекулярные паттерны патогенов

PRR (*pattern recognition receptors*) – паттерн-распознающие рецепторы

PTI (*pattern-triggered immunity*) – паттерн-активируемый иммунитет

RLK (*receptor-like kinases*) – рецептор-подобные киназы

RLP (*receptor-like proteins*) – рецептор-подобные белки

SAR (*systemic acquired resistance*) – системная приобретенная устойчивость

TLR (*toll-like receptors*) – Toll-подобные рецепторы

TTSS (*type III secretion system*) – система секреции 3-го типа

VPE (*vacuolar processing enzyme*) – вакуолярная протеаза

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. В природных местах обитания растения вынуждены сосуществовать с огромным разнообразием микроорганизмов, многие из которых являются патогенами. Инфекционные заболевания сельскохозяйственных растений, в том числе и кольцевая гниль картофеля, которую вызывает грамположительная бактерия *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (Cms), приводят к значительным потерям урожая (Eichenlaub, Gartemann, 2011). Несмотря на принимаемые меры борьбы с фитопатогенами, проблема причиняемого ими вреда продолжает оставаться злободневной. Поиск методов борьбы с фитопатогенами, которые бы отвечали современным требованиям экологической безопасности, невозможен без изучения физиолого-биохимических основ взаимодействий растения и патогена, а также выявления ключевых звеньев, определяющих исход взаимоотношения партнеров. Реализация совместимых или несовместимых взаимоотношений в фитопатосистеме определяется сочетанием факторов вирулентности патогена и механизмов иммунитета растения. Совместимый тип взаимоотношений характеризуется инфицированием восприимчивого растения-хозяина вирулентным патогеном, что приводит к развитию заболевания. В случае если патоген встречается с растением-нехозяином (неспецифическая устойчивость) или устойчивым растением-хозяином (культивар-специфическая устойчивость) происходит реализация несовместимого типа взаимоотношений организмов (Katagiri, Tsuda, 2010).

Согласно современным представлениям, защита растительного организма от воздействия патогена определяется функционированием многоуровневой иммунной системы с участием различных структур и механизмов врожденного иммунитета. Первый уровень фитоиммунитета – паттерн-активируемый иммунитет – является неспецифическим и

активируется при распознавании растением молекулярных паттернов, присущих всем без исключения микроорганизмам (Zhang, Zhou, 2010). Вирулентные штаммы патогенов способны подавлять защитные реакции неспецифического иммунитета, приводя в действие различные эффекторы, факторы вирулентности для восприимчивого хозяина (Vance et al., 2009). Детекция эффекторных молекул патогена внутриклеточными рецепторами растения запускает второй уровень иммунитета – эффектор-активируемый иммунитет. Эффектор-активируемый иммунитет обеспечивает специфическую устойчивость (Jones, Dangl, 2006). Активация реакций специфического иммунитета на уровне клетки определяется следующими событиями: перераспределением ионов кальция в клетке, образованием активных форм кислорода и азота, изменением редокс-статуса антиоксидантов, остановкой движения цитоплазмы, отхождением от клеточной стенки и конденсацией протопласта с сохранением целостности плазматической мембраны. Описанные события иллюстрируют развитие процесса программируемой клеточной гибели, фенотипически проявляющейся как реакция сверхчувствительности (СЧ) – локальный некроз в месте инфицирования (Mur et al., 2008).

Развитие упомянутых выше реакций эффектор-активируемого иммунитета растений определяется доставкой факторов вирулентности патогена непосредственно в клетку растения. Для грамотрицательных фитопатогенов система доставки эффекторов в клетку растения – система секреции третьего типа – активно изучается (Lee et al., 2013; Tosi et al., 2013). В то же время для грамположительных фитопатогенов этот механизм остается неизвестным. Предполагается, что основные факторы патогенности у грамположительных бактерий присутствуют в экзометаболическом комплексе. В том числе это относится к изучаемому бактериальному фитопатогену *Cms*.

К наименее изученным, но немаловажным факторам вирулентности фитопатогенов относится их способность формировать биопленки, что определяет колонизацию растения и развитие симптомов заболевания. Так это происходит и при инфицировании картофеля возбудителем кольцевой гнили (Вае et al., 2014). Влияние факторов резистентности растения на процесс образования фитопатогенами биопленок практически не изучено. Также не изучены механизмы устойчивости растений к патогенам, в реализации которых задействованы стрессовые белки, в том числе белки теплового шока (БТШ), играющие важную роль не только при тепловом шоке, но и при других видах стресса.

Все вышесказанное определяет актуальность и обосновывает выбор цели работы, которая обозначена следующим образом.

Цель работы. Изучить развитие ответных реакций растений на действие фитопатогена *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* на уровне клетки и целого растения при совместимых и несовместимых взаимоотношениях организмов.

Задачи:

1. Изучить развитие ответных реакций культур клеток табака на действие *Cms*: изменение морфологии, жизнеспособности клеток и уровня внеклеточного пероксида водорода;
2. Определить развитие локальных (реакция сверхчувствительности) и системных (системная приобретенная устойчивость) реакций на уровне целого растения в системе табак - *Cms*;
3. Выявить способность экзометаболитов *Cms* индуцировать развитие защитных реакций растений табака на уровне клетки и целого растения;
4. Изучить на клеточном уровне развитие защитных реакций растения в системе: картофель - *Cms*;

5. Определить участие БТШ в развитии защитных реакций растений табака и картофеля на действие *Sms*;

6. Установить влияние растений табака и картофеля на способность фитопатогена *Sms* и нетипичного для растений патогена *E. coli* формировать биопленки.

Научная новизна. Впервые установлено, что при инфицировании табака бактериями *Sms* развитие реакции сверхчувствительности (гибели клеток по типу ПКС) происходит на двух уровнях организации растительного организма – культуры клеток и целого растения. Впервые выявлено, что СЧ проявляется не только на листьях, но и на кончиках корней табака. Отмечено, что СЧ реакция на корнях сопровождается интенсивным образованием дополнительных боковых корешков.

Установлено, что развитие реакций эффектор-активируемого иммунитета, такие как реакция сверхчувствительности, системная приобретенная устойчивость, двухфазное повышение уровня пероксида водорода, у растений табака вызывают как бактерии *Sms*, так и их экзометаболиты.

Показано двухфазное повышение уровня пероксида водорода при действии *Sms* на клетки растения-хозяина устойчивого сорта, что свидетельствует о развитии реакций эффектор-активируемого иммунитета в данной фитопатосистеме.

Впервые установлено, что формирование пленок у фитопатогена *Sms* определяется видовой и сортовой устойчивостью растения к данному патогену, в то время как, биопленкообразование у патогена человека и животных *E. coli* не зависит от резистентности растений.

Выявлено, что БТШ модулируют развитие реакций специфического эффектор-активируемого иммунитета растений в условиях искусственного повышения экспрессии белков теплового шока в модельной системе.

Теоретическая и практическая значимость работы. Изучение ответных реакций растений на патоген на примере двух фитопатосистем – совместимой и несовместимой будет способствовать более полному пониманию процессов многоуровневого фитоиммунитета, механизмов системной устойчивости и иммунной памяти, которая реализуется у следующих поколений растений. Наряду с чисто теоретическим, эти исследования имеют практическое значение, поскольку позволят обосновать новые экологически безопасные подходы защиты растений, заключающиеся в активации собственных иммунных сил растительного организма против патогенов. Применение иммунологических методов позволит отказаться от существующих в настоящее время средств борьбы с патогенами, зачастую оказывающих пагубное действие как на почвенные микробиоценозы, так и на здоровье человека.

Апробация работы. Результаты исследования по теме диссертации были представлены на II Всероссийской научно-практической конференции «Развитие физико-химической биологии и биотехнологии на современном этапе» (Иркутск, 2008); Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы Права, Экономики и Управления» (Иркутск, 2008, 2009, 2010); Всероссийской научной конференции «Устойчивость организмов к неблагоприятным факторам внешней среды» (Иркутск, 2009); Общероссийской электронной научной конференции "Актуальные вопросы современной науки и образования" (Красноярск, 2010), Международном симпозиуме «Биохимия – основа наук о жизни», посвященном 150-летию образования кафедры биохимии Казанского университета (Казань, 2013); Всероссийской научной конференции с международным участием «Экосистемы озера Байкал и Восточной Азии» (Иркутск, 2014).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 24 работы, в том числе 5 статей в журналах из списка ВАК РФ.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Иммунитет растений

Микроорганизму при контакте растением необходимо преодолеть факторы конститутивной устойчивости, такие, как мощный восковый слой, жесткая клеточная стенка, а также защитные соединения, в числе которых кутикулярные липиды, антимикробные ферменты и вторичные метаболиты (Bednarek, 2012). Следующим защитным барьером на пути патогена является врожденная иммунная система растения, для преодоления которой патогену необходимо либо избежать распознавания растением, либо подавить активацию защитных ответов хозяина. Для распознавания патогенов и их метаболитов растения используют консервативный механизм, представленный также и у животных организмов – мембранные рецепторы. Рецепторы детектируют специфические молекулярные лиганды, которые консервативны и характерны для патогенов, но несвойственны и чужеродны для растения. Эти молекулы, впервые обозначенные в работе С. Janeway, получили название патогенных молекулярных паттернов (pathogen-associated molecular patterns, PAMP) (Janeway, 1989). В действительности же PAMP присущи всем микроорганизмам независимо от того, патогенны они или нет. В этой связи, позднее термин PAMP был заменен на MAMP, microbial-associated molecular patterns (Staal, Dixelius, 2007). Растения также способны детектировать фрагменты, образуемые вследствие повреждения микробными литическими ферментами таких растительных структур, как кутикула или клеточная стенка. Такие специфические продукты были названы молекулярными паттернами, связанными с повреждением (damage-associated molecular patterns DAMPs) (Lotze et al., 2007). Детекция молекулярных паттернов – MAMP и DAMP – осуществляется рецепторами, названными паттерн-распознающими рецепторами (pattern recognition receptors, PRRs), которые в результате активации специфическими лигандами запускают

иммунный сигналинг. Результатом этого процесса является активация ряда защитных реакций, приводящих к предотвращению развития инфекции. Данный иммунный механизм получил название паттерн-активируемого иммунитета (pattern-triggered immunity, PTI) (Jones, Dangl, 2006) и является первым уровнем врожденного иммунитета растений. Вирулентные штаммы патогенов способны подавлять защитные реакции, определяемые паттерн-распознающими рецепторами, приводя в действие различные эффекторы, факторы вирулентности для восприимчивого хозяина (Vance et al., 2009). При детекции эффекторов в растительном организме активируется второй уровень врожденного иммунитета, так называемый эффектор-активируемый иммунитет (effector-triggered immunity, ETI) (Jones, Dangl, 2006).

1.1.1. Паттерн-активируемый иммунитет

Микробные паттерны, или МАР, являются консервативными молекулярными структурами, которые характерны практически для всех классов микроорганизмов, независимо от их патогенности. Не только фитопатогены, но и симбионты, и эндофиты имеют такие консервативные паттерны, благодаря которым первоначально микроорганизмы распознаются как «чужие», и у растения включается неспецифический иммунный ответ (Jones, Dangl, 2006; Zhang, Zhou, 2010). Экспериментально установлено, что воздействие условно-патогенных и патогенных для человека энтеробактерий на растение вызывает у последнего активацию неспецифического иммунитета (Омеличкина и др., 2010; Маркова и др., 2013). Эти данные подтверждают тот факт, что и нетипичные для растений микроорганизмы, возбудители заболеваний человека и животных, имеют МАР, которые распознаются растением. Для каждой группы микроорганизмов характерны свои МАР, например, для бактерий – это флагеллин и фактор элонгации, для грибов – фрагменты хитина, для вирусов – фактор вирулентности NSP

(nuclear shuttle protein) (Dow et al., 2000; Nicaise et al., 2009; Sakamoto et al., 2012; Hayafune et al., 2014).

К рецепторам PRR, специфически распознающим МАРР, относят рецептор-подобные киназы (receptor-like kinases, RLK) и рецептор-подобные белки (receptor-like proteins, RLP) (Nicaise et al., 2009). RLK являются трансмембранными рецепторами, которые локализуются в плазматической мембране и содержат: лиганд-связывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный серин/треонин киназный домен. Характерной чертой RLK является наличие N-терминального домена лейцин-обогащенных повторов (LRRs), вовлеченных в восприятие бактериальных и вирусных МАРР (Sakamoto et al., 2012). Грибные МАРР воспринимаются PRR с лизиновым доменом (LysM) (Miya et al., 2007). Трансмембранный участок представлен α -спиральным участком, который пронизывает мембрану только один раз. Цитоплазматический домен, сформированный C-терминальным участком, содержит киназный фрагмент, в котором происходит автофосфорилирование остатков серина и треонина при образовании димерного комплекса в результате активации рецептора лигандом. Растительные RLK структурно родственны животным рецепторным тирозиновым киназам (receptor-tyrosine kinases, RTKs) (Shiu, Bleecker, 2001).

Рецепторы RLP содержат только внеклеточный и мембранный домены. Так как у них отсутствует внутриклеточный домен активации, им необходимо взаимодействие с адаптерными молекулами для передачи сигнала. RLP напоминают по структуре Toll-подобные рецепторы (toll-like receptors, TLR), которые участвуют в узнавании МАРР в клетках животных (Kopp, Medzhitov, 2003). TLR животных с помощью адаптерных белков активируют киназы IRAK (interleukin-1 receptor-associated kinases) или RIP (receptor-interacting protein), что приводит, в конечном счете, к запуску экспрессии антимикробных защитных молекул (Kawai, Akira, 2010). Эти киназы принадлежат к тому же классу non-RD киназ, что и киназы растений,

и они связаны с врожденными иммунными реакциями у представителей обоих царств (Dardick, Ronald, 2006).

На данный момент известно большое количество микробных молекулярных паттернов и соответствующих им рецепторов, но хорошо охарактеризовано лишь несколько лиганд-рецепторных пар. Исследование паттерн-распознающих рецепторов началось с открытия белка Xa21, который был обнаружен у риса (*Oryza sativa* L.), и соответствующего ему молекулярного паттерна бактериального фитопатогена *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo). Этот рецептор специфически связывает Ax21, сульфатированный 17-аминокислотный пептид N-участка белка, секретлируемого данным патогеном (Lee et al., 2009). Известной парой является рецептор FLS2 (flagellin-sensitive 2), обнаруженный у *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., томата (*Solanum lycopersicum* L.) и табака (*Nicotiana tabacum* L.), и взаимодействующий с ним 22-х аминокислотный пептид N-концевого участка флагеллина – flg22 (Nicaise et al., 2009). В качестве еще одной наиболее изученной пары PRR-МAMP необходимо отметить рецептор EFR (EF-Tu receptor) и фактор элонгации бактерий EF-Tu. Эпитопом данного молекулярного паттерна являются первые 18 аминокислот N-конца (elf18) (Kunze et al., 2004).

Существенную роль в восприятии хитина – компонента клеточной стенки грибов – играют рецепторные киназы, содержащие лизиновый мотив (lysine motif receptor kinases, LysM-RKs). Примером таких киназ, участвующих в восприятии грибных лигандов, являются рецепторы *Arabidopsis* CERK1 (chitin elicitor receptor kinase 1) с тремя внеклеточными LysM доменами (Miya et al., 2007), LYP4 и LYP6 риса (Liu et al., 2012).

Помимо МAMP, сигналом об атаке патогена могут служить DAMP – молекулярные паттерны, связанные с повреждением структур клетки. К ним относятся олигогалактуронаты, образующиеся в результате действия пектолитических ферментов фитопатогенов на пектины клеточной стенки

растения. Разрушение микробными ферментами полимеров клеточной стенки растения происходит с образованием олигомеров с определенной константной структурой (Forrest, Lyon, 1990). Восприятие DAMP осуществляется семейством рецепторов, которые являются мембранными рецепторными киназами и взаимодействуют с клеточной стенкой растения – WAK (wall associated kinases) (Anderson et al., 2001). Показано, что киназы этого семейства определяют целостность олигалактуронатом растительной клеточной стенки и способны активировать сигнальные каскады и транскрипцию генов устойчивости (Brutus et al., 2010).

Известно, что связывание рецептора с лигандом вызывает изменение конформации рецепторной молекулы, что способствует повышению сродства рецепторных молекул друг к другу (Schulze et al., 2010). Поскольку молекулы рецепторных киназ могут латерально диффундировать по мембране, они достаточно быстро и легко образуют димерные комплексы. В некоторых случаях при активации рецепторных киназ образуются комплексы с корецептором. За счет сближения двух рецепторов активируются киназные центры, и рецепторные молекулы начинают фосфорилировать друг друга по остаткам серина и треонина в области киназного центра. В результате фосфорилирования формируется связующая поверхность – платформа, которая служит для взаимодействия со следующими компонентами сигнальной цепи. Так, при взаимодействии flg22:FLS2 киназный домен рецептора FLS2 быстро фосфорилируется при стимуляции пептидом flg22 и фосфорилированный FLS2 незамедлительно димеризуется с киназой BAK1 (brassinosteroid insensitive 1 (BRI1)-associated kinase), а затем этот комплекс взаимодействует с киназой BIK1 (botrytis-induced kinase 1) (Schulze et al., 2010). Необходимо отметить, что киназа BAK1 участвует в восприятии сигналов и регуляции многих других PRR и играет важную роль в регуляции иммунного ответа растения. Важную функцию BAK1 подтверждает тот факт, что зачастую эта киназа служит мишенью для эффекторов некоторых

патогенов, например AvrPto и AvrPtoB (Shan et al., 2008). При ингибировании ВАК1 этими эффекторами подавляется паттерн-активируемый иммунитет. Взаимное трансфосфорилирование киназных доменов ВІК1 и FLS2/ВАК1, которое осуществляется в течение 30-60 с после восприятия сигнала, приводит к конформационным изменениям и, в конечном счете, фосфорилированная ВІК1 высвобождается для активации последующих сигнальных компонентов (Belkhadir et al., 2012).

У *Arabidopsis* высвобожденная ВІК1 активирует два синхронных каскада активации митоген-активируемых протеинкиназ, которые содержат МКК4/МКК5-МРК3/ МРК6 и МЕКК1/МКК1/МКК2-МРК4 (Ren et al., 2008). Данные каскады приводят к активации транскрипционных факторов семейства WRKY (Pandey, Somssich, 2009). Белки семейства WRKY имеют длину приблизительно 60 аминокислот и консервативный регион WRKYGQK с уникальным доменом цинкового пальца с остатками цистеина и гистидина. Наличие ДНК-связывающего домена позволяет этим транс-факторам WRKYs взаимодействовать с *cis*-элементами W-бокса (TTGACC/Т мотив), присутствующего в промоторах генов защитных реакций (Navarro et al., 2004), и активировать экспрессию эти генов (Ishihama, Yoshioka, 2012). Транскрипционные факторы, находящиеся под контролем генов семейства *wrky*, выявлены у многих растений. Они причастны к формированию реакций, обеспечивающих устойчивость к биотическим (Dong et al., 2003) и абиотическим стрессорам, в частности, к действию низких температур, обезвоживанию (Wei et al., 2008; Таланова и др., 2009).

Трансдукция сигнала приводит к следующим событиям: изменению концентрации ионов кальция, продукции активных форм кислорода (АФК) и азота, экспрессии защитных генов и продукции антимикробных молекул, таких как фитоалексины. РТІ также включает биосинтез салициловой кислоты (СК), жасмоновой кислоты (ЖАК) и этилена (Tsuda et al., 2008).

Необходимо отметить, что механизм действия первого неспецифического уровня врожденного иммунитета объясняет развитие у растений ответных реакций на присутствие симбионтов и эндофитов, поскольку этим микроорганизмам также присущи микробные молекулярные паттерны МAMP.

1.1.2. Эффектор-активируемый иммунитет

Вторым уровнем защиты растений является специфический эффектор-индуцируемый иммунитет (ETI), который обусловлен взаимодействием рецепторных белков (продукты *R*-генов растения) и эффекторов (продукты *Avr*-генов патогена) и соответствует классической теории «ген-на-ген взаимодействия». В результате *R/Avr*-взаимодействия происходит индукция реакции сверхчувствительности, что принципиально отличает развитие защитных реакций при ETI от реакций при PTI (Jones, Dangl, 2006; Katagiri, Tsuda, 2010).

В процессе эволюции специализированные патогены для подавления паттерн-активируемого иммунитета растения-хозяина приобрели способность секретировать эффекторы и доставлять их непосредственно в клетку. Механизмы транслокации эффекторов различных типов патогенов в клетки эукариот подробно обсуждаются в ряде обзоров (Tseng et al., 2009; Fraiture, Brunner, 2014; Setti et al., 2014). В настоящее время данный способ транспортировки эффекторных белков наиболее изучен у грамотрицательных бактерий, использующих систему секреции 3-го типа (TTSS, type III secretion system) (Lee et al., 2013; Lohou et al., 2013; Tosi et al., 2013). Система секреции 3-го типа – система транслокации эффекторов (как патогенов животных, так и растений) в клетку, действующая по принципу «молекулярного шприца» (Chatterjee et al., 2013; Burkinshaw, Strynadka, 2014). Фитоплазмы для доставки эффекторных белков в клетки используют Sec-зависимый механизм транслокации (Bai et al., 2008; Beckwith, 2013). Что касается фитопатогенных

грибов и оомицетов, то они используют для ввода эффекторов транспортные системы растительной клетки (Rafiqi et al., 2010; Petre, Kamoun, 2014). Для грамположительных бактериальных возбудителей заболеваний животных показано присутствие эффекторов, формирующих поры в мембране клетки хозяина (Stuart et al., 2013; Rajamuthiah, Mylonakis, 2014). Также для грамположительных бактерий показано присутствие секретируемых сериновых протеиназ, как например у *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus* (Шафикова и др., 2009). У данного патогена было обнаружено наличие 11 гомологов гена сериновой протеиназы (Bentley et al., 2008). Мутация в гене *chp-7* снижала проявление симптомов заболевания у картофеля и подавляла способность патогена индуцировать развитие реакции сверхчувствительности у растений табака (Gartemann, Eichenlaub, 2001; Nissinen et al., 2009). У *C. michiganensis* ssp. *michiganensis* обнаружено 28 сериновых протеиназ и показано, что мутанты, несущие мутацию, например, гена *chpG*, не способны вызывать заболевания томата, а также индуцировать развитие реакции СЧ у *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana benthamiana* и *Mirabilis jalapa* (Załuga et al., 2014). Это позволяет предположить, что сериновые протеазы деградируют либо паттерн-распознающие рецепторы, либо антимикробные соединения, и что регуляция ETI этими белками достигается увеличением количества членов семейства (Collmer et al., 2009). Также примечательно, что *C. michiganensis* ssp. *michiganensis* и *L. xyli* ssp. *xyli* кодируют томатиназу и дельта-десатуразу жирных кислот, соответственно. Томатиназа может приводить к образованию продуктов, подавляющих защитные реакции при разрушении сапонина томатина (Bouarab et al., 2002), а дельта-десатураза жирных кислот может образовывать абсцизовую кислоту, что также регулирует защитные реакции растений (Monteiro-Vitorello et al., 2004). Оба этих белка являются потенциальными индукторами образования так называемых малых эффекторных молекул – молекул, способных регулировать активность транскрипционных факторов, и

соответственно изменять интенсивность защитного ответа клетки (Collmer et al., 2009).

Эффекторы одного патогена многочисленны и, вероятно, взаимозаменяемы. Мишенью действия эффекторов чаще всего являются растительные киназы, участвующие в восприятии молекулярных паттернов или передаче сигнала. Так, у *Pseudomonas syringae* обнаружено наличие двух эффекторов AvrPto и AvrPtoB, мишенью каждого из которых является комплекс FLS2–BAK1, действие которого описано выше (Zhang et al., 2007). Экспериментально показано, что действие эффекторов может быть направлено на рецептор-подобные киназы, содержащие лизиновый мотив (LysM-RK). Так, две киназы растений томата – Bti-9 и SlLyc1 являются мишенями вирулентности эффектора AvrPtoB (Zeng et al., 2012).

Эффекторы (Avr-белки) распознаются рецепторами (R-белками), которые представляют собой нуклеотид-связывающие внутриклеточные белки, содержащие лейцин-обогащенные повторы (NB-LRR, nucleotide-binding leucine-rich repeat) (Jones, Dangl, 2006). Их структура схожа со структурой Nod-подобных рецепторов млекопитающих (Nod-like receptors, NLRs) (Lukasik, Takken, 2009), выполняющих функции распознавания микробных молекулярных паттернов. Оба типа рецепторов, растительный и животный, представлены внутриклеточными белками, содержащими центральный нуклеотид-связывающий домен, вовлеченный в активацию и мультимеризацию, а также LRR домен (Eitas, Dangl, 2010). Группой ученых во главе с Y. Kadota (2010) было показано, что R-белки млекопитающих NLRs и растений NB-LRRs не только имеют структурную схожесть, но и выполняют аналогичные функции. Кроме того, было установлено, что стабильность данных рецепторов, как у растений, так и у животных регулируется шаперонным комплексом, содержащим Hsp90 (heat shock protein 90) и SGT1 (suppressor of G-two allele of Skp1) (Kadota et al., 2010). Как NB-LRR у растений, так и NLR у животных классифицируются в

соответствии с архитектурой N-концевого домена. Описаны два главных класса цитоплазматических рецепторов NB-LRR: CC-NB-LRR содержит супер-спирализованный мотив (coiled-coil, CC), а TIR-NB-LRR несет N-концевую гомологию с внутриклеточным TIR-доменом TLR (Eitas, Dangl, 2010). Гомология домена TIR у белков-рецепторов растений компонентам сигнальных путей Toll у *Drosophila* и IL-1R (рецептор интерлейкина-1) у млекопитающих позволяет предполагать универсальность некоторых механизмов и путей передачи иммунных сигналов для всех живых организмов. Это еще один из ряда доказательных фактов существования гомологичных структур и механизмов у животных и растений, говорящих о консервативности и значимости этих процессов в иммунитете всех организмов (Katagiri, Tsuda, 2010).

У растений узнавание эффекторов может осуществляться непосредственным его связыванием с рецептором NB-LRR или опосредованно, через белок-адаптер. Такое не прямое узнавание объясняет «сторожевая» гипотеза (Guard hypothesis), в соответствии с которой рецепторы NB-LRR ассоциированы с белками-адаптерами, являющимися мишенями для микробных эффекторов. Взаимодействие эффектора с белком-адаптером модифицирует последний, в результате он распознается R-белком, что в свою очередь приводит к активации защитных реакций ETI (Dangl, Jones, 2001). У *Arabidopsis* была изучена система активации ETI, которая подтвердила сторожевую гипотезу. Эффекторы AvrRpt2, AvrRpm1 и AvrB, продукты соответствующих Avr-генов бактерий *P. syringae* pv. *tomato* и *P. syringae* pv. *maculicola*, модифицируют белок-мишень RIN4 (RPM1-interacting protein 4) *Arabidopsis*. AvrRpm1 и AvrB модифицируют RIN4 путем фосфорилирования, а AvrRpt2 посредством его протеолиза. Конформация белка RIN4 проверяется белками-рецепторами RPS2 (resistance to *Pseudomonas syringae* 2) и RPM1 (resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* 1) – продуктами соответствующих R-генов. Таким образом,

фосфорилирование и протеолиз белков-адапторов определяет узнавание их рецепторами и активирует, соответственно, RPM1- и RPS2-зависимый иммунитет ETI (Wilton et al., 2010).

В рамках «сторожевой» гипотезы возможен и другой сценарий, так называемая «обманная модель» (Decoy model) – белок-посредник является не мишенью эффектора патогена, а лишь его структурным аналогом, конкурирующим за связывание с эффектором (van der Hoorn, Kamoun, 2008). Эта ситуация иллюстрируется белком Prf, внутриклеточным рецептором растений томата типа NB-LRR, который образует комплекс с белком-посредником киназой Pto. Pto киназа имеет структурную аналогию с киназными доменами FLS2 и CERK1, которые являются мишенями AvrPto и AvrPtoB (Gutierrez et al., 2010).

Кроме того, существует еще одна модель взаимодействия эффектора со специфическими рецепторами, активирующими ETI – «модель приманки» (Bait-and-switch model). NB-LRR могут связывать эффекторы только после того, как они образуют комплекс с белком-посредником. При этом может резко возрастать сродство комплекса растительный белок-посредник/эффектор к R-белку (Collier, Moffett, 2009).

Механизмы дальнейшей передачи сигнала, воспринятые рецепторами NB-LRR, до конца не изучены, но предлагается следующая модель трансдукции сигнала. Активированные рецепторы NB-LRR перемещаются в ядро и непосредственно взаимодействуют с факторами транскрипции для запуска экспрессии защитных генов. Установлено, что рецепторные белки NB-LRR типа, такие, как N-белок табака, белок MLA10 ячменя (*Hordeum vulgare L.*) и белок RPS4 *A. thaliana*, синтезируются в цитоплазме клетки, но для их функционирования и активации защитных генов растения необходима их аккумуляция в ядре (Wirthmueller et al., 2007; Bai et al., 2012).

Следующие за активацией рецепторов NB-LRR реакции эффектор-активируемого иммунитета частично совпадают с реакциями

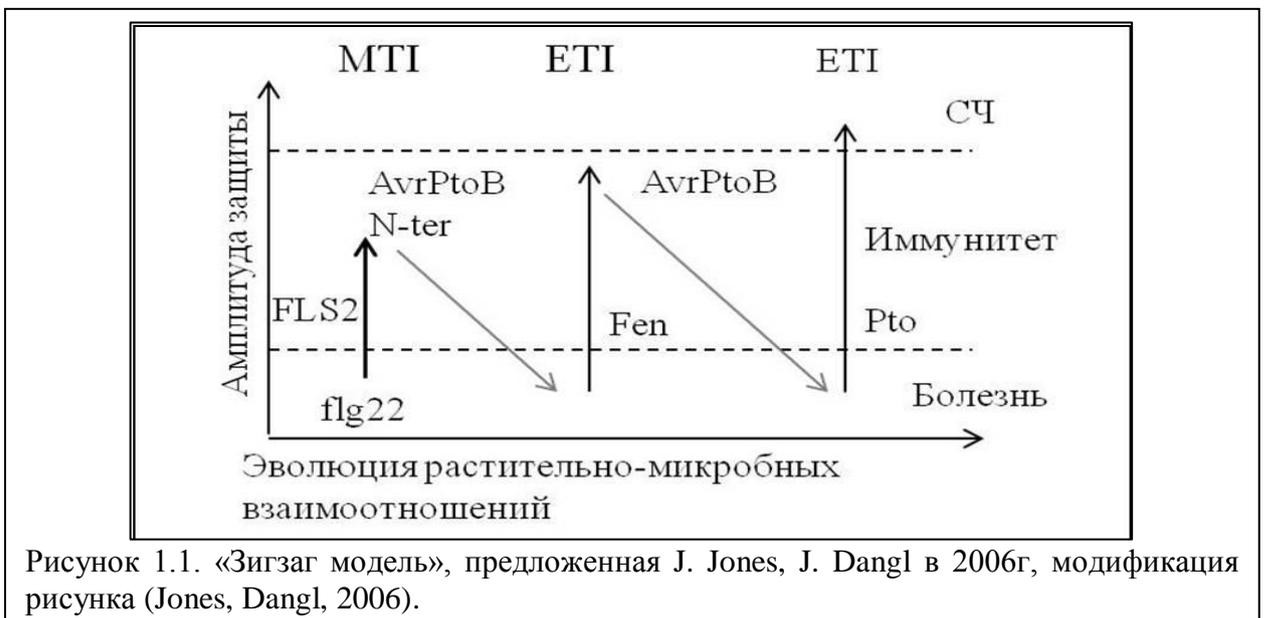
неспецифического иммунитета, включая активацию последующего MAPK каскада и активацию факторов транскрипции WRKY. Дальнейшие молекулярные события, такие, как изменение ионных потоков, накопление АФК, оксида азота, активация транскрипции ряда *PR*-генов для биосинтеза салициловой или жасмоновой кислот, а также этилена, приводят к запуску реакции сверхчувствительности и развитию системной устойчивости (Mur et al., 2008). Необходимо отметить, что интенсивность аналогичных молекулярных событий при РТИ и ЕТИ значительно различаются. Для эффектор-активируемого иммунитета характерны количественно более интенсивные защитные реакции, что, по мнению некоторых исследователей, свидетельствует о том, что количественные различия более существенны для индукции реакции сверхчувствительности, чем качественные (Jones, Dangl, 2006).

1.2. «Зигзаг модель» врожденной иммунной системы растений

«Зигзаг модель», предложенная J. Jones и J. Dangl в 2006 году, отражает постоянный процесс совершенствования стратегий нападения патогена и механизмов иммунного ответа растения как результат эволюционной адаптации в ходе растительно-микробных взаимоотношений (Рис. 1.1.). Модель была предложена для иллюстрации эволюции взаимоотношений в фитопатосистеме *P. syringae* – растение томата. Восприятие бактериального молекулярного паттерна (в данном случае, flg22) осуществляется паттерн-распознающим рецептором (FLS2), что сопровождается его взаимодействием с киназой ВАК1, и приводит к развитию неспецифического паттерн-активируемого иммунитета (РТИ). В ходе совместной эволюции фитопатоген приобретает способность секретировать в растительную клетку эффекторные молекулы (в случае *P. syringae* это – AvrPtoB). Важная роль в этом процессе принадлежит системе секреции III, которая обеспечивает доставку эффекторов непосредственно в цитоплазму, минуя клеточную стенку и

плазмалемму. Можно предположить, что появление у патогенов такой системы обусловлено необходимостью транспортировки эффекторов непосредственно в клетку для подавления паттерн-активируемого иммунитета.

Как уже упоминалось выше, мишенью эффектора AvrPtoB является комплекс FLS2–BAK1, связывание с которым приводит к подавлению паттерн-активируемого иммунитета и способствует развитию заболевания. В ходе дальнейшей совместной эволюции необходимость выжить привела к появлению у растений системы детекции эффекторов. Появление у растений *R*-генов, продукты которых способны распознать эффектор и активировать защитные реакции, приводит к появлению второго – специфического уровня иммунитета. Устойчивые растения томата, обладающие продуктом *R*-генов (киназой Prf), распознают бактериальный эффектор с помощью промежуточного участника киназы Fen и индуцируют усиленную защиту, т.е. эффектор-активируемый иммунитет (ETI). В противодействие этому, *P. syringae* приобретает новые функции для AvrPtoB, за счет приобретения E3 лигазного домена, который метит Fen для деградации, что снова приводит к развитию заболевания. В свою очередь, растения томата развивают новый промежуточный белок – киназу Pto, которая устойчива к деградации и запускает ETI, включающий СЧ-реакцию (Рис.1.1.).



Таким образом, совместная длительная эволюция растения и патогена привела к тому, что как со стороны растения, так и со стороны патогена появились различные альтернативные пути взаимодействия. Как уже упоминалось выше, бактериям присущи большие наборы эффекторов, растения же имеют «запасные пути» как на уровне детекции (случай киназ Fen и Pto), так и на уровне передачи сигнала.

1.3. Реакция сверхчувствительности

При несовместимом типе взаимоотношений между патогеном и растением-хозяином при развитии эффектор-активируемого иммунитета в большинстве случаев происходит развитие реакции сверхчувствительности (СЧ), формы программируемой клеточной смерти, локализованной в месте инфицирования. Быстрая гибель клеток в месте инфицирования сопровождается интенсивным накоплением токсичных для патогена соединений (активных форм кислорода, фитоалексинов и др.), что приводит к гибели патогена. Кроме того, гибнущие клетки индуцируют распространение сигнала в соседние клетки, запускающие механизмы старения, что, в конечном счете, приводит к образованию слоя перидермы, ограничивающего дальнейшее распространение патогена по растению. Еще одной важной функцией реакции сверхчувствительности является индукция системной устойчивости всего растения к последующему инфицированию. Достигается это за счет изменения экспрессии генов, что приводит к сенсibilизации защитных сил растительного организма.

Впервые морфология СЧ была описана в 1902 г для патосистемы пшеница-*Puccinia glumarum* (Ward, 1902), сам же термин «сверхчувствительность» был предложен в 1915 г для описания клеточной смерти, индуцируемой патогеном, которая коррелирует с устойчивостью к заболеванию пшеницы, вызываемому *Puccinia graminis* (Stakman, 1915). СЧ является одним из типов клеточной смерти, и обладает как уникальными

характеристиками, так и морфологическими и молекулярными маркерами, общими с другими типами программируемой клеточной гибели.

1.3.1. Типы клеточной смерти

Примеры программируемой клеточной смерти обнаружены у представителей разных царств живой природы: бактерий, водорослей, растений, беспозвоночных и позвоночных животных, включая человека (Hengartner, 2000; Rice, Bayles, 2003). Функции данного процесса очень разнообразны – от контроля естественного развития до борьбы с инфекционными агентами. Такое разнообразие выполняемых программ обеспечивается присутствием в мире живого разных типов программируемой клеточной смерти. Толчком к изучению программ смерти клеток послужило открытия феномена **апоптоза**.

Термин апоптоз был введен JF. Kerr с коллегами для описания обнаруженных ими специфических морфологических аспектов смерти животных клеток. Было показано, что апоптоз сопровождается округлением клетки, втягиванием псевдоподий, уменьшением клеточного объема (пикноз), конденсацией хроматина, ядерной фрагментацией (кариорексис), «пузырением» плазматической мембраны (но с сохранением целостности до последней стадии процесса). Сморщивание плазматической мембраны может привести к упаковыванию цитоплазмы и хроматина в апоптотические тела, которые поглощаются фагоцитами (Kerr et al., 1972). Отличительными маркерами апоптоза до недавнего времени считались такие биохимические особенности, как процессинг специфических нуклеаз, приводящий к олигонуклеосомной деградации ДНК, и активация специфических ферментов – каспаз. Но исследования последних лет показали, что этот тип клеточной смерти может осуществляться без олигонуклеосомной ДНК фрагментации. Аналогичным образом, присутствие протеолитически активных каспаз или продуктов расщепления их субстратов не является стопроцентным маркером

процесса апоптоза. Таким образом, эти процессы не обязательны для выполнения программы клеточной смерти (Kroemer, Martin, 2005).

Необходимо отметить, что термин апоптоз скрывает большую степень биохимического и функционального разнообразия. Существует несколько отдельных подтипов апоптоза, которые, несмотря на морфологическое сходство, могут запускаться различными биохимическими маршрутами (например, через внутренний или внешний пути, с участием или без участия митохондрий и др.) (Kroemer et al., 2009).

Кроме апоптоза, существуют другие формы смерти клеток, каждая с отличной морфологией. Апоптоз часто противопоставляют **некрозу**. Некроз морфологически характеризуется увеличением объема клетки (онкоз), набуханием органелл, разрушением плазматической мембраны и выходом внутриклеточного содержимого. Долгое время некроз было принято считать просто случайной неконтролируемой формой клеточной смерти, но исследования последних лет содержат доказательства того, что процесс некротической клеточной смерти может регулироваться рядом сигнальных путей и катаболических механизмов. Например, было показано, что активация группы death domain рецепторов (TNFR1, Fas/CD95 и TRAIL-R), а также Toll-подобных рецепторов (TLR3 и TLR4) вызывает некроз, особенно в присутствии ингибитора каспаз. TNFR1-, Fas/CD95-, TRAILR- и TLR3-индуцируемая клеточная смерть, по-видимому, зависит от образования RIP1–RIP3 (receptor interacting protein 1, 3) киназного комплекса (Cho et al., 2009). Для обозначения регулируемого некроза был предложен термин **некроптоз** (Christofferson, Yuan, 2010). На биохимическом уровне некроптоз можно определить как тип клеточной смерти, который можно предотвратить ингибированием RIP1. Доказано, что во время апоптоза активная каспаза-8 может расщеплять RIP1 и RIP3 и уничтожать их киназную активность, предотвращая тем самым инициацию некроптоза. Когда апоптоз заблокирован, некроптоз становится доминирующей формой клеточной

смерти (Vandenabeele et al., 2010). Известно, что некроптоз сопровождается усилением проницаемости митохондриальной и лизосомальной мембраны, ядерными изменениями, деградацией липидов (вследствие активации фосфолипаз, липооксигеназ и сфингомиелиназ), увеличением концентрации цитозольного кальция, что приводит к перегрузке митохондрий и активации некаспазных протеаз (кальпаин и катепсин). Некроптоз индуцируется в животной клетке при инфицировании, например, было показано, что данная программа реализуется в клетках, инфицированных определенными вирусами, которые блокируют апоптоз в клетках хозяина в качестве стратегии колонизации (Challa, Chan, 2010). Некроптотические клетки секретируют большой набор про-воспалительных молекул, которые передают сигнал другим клеткам для активации системной защиты (Zitvogel et al., 2010). Следовательно, некроптоз может составлять не только дублирующий механизм уничтожения вируса, когда апоптоз заингибирован, но также и способ активации иммунной системы, приводящий к системному ответу, что напоминает функции сверхчувствительной клеточной смерти растительных клеток при инфицировании фитопатогеном.

Клеточная смерть также может быть конечным результатом процесса **аутофагии**, который осуществляется путем деградации клеточного содержимого в рамках так называемых аутофагосом. Thompson и Viera предложили выделять два типа аутофагических процессов, названных микрофагия и макрофагия (Thompson, Viera, 2005). При микрофагии цитоплазматическая часть, поглощаясь, взаимодействует с вакуолью, в то время как при макрофагии цитоплазма инкапсулируется в двумембранные аутофагосомы, которые затем сливаются с лизосомами (Yoshimori, 2004). Слияние аутофагосом с лизосомами образует аутолизосомы, в которых как внутренняя аутофагосомная мембрана, так и внутренне содержимое разрушается кислыми лизосомными гидролазами. В ходе генетического скрининга дрожжей было идентифицировано несколько генов *AuTophaGy*

(ATG), которые необходимы для правильной аутофагической активности (Levine, Klionsky, 2004). Эти результаты обеспечили возможность дальнейшего исследования функций аутофагии с помощью генетических методов. Так, создание мутантных организмов с выключенными генами аутофагии привело к получению очень интересных результатов – выключение генов не подавляло клеточную смерть, а наоборот, способствовало развитию этого процесса с более высокими темпами, что подчеркивает значение процесса аутофагии именно как пути выживания клетки (Galluzzi et al., 2008). Существуют работы, результаты которых указывают на роль процесса аутофагии в реакции СЧ у растений. Клетки, умирающие путем аутофагии, прерывают передачу сигнала смерти, исходящего из места инфицирования, тем самым обеспечивая локализацию очага инфекции (Patel et al., 2006).

Недавно был открыт еще один тип программируемой гибели клеток – гибель инфицированных клеток животных – **пироптоз** («смерть в огне») (Brennan, Cookson, 2000). Впервые пироптоз был идентифицирован как особая смерть макрофагов, которая была вызвана инфицированием *Salmonella typhimurium* (Monack et al., 2001). Впоследствии было показано, что и другие бактериальные (*Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia pseudomallei* и др.) и вирусные инфекционные агенты могут индуцировать развитие пироптоза человеческих моноцитов ТНР-1 (Allen et al., 2009). В процессе пироптоза клетки сообщают о своей гибели всему организму, высвобождая химические сигналы, вызывающие развитие воспаления, которое помогает организму бороться с инфекцией, и цитокины, главным образом интерлейкин 1 (IL-1), передающие сигнал соседним клеткам о начале инфицирования (Fink, Cookson, 2005). Сама идея такой клеточной гибели наиболее близка реакции сверхчувствительности растений при инфицировании патогеном. Пироптоз клеток животных индуцируется каспазой-1, активируемой токсинами или эффекторами патогенов. Данная

программа гибели является очень быстрым процессом, который ведет к фрагментации ДНК, формированию цитоплазматических пор и осмотическому лизису клетки (Fink, Cookson, 2006). Однако, по мнению О. Керр и соавторов, в настоящее время нельзя однозначно признать пироптоз особой формой смерти клетки. Существует вероятность, что данный процесс представляет вариант апоптоза или некроптоза (Kerr et al., 2010).

Кроме представленных выше форм клеточной смерти выделяют также так называемые атипичные формы клеточной гибели. **Ороговение** (cornification) – специфическая форма ПКС, которая осуществляется у клеток эпидермиса (Lippens et al., 2005). **Митотическая катастрофа** – тип клеточной смерти, реализуемый непосредственно после нарушений процессов митоза (Vakifahmetoglu et al., 2008). **Аноикоз** – программируемая клеточная смерть, обусловленная отрывом клетки от соседних клеток или отрывом от субстрата (Gilmore, 2005). Совсем недавно был открыт и еще один тип смерти клеток животных – **энтоз**, так называемый клеточный каннибализм. Был описан процесс поглощения и последующего переваривания в фагосомах одной клеткой соседней здоровой клетки (Le Bot, 2007; Kroemer et al., 2009). Часто оказывается, что морфологические особенности смерти клеток не соответствуют биохимическим критериям классифицированных типов ПКС, и некоторые исследователи говорят о возможности введения новых терминов, таких как **некроапоптоз** или **апонекроз** (Nicotera, Melino, 2004).

1.3.2. Молекулярные события реакции сверхчувствительности

Ранние молекулярные события реакции сверхчувствительности связаны с распознаванием клеточными рецепторами присутствия эффекторных молекул патогена. Детекция эффекторов приводит к изменению ионного состава цитопазмы, за счет активации ионных каналов, главным образом, кальциевых. Дальнейшая цепочка событий связана с

генерацией активных форм кислорода, оксида азота, перестройкой цитоскелета. Эти сигнальные события, главным образом их интенсивность, приводят к изменению экспрессии генов, что выражается в программе запуска гибели клетки.

Известно, что изменение концентрации кальция в клетке происходит при действии практически любого вида стресса на клетку (Lecourieux et al., 2006). Участие данных ионов в событиях реакции СЧ широко изучается, и было показано, например, в патосистеме пшеница - возбудитель желтой ржавчины *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. При несовместимых взаимоотношениях наблюдается приток Ca^{2+} из межклеточного пространства в цитоплазму и затем отток в межклеточное пространство. При совместимом типе взаимодействия, напротив, поток кальция существенно не изменяется (Yin et al., 2014).

Оценка изменений концентрации цитозольного кальция в листьях *A. thaliana* показала постоянное повышение цитоплазматического кальция ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$), которое специфично для СЧ, вызванной инфекцией *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Grant et al., 2000). Существует множество аналогичных данных для различных патосистем, подтверждающих перераспределение кальция в клетке в сторону увеличения концентрации цитоплазматического кальция (Xu, Heath, 1998; Lecourieux et al., 2006), так же как и при клеточной смерти в тканях млекопитающих (Orrenius et al., 2003). Кроме того, ряд авторов представил работы с применением блокаторов кальциевых каналов или мутантов, несущих дефекты кальциевых каналов, в которых были получены данные о СЧ реакции пониженной интенсивности при заражении несовместимым патогеном (Levine et al., 1996; Ali et al., 2007). Данные работы подчеркивают немаловажную роль кальция в запуске клеточной смерти. Непосредственное действие кальция в цитоплазме умирающих клеток еще недостаточно изучено, имеются лишь разрозненные факты и предположения. Считается, что главная роль кальция в процессе клеточной

смерти определяется его функционированием в качестве кофактора различных ферментов, активируемых при ПКС (de la Torre et al., 2013). Были идентифицированы две киназы томата, участвующие в иммунных реакциях Cb110 и Cprk6. Ca^{2+} , накапливающийся в цитоплазме после восприятия патогена, может активировать киназу Cb110, которая взаимодействует с Cprk6, также активируя ее киназную активность, что приводит к фосфорилированию NADPH оксидазы RbohB, индуцируя образование АФК и запуск ПКС (de la Torre et al., 2013). Кальций совместно с кальмодулином могут выступать в качестве кофакторов предполагаемой синтазы оксида азота у арабидопсиса AtNOS1, тем самым активируя азотный сигналинг при реакции иммунитета, активируемого эффекторами (Arasimowicz, Floryszak-Wieczorek, 2007).

Образование NO при восприятии авирулентного патогена впервые было описано для культуры сои Delledonne с коллегами (Delledonne et al., 1998). В ходе реакции СЧ у ячменя с экспрессией гена устойчивости *Mla1* при действии возбудителя ложномучнистой росы (*Blumeria graminis*) показана полная пространственная корреляция между NO и окислительным взрывами, хотя образование NO, как оказалось, запускается первым. Важная роль оксида азота в процессе клеточной смерти была показана в ряде работ, связанных с подавлением образования NO. Так, культуры клеток сои и табака при ингибировании синтеза NO не показывают развитие реакции сверхчувствительности, и устойчивость к патогенам у них заметно понижена (Voccaro et al., 2005). Работа Pinto с соавторами (2002) с использованием клеток табака ВУ-2, свидетельствует о том, что совместное действие NO и H_2O_2 было важным фактором для запуска клеточной смерти. NO самостоятельно не мог индуцировать клеточную смерть и, в отличие от H_2O_2 , имел минимальное действие на аскорбат- и глутатион-антиоксидантные системы. Однако одновременное образование NO и H_2O_2 приводило к цитологическим и биохимическим последствиям, которые напоминали СЧ

(de Pinto et al., 2002). Последние исследования, посвященные экспрессии генов в растении табака, свидетельствуют о том, что эффекты NO и H₂O₂ могут частично перекрываться в широких пределах (Zago et al., 2006).

Непосредственные функции оксида азота в клетках при запуске СЧ реакции активно изучаются, но все же многое остается неясным. Известно, что оксид азота может приводить к активации экспрессии ряда защитных генов (Wang et al., 2013). Было показано, что происходит это может за счет S-нитрозилирования оксидом азота транскрипционных факторов (Grün et al., 2006). Накопление молекул NO при действии на табак эффектора Hrip1 некротрофного гриба *Alternaria tenuissima* индуцирует увеличение концентрации цитозольного кальция, путем S-нитрозилирования активирует NPR1, что приводит к индукции экспрессии участников салицилатного пути и активации системной устойчивости (Kulye et al., 2012). Кроме того, было показано, что нитрозилированию могут подвергаться и другие ключевые участники процесса клеточной смерти: например, именно S-нитрозилирование неактивной формы метакаспазы 9 (AtMC9) *Arabidopsis* регулирует ее протеолитическую активность *in vivo* (Belenghi et al., 2007). Также, наряду с регуляцией участников процесса программируемой гибели путем S-нитрозилирования, оксид азота может непосредственно образовывать комплексы с металлсодержащими белками, например цитозольной и митохондриальной аконитазой, каталазой, аскорбатпероксидазой, что приводит к повышению уровня H₂O₂ в клетке (Besson-Bard et al., 2008).

АФК наряду с оксидом азота являются одними из ключевых участников запуска реакции сверхчувствительности и у растений. Образование высоких концентраций АФК характерно в условиях различных видов стресса, как абиотических, так и биотических (Torres, Dangl, 2005; Miller et al., 2008; Nanda et al., 2010). Образование супероксидрадикала было обнаружено в ходе развития разных типов растительно-микробных

взаимоотношений, включая взаимодействия растений с авирулентными бактериями, грибами и вирусами (Low, Merida, 1996). Было показано, что авирулентные бактерии индуцируют двухфазное образование АФК у растений, состоящее из низкоамплитудной первой фазы и последующего более значительного и длительного накопления АФК во второй фазе (Lamb, Dixon, 1997; Torres et al., 2006). Однако во время взаимодействий с вирулентными бактериями обнаруживается только первая фаза (Bolwell et al., 2002). В случае симбиотических взаимоотношений, образование АФК также наблюдается, но второй пик АФК не регистрируется (Shaw, Long, 2003; Lohar et al., 2007; Nanda et al., 2010). Таким образом, эта вторая реакция или ее отсутствие, вероятно, играет важную сигнальную роль в активации растительной защиты. И во время развития сверхчувствительной клеточной смерти при несовместимых растительно-микробных взаимоотношениях регистрируется именно двухфазное накопление активных форм кислорода (Heath, 2000). Снижение концентрации активных форм кислорода применением ферментов, утилизирующих АФК, приводит к остановке развития СЧ, подтверждая тем самым исключительную роль АФК в запуске иммунных реакций растения (Doke, Ohashi, 1988).

Окислительным взрывом называют быструю и интенсивную генерацию активных форм кислорода в клетке и на ее поверхности в ответ на стрессовое воздействие. Окислительный взрыв связан с защелачиванием клеточного содержимого, за которое ответственны пероксидаза и аминоксидаза (Bolwell et al., 2002). Главным же источником апопластных АФК ряд исследователей называют NADPH оксидазу (Torres et al., 2002; Yoshioka et al., 2003). Кроме того, было показано, что во время ранних стадий СЧ происходит подавление активности ферментов антиоксидантной системы – аскорбатпероксидазы и каталазы, что, несомненно, также приводит к увеличению содержания АФК (Mittler et al., 1999).

Одной из функций активных форм кислорода, образующихся при запуске иммунных реакций растения, является их непосредственное токсическое действие на патоген, но основная роль АФК заключается в активации защитных механизмов. Показано, что H_2O_2 запускает синтез многих патоген-зависимых белков у растений табака, а также синтез этилена и салициловой кислоты (Chamngpol et al., 1998). Образующийся в результате индукции бактериальным элиситором харпином, пероксид водорода индуцирует ПКС в суспензионной культуре клеток арабидопсиса. При этом индуцируется и экспрессия генов защитных белков, в том числе таких, как фенилаланинаммоний-лиаза (PAL), глутатион-S-трансфераза (GST) и антранилатсинтаза (ASA1), которая участвует в образовании фитоалексина в клетках арабидопсиса (Desikan et al., 1998; Kasparovsky et al., 2004). Было показано, что H_2O_2 принимает участие в перекрестной сшивке структурных белков клеточной стенки. Кроме того, в клетках сои, обработанных элиситором, изолированным из мицелия грибного патогена *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*, H_2O_2 действует в качестве диффундирующего сигнала и индуцирует гены, кодирующие клеточные протекторные вещества в соседних клетках (Levine et al., 1994; Yi et al., 2014).

Перекисное окисление липидов – немаловажный результат действия активных форм кислорода в процессе реакции СЧ. Гидроксильный радикал ($\cdot OH$) легко отнимает протон от, например, фосфолипидов, чтобы запустить цепную реакцию: липидный радикал – липидный гидропероксид (LOOH). Перекисное окисление ненасыщенных групп в рамках ацильной цепи в мембране может сильно нарушить ее целостность. Однако недостаток LOOH может возникать не только при окислительном повреждении, но также и при действии липооксигеназы (LOX), и относительная важность каждого механизма для СЧ привлекает немалый интерес (Jalloul et al., 2002; Montillet et al., 2004, 2005). Непосредственное участие и важность LOX для развития

процесса гибели клетки было показано с помощью мутантных растений табака. Линии с подавлением LOX после обработки авирулентной расой *Phytophthora parasitica var. nicotinia* показывали сниженные темпы СЧ реакции (Rancé et al., 1998). В рамках механизма клеточной смерти LOX могут просто действовать, усиливая мембранное повреждение, но они также вовлечены в образование ряда защитных продуктов, причем некоторые из них являются цитотоксичными (Knight et al., 2001).

Альтернативный окислительный механизм клеточной смерти может заключаться в изменении уровня или редокс статуса пула низкомолекулярных антиоксидантов, например, глутатиона (GSH). Молекулярные механизмы регуляции процессов клеточной смерти, связанной с глутатионом, остаются не изучены, но все же существуют работы, указывающие на важность этого участника в процессе активации иммунных реакций растения, например, таких как биосинтез салициловой кислоты, синтез антимикробных соединений камалексина и глюкозинолата (Dubreuil-Maurizi et al., 2011). Как известно, биосинтез глутатиона происходит в ходе двухступенчатой ферментативной реакции в цитозоле и в большей степени в хлоропластах (Dubreuil-Maurizi, Poinssot, 2012). Большое количество данных показывает, что хлоропласты, так же как и митохондрии, вносят значительный вклад в СЧ; наиболее вероятно, за счет образования АФК. По меньшей мере, некоторые формы СЧ, как оказалось, подвержены влиянию света, и во многом АФК-зависимое перекисное окисление липидов во время гибели клетки может зависеть от освещенности (Montillet et al., 2005). Так, в работе Васильева и соавт. с эпидермисом листьев гороха было показано, что обработка цианидом индуцирует ПКС как устьичных (содержащих хлоропласты) клеток, так и основных эпидермальных клеток (лишенных хлоропластов). При этом освещение значительно ускоряло гибель устьичных клеток, но не оказывало действия на эпидермальные клетки. Также было показано, что линкомицин – ингибитор синтеза белка в митохондриях и

хлоропластах снижает действие цианида на устьичные клетки, и эффект этот имеет разную интенсивность на свету и в темноте, что подтверждает участие хлоропластов в процессе программируемой клеточной смерти (Васильев и др., 2007).

Если участие хлоропластов в процессе клеточной гибели является отличительной особенностью растительных организмов, то участие митохондрий в индукции ПКС показано и у животных, и у растительных организмов. Во время СЧ наблюдается раннее набухание митохондрий (Bestwick et al., 1995) и быстрая потеря митохондриальных функций, как описано для клеток петрушки (*Petroselinum crispum*), обработанных СЧ-индуцирующим штаммом *Phytophthora infestans* (Naton et al., 1996). Yao с коллегами показали роль митохондрий в развитии реакции СЧ. В работе использовали протопласты *A. thaliana*, трансформированного бактериальным геном *avrRpt2*, ответственным за индукцию СЧ реакции. Была показана быстрая потеря мембранного потенциала митохондрий, которая легко подавлялась циклоспорином, ингибирующим образование пор, что свидетельствует об образовании пор в митохондриях в процессе развития ПКС в клетках растений (Yao et al., 2004).

В процессе развития реакции СЧ в митохондриях также происходит накопление активных форм кислорода, генерация которых тесно связано с образованием пор и изменением кальциевого потока. Кальциевый приток запускает биосинтез NO, который способствует генерации митохондриальных АФК через подавление комплекса IV (цитохром с оксидазы) и дальнейшей индукции образования митохондриальных пор (Ali et al., 2007).

Некоторые работы содержат факты, касающиеся выхода цитохрома с (ключевого митохондриального индуктора апоптоза у животных) до начала процесса клеточной смерти у растения; например, вследствие применения харпина или викторина, и во время СЧ, вызванной *Pseudomonas syringae* pv.

tabaci у баклажана (*Solanum melongena*) (Krause, Durner, 2004; Kiba et al., 2006).

Одним из важных участников митохондриальной регуляции клеточной смерти является альтернативная оксидаза (АОХ), фермент внутренней митохондриальной мембраны клеток растений, который не обнаружен в митохондриях животных. Участие АОХ в процессе клеточной смерти исследовалось на трансгенных растениях с антисмысловым подавлением этого фермента. При обработке антимицином А (ингибитором комплекса III ЭТЦ) эти трансгенные растения подвергаются быстрой клеточной смерти, одновременно с образованием АФК и индукцией генов, активация которых характерна для реакций устойчивости к заболеваниям. В то время как, сверхэкспрессия АОХ имеет обратный эффект (Simons et al., 1999). Эти особенности говорят о том, что АОХ может участвовать в контроле образования АФК в митохондриях, а сами растительные митохондрии играют важную роль в индукции клеточной смерти в ходе СЧ реакции за счет образования АФК на внутренней митохондриальной мембране при транспорте электронов (Krause, Durner, 2004).

1.3.3. Ферменты сверхчувствительной гибели клеток

Описанные молекулярные события – перераспределение кальция, генерация активных форм кислорода и азота, изменение редокс-статуса клетки, перекисное окисление липидов – приводят как к непосредственным повреждениям в клетке, так и к экспрессионной и модификационной активации следующих участников процесса смерти, обладающих определенными ферментативными активностями. В процесс вступают специфические нуклеазы, протеазы и целые протеасомные комплексы, что приводит к развитию морфологических особенностей, соответствующих характеристикам программируемой клеточной гибели – остановка движения цитоплазмы, деградация хроматина, фрагментация ядра, отхождение

протопласта от клеточной стенки (плазмолиз), вакуолизация цитоплазмы, либо лизис тонопласта центральной вакуоли. Необходимо отметить, что все эти признаки программируемой клеточной гибели нельзя назвать обязательными для реакции сверхчувствительности, разнообразные патосистемы проявляют уникальные наборы и сочетания данных морфологических характеристик.

Активация специфических нуклеаз приводит к фрагментации ядра и деградации хроматина. Разрыв нити ДНК на олигонуклеосомные фрагменты, образующие при электрофорезе ДНК характерную «лесенку», так называемый ДНК-ладдеринг – является типичным признаком апоптоза животных. Этот признак ПКС выявлен также у растений при реакции СЧ. Разрезание ДНК на длинные фрагменты отмечалось при сверхчувствительной гибели клеток растений в ответ на заражение вирусами (Xu, Roossinck, 2000), грибами, бактериями (Yao et al., 2002; Kiba et al., 2006). Однако в ряде работ описано наличие TUNEL – меченного ядра, но показано отсутствие признаков ладдеринга при несовместимых взаимодействиях между растением и патогеном (Mittler, Lam, 1997; Che et al., 1999). Было показано, что образование фрагментов ДНК связано с активностью специфических кальций-зависимых ДНКаз, активация которых не обнаружена при абиотических стрессах и процессах старения (Mittler, Lam, 1995). Таким образом, несмотря на специфичность различных патосистем, можно отметить, что преобразование хроматина при СЧ все-таки показывает типичные признаки апоптоза. Наряду с описанными изменениями хроматина рядом авторов предложено считать типичным для процесса растительной программируемой клеточной гибели увеличение количества мономерной хлоропластной и митохондриальной ДНК (Ванюшин, 2001).

Помимо активации определенных нуклеаз, процесс клеточной гибели сопровождается индукцией еще одной ферментной системы, а именно протеазной. Natsugai N и др. описывают, что для развития реакции СЧ при

бактериальной инфекции необходима активация протеасом растительной клетки. Подавление же активности любой субъединицы протеасомы препятствует развитию процесса клеточной гибели. Также было показано, что функционирование протеасом необходимо для процесса особого типа клеточной смерти растений при инфицировании патогеном, при котором происходит слияние тонопласта и плазматической мембраны, что обеспечивает выход гидролитических ферментов вакуоли в апопласт (Hatsugai et al., 2009; Hara-Nishimura, Hatsugai, 2011).

Характерной протеазной системой апоптоза млекопитающих является система каспаз – семейства цистеиновых протеаз, обладающих специфичностью гидролиза после остатка аспарагиновой кислоты. У растений отсутствуют каспазы, но при запуске реакции на патоген все же была показана активация протеаз, и ингибиторные исследования ясно показали их роль в СЧ (Sanmartín et al., 2005).

Было предложено несколько растительных альтернативных вариантов каспазам, на первом этапе это были метакаспазы и вакуолярные протеазы (vacuolar processing enzyme VPE), и оба варианта показывают некоторую гомологию с каспазами (Watanabe, Lam, 2004; Vercammen et al., 2004; Sanmartín et al., 2005).

Патоген-индуцируемая экспрессия метакаспаз была доказана, однако до настоящего времени их роль во время СЧ не была установлена (Hoeberichts et al., 2003). Механизмы действия вакуолярных протеаз неизвестны, но было показано, что при активации VPE в умирающих клетках происходит разрыв тонопласта вакуоли (Hatsugai et al., 2004; Hatsugai, Hara-Nishimura, 2010;). СЧ, вызванная вирусом табачной мозаики подавлялась ингибиторами как VPE, так и каспазы 1 млекопитающих. Но интересен тот факт, что такой эффект не был обнаружен при исследовании СЧ реакции при бактериальном заражении (Hatsugai et al., 2009; Hara-Nishimura and Hatsugai, 2011).

Еще одним участником процесса программируемой клеточной гибели с протеазной активностью являются так называемые фитаспазы – субтилизин-подобные серин-зависимые протеазы растений с аспартатной специфичностью (Chichkova et al., 2010). Оказалось, что фитаспаза специфично гидролизует белок-мишень по тому же сайту, что и каспазы животных. Кроме того, фитаспазы обладают не только специфичностью аналогичной каспазам, но и, по-видимому, имеют аналогичные роли в процессе ПКС. Активация фитаспазы была показана при развитии реакции СЧ у табака в ответ на инфицирование вирусом табачной мозаики – применение специфических ингибиторов подавляло развитие клеточной гибели. Непосредственные функции этого фермента еще не известны, но исследования, показавшие апопластную локализацию фермента, позволили авторам предположить участие фитаспазы в протеолизе бактериальных белковых эффекторов. Но также имеются факты, указывающие на перемещение фитаспазы внутрь клетки при индукции ПКС. Таким образом, фермент фитаспаза, его функции и механизмы действия при развитии программируемой гибели растительных клеток на данный момент является очень привлекательным объектом исследований, работа над которым может способствовать открытию массы еще неизученных шагов процесса клеточной гибели.

Еще одним предполагаемым участником реакции СЧ у растений, а может и программируемой гибели растительных клеток, требующим дальнейших исследований, является фермент саспаза. Этот фермент, обнаруженный не так давно, является серин-зависимой субтилазой с аспартатной специфичностью подобно фитаспазе, но все же имеет другую субстратную специфичность (Coffeen, Wolpert, 2004). Подробно протеазные участники процесса ПКС у растений описаны в детальном обзоре Фомичевой (Фомичева и др., 2012).

Реакция сверхчувствительности является важнейшей защитной реакцией иммунной системы растения (Mur et al., 2008). Запуск программы клеточной смерти осуществляется при восприятии клетками действия инфекционного агента и активации определенных сигнальных событий. Основными участниками передачи сигнала и активации программы являются следующие компоненты растительной клетки: кальций, обеспечивающий как изменение ионного состава клетки, так и непосредственное связывание и активацию/ингибирование участников процесса; активные формы кислорода и азота, также имеют двойственные функции – непосредственное повреждающее действие и регуляция функционирования важнейших клеточных систем; антиоксиданты клетки, представленные неферментативными низкомолекулярными соединениями и ферментативной системой детоксикации АФК (Heath, 2000). Тесно связанные и тонко регулируемые пути трансдукции сигнала, в конечном счете, приводят к изменению экспрессии генов участников процесса смерти, а также к активации двух важнейших ферментных систем ПКС – нуклеазной и протеазной, чья работа ведет к определенным морфологическим изменениям и, в итоге, к полной деградации клеточного содержимого, при сохранении целостности клеточной стенки (Mittler, Lam, 1995; Фомичева и др., 2012). На данный момент все еще остается много неясностей и загадок в механизмах клеточной гибели растительной клетки, индуцируемой патогеном, но активная работа множества исследовательских команд в данном направлении позволяет надеяться на скорое разрешения существующих вопросов и открытие практических способов регуляции механизмов фитоиммунитета. Одним из наиболее практически значимых вопросов можно назвать процесс реакции сверхчувствительности, как индуктора иммунных сигналов. Известно, что этот процесс клеточной гибели сопровождается синтезом ряда сигнальных молекул, таких как салициловая кислота, жасмоновая кислота и этилен, трансдукция которых по растению обеспечивает развитие системной устойчивости растения (Mur et al., 2006).

1.4. Системная приобретенная устойчивость

Системная устойчивость растений к болезням, являющаяся неспецифичной, основана на экспрессии множества защитных генов. Выделяют две формы индуцированной устойчивости: системная приобретенная устойчивость (systemic acquired resistance – SAR) и индуцированная системная устойчивость (induced systemic resistance – ISR) (Vallad, Goodman, 2004). Считается, что развитие SAR происходит при детекции растением биотрофного патогена, приводящей к экспрессии защитных генов с участием салициловой кислоты и ее производных. Действие же некротрофных патогенов, фитофагов и эндофитов приводит к усиленному биосинтезу жасмоновой кислоты и этилена, также регулирующих экспрессию защитных генов, и развитию ISR. Однако это разделение весьма условно и не окончательно, поскольку биохимические механизмы индукции различных типов системной устойчивости находятся в процессе изучения. Вместе с тем, в последние годы появляется все больше данных о сложном взаимодействии индукторов уже известных путей сигналинга – салицилатного и жасмонатного, а также о присутствии других возможных альтернативных индукторов и участников в процессах устойчивости к патогенам. Разными группами ученых было показано, что в индукции системной устойчивости могут участвовать также глицеролипиды (Chaturvedi et al., 2008), азелаиновая кислота (Jung et al., 2009) и глицерол-3-фосфат (Chanda et al., 2011).

Салициловая кислота (орто-гидроксibenзойная) – гормоноподобное соединение фенольной природы, обладающее функциями сигнального интермедиата. Салициловая кислота (СК) синтезируется в растительной клетке несколькими путями. Основной путь синтеза СК – фенилпропаноидный, альтернативный путь осуществляется в хлоропластах из шикимовой кислоты при участии фермента изохаризматсинтазы. К продвижению по растению от клетки к клетке через плазмодесмы или по

флюэме способна лишь транспортная форма СК – метилсалицилат (метилСК) (Park et al., 2007). Интенсивное накопление салициловой кислоты в тканях растения после контакта с патогеном получило название «салицилатный взрыв». Показано, что аккумуляция СК до определенного уровня вызывает активацию СК-сигналинга, что приводит к репрограммированию ряда *PR*-генов, в результате чего происходит индукция синтеза защитных белков, и формированию SAR. Происходит синтез СК-индуцируемых белков прямого антипатогенного действия и белков, повышающих устойчивость клеток растения-хозяина (Тарчевский, 2014; Тарчевский и др., 2012). Предполагается, что салициловая кислота, накапливаясь в месте инфицирования в большом количестве, связывается с рецептором NPR3 (NON EXPRESSOR OF PR GENES 3) с низкой аффинностью и запускает деградацию супрессора клеточной смерти NPR1 (Fu et al., 2012), приводя тем самым к развитию реакции СЧ. В то время как в растительных клетках, граничащих с местом инфицирования, СК накапливается в меньших количествах и связывается с высоко-аффинным рецептором NPR4, что предотвращает деградацию NPR1. Этот белок при транслокации в ядро действует в качестве транскрипционного коактиватора большого набора защитных генов, в частности гена *PR-1*, который часто используется в качестве маркера экспрессии СК ответственных генов (Moore et al., 2011). Такие клетки выживают за счет экспрессии генов системного иммунитета, так называемых *SAR*-генов. К *SAR*-генам относятся 9 семейств генов, кодирующих различные антибактериальные соединения (Шакирова, 2001).

Жасмоновая кислота (ЖАК) и ее структурно родственные метаболиты являются соединениями липидного происхождения. Биосинтез ЖАК начинается с выхода α -линоленовой кислоты из мембранных липидов. После синтеза ЖАК легко превращается в метилжасмонат с помощью карбоксилметилтрансферазы жасмоновой кислоты или конъюгирует с аминокислотами, такими как изолейцин, с помощью конъюгатсинтазы JAR1

(jasmonate resistance 1), что приводит к образованию жасмонил-изолейцина (Fonseca et al., 2009).

У *Arabidopsis* обозначены две главные ветви ЖАК пути: МҮС ветвь и ERF ветвь. МҮС ветвь контролируется транскрипционными факторами МҮС-типа и активирует экспрессию ЖАК-зависимого маркерного гена *vsp2* (vegetative storage protein 2). ERF ветвь регулируется членами семейства транскрипционных факторов AP2/ERF (apetala2/ethylene response factor), таких как ERF1 и ORA59 (octadecanoid-responsive arabidopsis 59), и активирует ЖАК-зависимый маркерный ген *pdf1.2* (plant defensin1.2). Обсуждаемые в литературе данные указывают на то, что эти две ветви определяют разные уровни системной устойчивости. Так, ERF ветвь ЖАК пути, главным образом, связана с усиленной устойчивостью к некротрофным патогенам, в то время как МҮС ветвь связана с реакциями на поранение и защитой против насекомых, хотя МҮС2 также может участвовать в запуске защиты против патогенов (Pieterse et al., 2012).

До недавнего времени считалось, что СК- и ЖАК-пути сигналинга, определяющие развитие системной устойчивости растения, оказывают антагонистический эффект друг на друга. Было показано, что СК является сильным супрессором ЖАК-зависимых реакций на поранение растений томата (Doherty et al., 1988). Антагонизм между СК и ЖАК также был продемонстрирован и для других видов растений, включая *Arabidopsis* (Spoel et al., 2003). Однако, в последнее время стали появляться работы, показывающие нейтральные и даже синергичные эффекты взаимодействия СК- и ЖАК-сигнальных путей. Показано, что при обработке растений картофеля смесью СК и ЖАК происходит более интенсивное накопление пероксида водорода и мРНК изопероксидазы, чем при обработке растений СК и ЖАК по отдельности. Известно, что изопероксидаза является одним из ключевых ферментов формирования устойчивости растения к патогенам (Максимов и др., 2011; Сорокань и др., 2014). Обработка *Arabidopsis* низкими

концентрациями ЖАК и СК приводила к синергичному эффекту на экспрессию ЖАК- и СК-зависимых генов *pdf1.2* и *pr-1*, соответственно. При более высоких концентрациях эффекты были антагонистичными, показывая, что последствие взаимодействия ЖАК- и СК-сигнальных путей зависит от относительной концентрации каждого гормона (Mur et al., 2006). Такая возможность гибкого регулирования взаимосвязи и взаимозависимости различных сигнальных путей обеспечивает огромный потенциал для проявления и реализации иммунитета растительного организма. В природе растения одновременно или последовательно атакуются множеством патогенов с разными жизненными стратегиями. Поэтому, эта взаимосвязь может быть мощным механизмом регулирования приоритета одного сигнального пути над другим, в зависимости от типа повреждающего действия.

Одна из важных функций системной устойчивости была открыта совсем недавно. Оказалось, что индукция устойчивости может сопровождаться развитием так называемой иммунной памяти, то есть, действие стресса окружающей среды на одно поколение может привести к эффективной адаптации к тому же стрессу у следующего поколения (Luna et al., 2012). Механизмы иммунной памяти растений в данный момент неизвестны, но существует ряд гипотез, которые подтверждаются экспериментальным путем многими исследователями. Высказывается предположение, что эпигенетические изменения в генетическом материале, такие как модификация в метилировании ДНК, реконструирование хроматина и модификация гистонов могут наследственно и обратимо изменять экспрессию генов и оказывать воздействие на растительный иммунитет (Jaskiewicz et al., 2011). Существуют факты, свидетельствующие о том, что передача наследственной устойчивости выполняется путем гипометилирования генов, которое происходит при непосредственной СК-зависимой защите (Luna et al., 2012). Имеются сведения, что активация

связанных с иммунитетом генов в растениях может быть следствием метилирования и ацетилирования ДНК и гистонов в генных промоторах при локальной инфекции (Jaskiewicz et al., 2011). Таким образом, в развитии длительной иммунной памяти растений может быть задействовано множество компонентов и путей сигналинга, а также эпигенетические механизмы управления иммунитетом.

1.5. Участие белков теплового шока в иммунных реакциях растения

Любой вид стресса запускает определенные механизмы защиты, такие как экспрессия генов, которые не экспрессируются при нормальных условиях. Почти все виды стресса индуцируют продукцию группы белков, названных белки теплового шока (БТШ). У растений БТШ впервые были обнаружены в 1980 году. Как и у других организмов, БТШ растений множественны. Они представлены группой высокомолекулярных (110-60 кД) и низкомолекулярных (35-15 кД) белков (Войников et al., 1984; Nover et al., 1984; Vierling, 1991;). Эти белки группируют у растений в пять классов в соответствии с приблизительными молекулярными весами: Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 и малые белки теплового шока (small heat shock proteins, sHsps). Транскрипция генов теплового шока контролируется регуляторными белками, названными транскрипционные факторы теплового шока (heat stress transcription factors, Hsfs) (Al-Whaibi, 2011). Синтез БТШ наблюдается у растений *A. thaliana* при действии низких температур, ультрафиолета, тяжелых металлов, окислительном и осмотическом стрессах, а также поранении. Как оказалось, инфицирование патогеном также приводит к индукции синтеза белков теплового шока Hsp70, Hsp90, и Hsp100 семейств (Maimbo et al., 2007; Swindell et al., 2007; Szatmári et al., 2014).

Hsp101 является представителем семейства белков Casein lytic proteinase/heat shock protein 100 (Clp/Hsp100), которые являются шаперонами

и участвуют в реконструировании/разборке белковых комплексов с затратой энергии АТФ. Помимо цитозольного Hsp101 в это семейство относят белки ClpB-p и ClpB-m, имеющие хлоропластную и митохондриальную локализацию соответственно. Широко известно, что цитозольный белок Hsp101 необходим для развития индуцированной термотолерантности (Hong, Vierling, 2001). Интересно, что хотя транскрипты всех трех генов накапливаются при действии высоких температур, белки ClpB-p и ClpB-m не участвуют в развитии индуцированной термотолерантности. Но мутация гена ClpB-p вызывает нарушения синтеза хлорофилла и развития хлоропластов (Lee et al., 2007). Кроме существенной роли в индуцированной термотолерантности, у *A. thaliana* Hsp101 обеспечивает продуктивность при нормальных условиях роста. Выключение гена приводит к уменьшению количества семян, сроков прорастания, общей сухой массы и количества соцветий; увеличению интенсивности транспирации (Tonsor et al., 2008).

Из всех известных белков теплового шока растений участие Hsp90 в развитии иммунных реакций считается наиболее доказанным. Анализ промоторных регионов генов *Hsp90* у томата показал наличие множества cis-элементов, вовлеченных в реакции растения на биотический и абиотический виды стресса (Liu et al., 2014).

Hsp90 и ко-шаперон подобные молекулы RAR1 и SGT1 выполняют ключевую роль в ETI, второй линии защиты растения (Thao et al., 2007; Shirasu, 2009). В растительном иммунитете цитозольные Hsp90 принимают участие в сборке, контроле стабильности и/или активации иммунного рецепторного комплекса. Точечные мутации генов *hsp90.2* и *hsp90.3* риса (*Oryza sativa L.*) приводят к проявлению усиленной устойчивости растений к заболеваниям. Эти мутации приводят к повышенному содержанию иммунных рецепторов, включая SNC1, RPS2 и RPS4. Hsp90 могут способствовать SGT1 в формировании SCF E3 убиквитин лигазного комплекса, который метит иммунные рецепторы для дальнейшей их

деградации. Такая регуляция имеет решающее значение в ограничении количества иммунных рецепторов, что позволяет избегать развития аутоиммунных реакций (Wang et al., 2014). *In vitro* было показано, что SGT1 может взаимодействовать с SKP1 и связываться в таком состоянии с Hsp90 образуя ко-шаперонный комплекс (Catlett, Kaplan, 2006; Xu et al., 2012). Дальнейшие исследования показали, что комплекс SKP1-CULLIN1-F-box (SCF) регулирует стабильность R-белков (Cheng et al., 2011), свидетельствуя о том, что SKP1 может быть также вовлечен в EТI.

Hsp70 функционируют в качестве молекулярных шаперонов в фолдинге и рефолдинге белков для предотвращения необратимой агрегации (Mayer, Bukau, 2005) и играют роль в процессах транспорта и конгломерации (Bush, Meyer, 1996). Они также вовлечены во взаимодействие с белками, передающими сигнал, и эти их функции не всегда связаны с функционированием в качестве шаперонов (Pratt, Toft, 2003). Hsp70 может связываться с малыми GTPазами Ras семейства. Малая GTPаза Ras может функционировать в качестве основного переключателя двух типов иммунитета: паттерн-активируемого иммунитета (PTI) и эффектор-активируемого иммунитета (ETI) (Kawano et al., 2010)

Другую функцию Hsp70 связывают с модуляцией функционирования MAPK каскада. Сверхэкспрессия Hsp70 ингибирует MAPK сигнальный каскад, который связывают с развитием апоптотической гибели клетки (Hwang et al., 2005). У риса белок OsctHsp70-1 имеет функциональную связь с Ras/Raf-связанным MAPK киназным каскадом (Jung et al., 2013; Wang et al., 2014).

Исследования последних лет показали, что Hsp70 принимает участие в реализации так называемого контроля качества эндоплазматического ретикулума (ER quality control (ER-QC)) (Eichmann and Schäfer, 2012; Saijo, 2010). Примерами. Для функционирования рецептор-подобных белков, отвечающих за активацию паттерн-активируемого иммунитета, например

белков томата Cf и Ve1 требуется корректный фолдинг и гликозилирование (Fradin et al., 2009; Stergiopoulos, De Wit, 2009). Кроме того, должен быть предотвращен транспорт незрелых рецепторов к плазматической мембране, так как они могут быть нефункциональны в связывании лиганда и активации сигнальных путей. Для осуществления всей необходимой пост-трансляционной модификации, для созревания трансмембранных рецепторов и существует ER-QC, который осуществляется шаперонами ЭР, такими как, Hsp70-связывающие белки (Hsp70 binding proteins (BiPs)), взаимодействующими с Hsp40-подобным stromal-derived factor-2 (SDF2) (Schott et al., 2010). Главная функция этих шаперонов ER-QC заключается в предотвращении накопления несвернутых белков путем участия в фолдинге белков и запуске ЭР-стресса в случае, если несвернутые белки начинают накапливаться (Liu, Howell, 2010; Eichmann, Schäfer, 2012). Рецептор Ve1 участвует в запуске защитных реакций против грибного патогена *Verticillium dahliae*. Мутация белка системы контроля качества эндоплазматического ретикулума BiPs приводит к отсутствию устойчивости томата к патогену. Это говорит об участии шаперонов эндоплазматического ретикулума в развитии защитных иммунных реакций (Liebrand et al., 2014). В работе Yun с коллегами (2013) было показано, что нагревание плодов мандарина (*Citrus unshiu* Marc.) в течение 5 минут при 52°C приводило к усилению экспрессии БТШ и последующей устойчивости к заражению голубой плесенью (*Penicillium italicum*). Авторы связывают данный эффект с функционированием Hsp70 в системе контроля фолдинга (Yun et al., 2013).

При инфицировании пшеницы (*Triticum aestivum* L.) возбудителем желтой ржавчины *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici* оказалось, что совместимый тип взаимоотношений характеризуется более ранним увеличением экспрессии Hsp70, чем при несовместимом типе, который также характеризуется увеличением содержания Hsp70, но в более поздние сроки. Функции Hsp70 авторы связывают с предотвращением развития

окислительного взрыва, и активация синтеза этого белка регулируется патоген-индуцируемыми сигнальными путями. Так, при действии метилжасмоната экспрессия *TaHSC70* увеличивается (Duan et al., 2011).

В системе табак (*Nicotiana tabacum*) - некротрофный патоген *Ralstonia solanacearum* было показано, что предварительное умеренное тепловое воздействие на растения табака, сопровождающееся синтезом Hsp70, способствует развитию несовместимого типа взаимоотношений растения и микроорганизма. Авторы предполагают, что Hsp70 активирует процесс программируемой клеточной гибели, что подтверждается усиленной ДНК фрагментацией при предварительной тепловой обработке (Byth-illing, Bornman, 2014).

Таким образом, белки теплового шока, выполняя неспецифические функции в качестве шаперонов, могут принимать участие также и в отдельных механизмах иммунных реакций. Важно определить их роль в развитии защитного ответа, изучить функции белков теплового шока в иммунных реакциях растений как при развитии совместимых, так и несовместимых взаимоотношений растений и микроорганизмов.

1.6. Возбудитель кольцевой гнили картофеля

Clavibacter michiganensis ssp. *sepedonicus* – грамположительная фитопатогенная бактерия, вызывающая заболевание «кольцевая гниль картофеля». Род *Clavibacter* входит в состав семейства грамположительных фитопатогенных и эндофитных микроорганизмов – *Microbacteriaceae*. Впервые род *Clavibacter* был описан М.Дж. Дэйвис с соавторами. В него включены фитопатогенные коринеформные бактерии с клеточной стенкой В2γ-типа (Davis et al., 1984). В настоящее время в род *Clavibacter* входит один вид *Clavibacter michiganensis*, состоящий из следующих подвигов: *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus* (Cms) – кольцевая гниль картофеля (*Solanum tuberosum*) (Manzer et al., 1987); *C. michiganensis* ssp. *michiganensis* (Cmm) –

бактериальный вилт и рак томата (*Solanum lycopersicum*) (Strider, 1969); *C. michiganensis* ssp. *insidiosus* (Cmi) – увядание и остановка роста люцерны (*Medicago sativa*) (McCulloch, 1925); *C. michiganensis* ssp. *nebraskensis* (Cmn) – вилт и завядание кукурузы (*Zea mays*) (Vidaver, 1982); *C. michiganensis* ssp. *tessellarius* (Cmt) – крапчатость и пятнистость пшеницы (*Triticum aestivum*). В 2014 году был выделен новый подвида *Clavibacter michiganensis* ssp. *phaseoli* – возбудитель заболевания фасоли (*Phaseolus vulgaris*) (Gonzalez, Trapiello, 2014).

Cms – аэробные неспорозные, неподвижные, палочкообразные бактерии, размером 0,5–1,0 мкм, одиночные либо соединены попарно или в короткие цепочки. Вызывает системное заболевание – кольцевая гниль картофеля. Заболевание имеет широкое распространение, и возбудитель классифицируется как карантинный во многих странах (Eichenlaub, Gartemann, 2011). Для *Cms* характерно наличие латентной стадии инфицирования (Nelson, 1982). Во время латентной стадии не происходит развития симптомов заболевания (вилт, гниль клубней по сосудистому кольцу), но патоген присутствует в растении. Так, например, в клубнях картофеля без проявления симптомов заболевания методом ПЦР-диагностики было подтверждено присутствие *Cms* (Бояркина и др., 2008).

Для бактерий *C. michiganensis* характерен биотрофный тип питания. На ранних стадиях инфицирования патоген распространяется по сосудам ксилемы, нарушая транспорт воды и вызывая вилт. Нарушение притока воды приводит к развитию некротических пятен на листьях, их пожелтению. Дальнейшее инфицирование приводит к проникновению бактерий в корни и созревающие клубни, сопровождающееся мацерацией тканей, загниванием и поражением сосудистого кольца (Laine et al., 2000; 2006). Известно, что в сосудах картофеля *Cms* образует биопленки, что является дополнительным фактором вирулентности, так как в составе биопленки бактериальные клетки

менее подвержены антибактериальному действию защитных соединений растения (Bae et al., 2014).

Единственным природным хозяином данного фитопатогена считается картофель. Баклажан (*Solanum melongena*) часто называют альтернативным хозяином и используют для биотеста (Nissinen et al., 2001). У растений табака *Sms* индуцирует развитие реакции сверхчувствительности (Nissinen et al., 1997). При высокой инфекционной нагрузке у картофеля также может происходить развитие реакции сверхчувствительности (Романенко и др., 2000). Объяснить это явление можно повышением интенсивности специфических защитных реакций, которые активируются у устойчивого сорта. В природных условиях инфекционная нагрузка не может быть столь большой, чтобы обеспечить необходимую для запуска СЧ реакции интенсивность защитных процессов.

В пионерских работах по изучению возбудителя кольцевой гнили и родственных подвидов была выдвинута гипотеза, постулирующая, что факторами патогенности данных микроорганизмов являются экстраклеточные полисахариды (ЭПС) (Westra, Slack, 1992; Shafikova et al., 2006).

ЭПС *Sms* представляют собой смесь высокомолекулярных и низкомолекулярных полисахаридов, в состав которых входят фукоза, манноза, галактоза и глюкоза. Соотношение сахаров варьирует у разных штаммов. В состав ЭПС *Sms* входят от 4 до 6 компонентов с молекулярной массой от 20 мДа до 1 кДа (Bermohl et al., 1996; Shafikova et al., 2006; Шафикова, 2003; Шафикова и др., 2009). Работы с мутантами *S. michiganensis* с нарушением продукции ЭПС показали, что присутствие полисахаридов не определяет вирулентность. Мутанты оставались вирулентными и способными колонизировать растение (Bermohl et al., 1996). Тем не менее, было показано, что ЭПС могут участвовать в узнавании патогена растением-хозяином. Показано, что ЭПС связываются на клеточной

стенке и плазматической мембране клеток картофеля, что свидетельствует о присутствии рецепторов, специфически связывающихся с ЭПС. Кроме того, было показано, что у растений устойчивого к *Sms* сорта Луговской таких рецепторов больше, чем у восприимчивого сорта Лукьяновский (Romanenko et al., 2003). Данный факт логично укладывается в рамки современной теории фитоиммунитета. Можно предположить, что ЭПС возбудителя кольцевой гнили картофеля являются микробными молекулярными паттернами (МAMP), и их детекция в растении определяется присутствием на клеточной стенке и плазмалемме растительных клеток специфических паттерн-распознающих рецепторов.

У представителей вида *C. michiganensis* обнаружены плазмиды. У *Sms* – кольцевая плаزمида с массой 50,6 kb, которая получила название pCS1 (Mogen et al., 1988), и линейная. В одних штаммах ее масса составляет 90 kb (pCSL1), в других – 140 kb (pCSL2) (Brown et al., 2002). У *Smm* обнаружено наличие двух кольцевых плазмид pCM1 (27 kb) и pCM2 (70 kb) (Meletzus et al., 1993). Были обнаружены некоторые штаммы *C. michiganensis*, не содержащие плазмид, но, как оказалось, плазмидные гены у этих штаммов встроены в бактериальную хромосому (Mogen et al., 1988). Получение штаммов свободных от плазмид показало, что именно плазмидные гены являются генами вирулентности. Так, штамм *Sms*, лишенный плазмиды pCS1, неспособен вызывать развитие заболевания, хотя колонизация растения все же происходит (Laine et al., 2000). Отсутствие обеих плазмид у *Smm* приводит к проявлению неvirulentного фенотипа, по сути «трансформируя» фитопатоген в эндофитную бактерию (Meletzus et al., 1993).

Дальнейшая работа привела к обнаружению предположительных генов вирулентности *celA* (Jahr et al., 2000) и *pat-1* (Dreier et al., 1997). У *Sms* ген *celA* локализован на плазмиде pCS1 и отвечает за синтез секретируемой целлюлазы, необходимой для проявления вирулентности. Бактерии с делецией данного гена сохраняли способность колонизировать растение, но

теряли способность вызывать симптомы заболевания. Аналогичные результаты были получены в экспериментах с *Cmm* (Jahr et al., 2000; Laine et al., 2000). Но что интересно, штаммы, дефектные по данному гену и не способные вызывать заболевание растения хозяина, не теряли способности индуцировать развитие реакции сверхчувствительности у табака (Nissinen et al., 2001). Данный факт можно объяснить основными положениями современной теории фитоиммунитета: развитие реакции СЧ происходит в результате активации защитных реакции, индуцируемых эффекторами патогена. Главная функция эффекторов заключается в подавлении неспецифической защиты, и они не являются факторами вирулентности в классическом понимании этого термина, т.е. не участвуют в непосредственно губительном действии на клетки растения.

Вторым предположительным геном вирулентности был ген *pat-1Cmm*, ответственный за синтез сериновой протеазы. У *Cms* было обнаружено наличие 11 гомологов гена *pat-1*. Восемь генов локализованы на хромосоме (chromosomal homology to *pat-1*, *Chp*), два – на плазмиде pCS1 и один – на плазмиде pCSL1(plasmid homology to *pat-1*, *Php*) (Bentley et al., 2008). Один из локализованных на хромосоме генов – *chp-7* – необходим для проявления вирулентности. Мутация в гене *chp-7* снижала проявление симптомов заболевания у картофеля и подавляла способность патогена индуцировать развитие реакции сверхчувствительности у растений табака (Gartemann, Eichenlaub, 2001; Nissinen et al., 2009). Непатогенный штамм *Cmm*, несущий мутацию гена *chpG*, неспособен вызывать заболевание томата, а также индуцировать развитие реакции СЧ у *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana benthamiana* и *Mirabilis jalapa* (Załuga et al., 2014).

Помимо самих факторов вирулентности, были обнаружены факторы транскрипции, ответственные за регуляцию их экспрессии. У *Cmm* обнаружено два регулятора транскрипции генов вирулентности – *Vatr1* и *Vatr2*. Штаммы, несущие мутации по генам *vatr1* и *vatr2*, показали

ослабленную способность вызывать симптомы заболевания (Savidor et al., 2014).

Наряду с уже указанными ферментами деградации клеточной стенки сериновой протеиназой Pat-1 и целлюлазой CelA, во время инфицирования растений томата *Cmm* увеличивает секрецию множества других гидролитических ферментов, например, ксилоназы XysA, гликозилгидролазы NagA, сериновых протеиназ семейства Sbt и др. (Chalupowicz et al., 2010; Savidor et al., 2012). Изменение экспрессии предположительных генов вирулентности осуществляется также у *Cms* при контакте с растительными клетками (Holtmark et al., 2008). Несмотря на тот факт, что обнаружено изменение экспрессии этих дополнительных ферментов, основная роль в реализации вирулентности и подавлении защитных реакций растения (а у растений табака в их индукции – СЧ) отводится сериновым протеиназам.

В данный момент ведутся работы по поиску субстрата секретлируемых патогеном сериновых протеаз (Eichenlaub, Gartemann, 2011; Flügel et al., 2012; Savidor et al., 2012). Остается неизвестным, какова их функция, подвергают ли они протеолизу бактериальные или растительные белки, активируют ли сигнальные механизмы растения, приводящие к развитию защитных реакций. Одним из последних значимых достижений в данном вопросе стало открытие факта участия сериновых протеиназ в регуляции формирования биопленок *Cmm*, хотя механизм этот на данный момент остается неизвестен (Chalupowicz et al., 2012).

1.7. Способность к формированию биопленок как фактор патогенности возбудителей заболеваний растений

Большинство микроорганизмов в естественных и искусственно созданных окружающих средах существует в виде структурированных, прикрепленных к поверхности сообществ – биопленок (Donlan, 2002). Эти естественные сообщества бактерий, окруженные полисахаридным

матриксом, функционируют как скоординированный консорциум (Costerton et al., 1999). Несмотря на многочисленные наблюдения роста бактерий в виде биопленок, общая теория преобладания биопленок микроорганизмов над их свободноживущими формами была постулирована лишь в 1978 г (Christensen, 1989). Согласно этой теории, бактерии основную часть времени развития и размножения находятся в матриксе биопленки, прикрепленной к поверхностям богатых питательными веществами экосистем, и эти прикрепленные клетки физиологически отличны от клеток того же штамма, взвешенных в среде (Costerton et al., 1999). В принципе, планктонную стадию можно рассматривать лишь как способ перемещения микробной клетки от одной поверхности к другой, то есть кратковременное состояние в жизни бактерий. Развитие биопленочных сообществ является одной из основных стратегий выживания бактерий в занимаемой ими экологической нише. Бактерии в прикрепленном состоянии, будучи интегрированными в биопленку, защищены от повреждающих факторов внешней среды и антибактериальных препаратов в организме хозяина при инфекции.

Межклеточные коммуникации в биопленке осуществляются в том числе при участии регуляторного механизма, получившего название «чувство кворума» (quorum sensing, QS) (Neu et al., 1994; Ильина и др., 2006). Образование биопленок является сложным многошаговым и строго регулируемым биологическим процессом. Индивидуальные члены сообщества имеют «специфические обязанности», которые, комбинируясь с другими, усиливают жизнеспособность всего консорциума, что подтверждается экспрессией в разных клетках одной биопленки разных генов и синтезом белков различного назначения.

Образование биопленок начинается с того, что одна или несколько клеток закрепляются на поверхности и, потребляя питательные вещества из протекающей жидкости, начинают там активно размножаться. Затем бактерии выделяют экстраклеточные полимеры, адгезия которых к

поверхности обеспечивает им более прочное прикрепление. Заключительный этап биологического обрастания – рост микроорганизмов. Он является тем процессом, который приводит к увеличению численности и биомассы осевших и прикрепившихся микроорганизмов. Поверхностные бактериальные структуры и внеклеточные экзометаболиты (жгутики, липолисахариды, экзополисахариды) в сочетании с внешними сигналами и сигналами QS играют решающую роль в автоагрегации и образования биопленок у большинства видов бактерий (Schembri et al., 2001; Vogino et al., 2013).

Формирование биопленок на растениях характерно для симбиотических и патогенных микроорганизмов, но каким образом растения регулируют эти отношения – на данный момент не до конца изучено. Некоторые бактерии в матриксе биопленок индуцируют рост растения и защищают его от фитопатогенов (данное явление названо «биоконтроль»), в то время как другие вызывают развитие заболеваний (Vogino et al., 2013).

Многие виды микроорганизмов сопутствующей почвенной микрофлоры, включая ризобактерий, формируют микроколонии или биопленки в процессе колонизации корней растений (Rinaudi, Giordano, 2010).

Образование биопленок также определяет проявление вирулентности фитопатогенных микроорганизмов за счет следующих механизмов: блокирование ксилемного тока, увеличение резистентности к растительным антимикробным соединениям (Mansfield et al., 2012).

Фитопатогенные микроорганизмы формируют биопленки как на поверхности растения (корень, лист), так и в тканях – так называемые васкулярные патогены, колонизирующие сосуды растения. Показано, что на корнях растений способен формировать биопленки фитопатоген *Agrobacterium tumefaciens* (Matthysse et al., 2005). Возбудитель рака у цитрусовых *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* формирует биопленки на поверхности листа. Причем, существенную роль в формировании биопленок

играют жгутики (флагеллин) (Malamud et al., 2011), которые обеспечивают способность адгезированных клеток мигрировать по поверхности для распространения биопленки (Pratt, Kolter, 1998), что играет большую роль для вирулентности данного патогена, так как проникать в растение он способен только через устьица (Brunings, Gabriel, 2003).

Для развития системного заболевания и проявления вирулентности васкулярным патогенам необходимы следующие факторы: образование обширных бактериальных агрегатов и биопленок на поверхности клеток ксилемы, синтез экзополисахаридов для блокирования ксилемного тока и развития симптомов, использование QS для регуляции колонизации ксилемы (Danhorn, Fuqua, 2007). Для грамотрицательных васкулярных патогенов, таких как *P. stewartii* ssp. *stewartii*, *X. fastidiosa*, и *Erwinia amylovora*, было показано, что ЭПС необходимы для формирования биопленок и, следовательно, проявления вирулентности (vonBodman et al., 2003; Danhorn, Fuqua, 2007; Koczan et al., 2009, 2011; Vrancken et al., 2013).

Для *Stm* показано, что факторы вирулентности, а именно сериновые протеазы, кодируемые на плазмиде и участке патогенности хромосомы *chp/tomA*, определяют способность бактерий к образованию биопленок, акропетальному и базипетальному продвижению по сосудистой системе растений томата. Штаммы, лишённые плазмиды, а также штаммы, несущие мутацию участка *chp/tomA*, не способны были формировать биопленки, как на синтетических средах, так и в тканях растения (Chalupowicz et al., 2012).

1.8. Выводы из обзора литературы

Растения в ходе своей эволюции под действием окружающей среды для того, чтобы выжить, выработали ряд защитных механизмов. Механизмы защиты от агрессивного действия разнообразных по своей природе патогенов сложились в сложную иммунную систему. Для активации защитных реакций растению необходима эффективная система восприятия несовместимого

инфекционного агента – рецепторная система. Растительные рецепторы способны распознавать большой спектр патогенов и запускать пути трансдукции сигнала, приводя к активации иммунных реакций. Врожденная иммунная система растений имеет два уровня: неспецифический иммунитет (PTI), активируемый широким диапазоном патогенов, и специфический иммунитет (ETI), запускаемый при узнавании эффекторов авирулентного патогена. Запуск защитных реакций, как при неспецифическом, так и при специфическом ответе, происходит при активации аналогичных молекулярных процессов – перераспределения ионов кальция в клетке, образования активных форм кислорода и азота, изменения редокс статуса антиоксидантов, синтеза салициловой и жасмоновой кислот. Вероятнее всего, различия между специфическим и неспецифическим ответом состоят лишь в интенсивности реакций. Механизмы сигнальных путей тонко регулируются и тесно переплетаются, результатом их работы является активация экспрессии синтеза защитных соединений. Специфический эффектор-индуцируемый иммунитет сопровождается запуском реакции сверхчувствительности – локальной гибели клеток по типу ПКС в месте инфицирования, для ограничения распространения патогена. Для процесса активации СЧ-реакции характерно резкое изменение концентраций внутриклеточного Ca^{2+} , генерация АФК и NO, и как следствие – активация протеаз и нуклеаз.

Важнейшим значением феномена реакции сверхчувствительности является индуцирование «сигналов тревоги» и их распространение через плазмодесмы и ксилему по всему растению и даже за его пределами, посредством оповещения других растений популяции, что обеспечивают летучие сигнальные молекулы, например, метилжасмонат. В результате трансдукции «сигналов тревоги» происходит развитие системной устойчивости – активация экспрессии защитных генов, и, как результат, сенсibilизация защитных сил растительного организма.

Наименее изученными участниками иммунных реакций растений являются БТШ. Их функции в качестве шаперонов при разнообразных видах стресса, в процессах фолдинга полипептидов хорошо известны. Инфицирование патогеном также приводит к индукции синтеза белков теплового шока Hsp70, Hsp90, и Hsp100 семейств. Участие отдельных БТШ, таких как Hsp70 и Hsp90, доказано, и механизмы реализаций иммунного ответа с их участием изучены более менее полно. Роль других представителей семейства белков теплового шока еще только изучается. Так эффект Hsp101 на реализацию иммунного ответа показан, но механизм действия еще не известен.

Clavibacter michiganensis ssp. *sepedonicus* – фитопатогенная грамположительная бактерия, вызывающая заболевание «кольцевая гниль картофеля». *Cms* относится к васкулярным фитоптогенам, так как распространяется по ксилеме растения и, формируя там биопленочные образования, приводит к закупорке сосудистой системы растения, что реализуется в симптомах заболевания – вилт и хлороз растений картофеля. Данная способность формировать биопленки является фактором патогенности и определяет исход взаимоотношений патогена и растения. В то же время, влияние факторов резистентности растения на процесс образования фитопатогенами биопленок практически не изучено.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

В работе использовались:

1) Суспензионная культура клеток табака *Nicotiana tabacum* (L.) (сорт Самсун). Культуру выращивали при 26°C на среде Мурасиге-Скуга (MS) (Murashige, Skoog, 1962), содержащей 20г/л сахарозы, 1мг/л тиамин, 0,5мг/л пиридоксин, 1мг/л нафтил-уксусной кислоты, 80мг/л инозита (pH 5,7 – 5,8).

2) Суспензионные культуры клеток, полученных из растений табака трансформированных *Agrobacterium tumefaciens* штамм LBA 4400, несущих вектор pBiCaMV с генами *npt* и *hsp101* в смысловой ориентации под управлением 35S промотора, кодирующего белок теплового шока Hsp101 из *A. thaliana*. Трансгенные растения *N. tabacum* были получены Т.В. Копытиной в лаборатории физиологии трансгенных растений СИФИБР СО РАН (Maximova et al., 2012). Культуру выращивали при 26°C на среде MS, содержащей 20г/л сахарозы, 1мг/л тиамин, 0,5мг/л пиридоксин, 1мг/л нафтил-уксусной кислоты, 80мг/л инозита (pH 5,7 – 5,8).

3) Суспензионная культура клеток картофеля *Solanum tuberosum* (L.) (сорта Жуковский ранний, Луговской, Лукьяновский), выращенная при 26°C на MS среде, содержащей 20г/л сахарозы, 1мг/л тиамин, 0,5мг/л пиридоксин, 5мг/л никотиновой кислоты, 80мг/л инозита, 1мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-D) (pH 5,7 – 5,8).

4) Суспензионная культура клеток арабидопсиса *Arabidopsis thaliana* (L.) Неун (раса Columbia), выращенная при 26°C на MS среде, содержащей 30г/л сахарозы, 0,5мг/л тиамин, 0,5мг/л пиридоксин, 0,1мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-D) (pH 5,7 – 5,8).

Суспензионные культуры растительных клеток поддерживали путем еженедельного шестикратного разведения выросшей суспензии свежей средой.

Для экспериментов использовали 5-ти суточную культуру, выращенную при 26°C в роторном шейкере при 130 об/мин в темноте, что соответствовало второй половине логарифмической фазы роста, которая характеризуется наибольшей физиологической активностью клеток.

5) Растения табака *N. tabacum*, культивируемые *in vitro*, *in vivo*.

6) Растения картофеля *S. tuberosum* (сорта Луговской, Лукьяновский), культивируемые *in vitro*.

Растения выращивались на агаризованной среде MS, содержащей 5мл/л Fe-хелата, 1мг/л пиридоксина, 0,5мг/л тиамина, 0,8мг/л феруловой кислоты, 20г/л сахарозы, 5г/л агара (рН 5,8) при температуре 24-25°C днем и 19-20°C ночью, с освещенностью 5-6 кЛх и продолжительностью фотопериода 16 часов.

7) Возбудитель кольцевой гнили картофеля – *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, штаммы CIC 31, CSR14 (предоставлены М. Metzler, Finland), штамм Ac1405 (получен из ВКМ, г.Пушино).

Бактериальную культуру поддерживали на агаризованной среде С следующего состава: 10г/л пептона, 5г/л дрожжевого экстракта, 5г/л глюкозы, 5г/л NaCl, 7 г/л агара (рН 7,2) (Meletzus, Eichenlaub, 1991).

Для эксперимента бактерии культивировали при 26°C без освещения с постоянной аэрацией путем качания в жидкой среде С до логарифмической фазы роста.

Для изучения влияния экзометаболитов *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus* на развитие защитных реакций табака использовали следующие модификации:

1. фильтрат, лишенный бактериальных клеток (cell free culture filtrate, CF) – бактериальную суспензию центрифугировали 5 минут при 8 500 g и пропускали через мембранный фильтр (диаметр пор 0,22 мкм);

2. термически инактивированная бактериальная суспензия (dead culture, DC) – бактериальную суспензию выдерживали 5 минут при 100°C и охлаждали до комнатной температуры.

8) *Escherichia coli* штамм XL-1Blue.

Бактериальную культуру поддерживали на мясо-пептонном агаре (МПА) при 26°C без освещения. Для эксперимента бактерии стационарно культивировали при 26°C без освещения в мясо-пептонном бульоне (МПБ).

2.2. Заражение суспензионных культур клеток и растений *in vitro*

Для изучения реакции растений *in vitro* на заражение бактериальной суспензией применялся метод инокуляции листьев в асептических условиях. Листья трехнедельных растений инокулировались 3 мкл суспензии *Cms* с титром, равным 10^7 КОЕ/мл, а также суспензии *E. coli* с титром 10^7 КОЕ/мл путем укола. Метод инфицирования листьев посредством укола для изучения ответной реакции растений описан в работе Nissinen и соавторов (Nissinen et al., 1997). Кроме того, осуществляли заражение растений через корневую систему путем внесения бактериальной суспензии шприцом в питательную среду. Растения выдерживали в условиях 16-часового светового дня с контролируемым режимом выращивания при температуре 24 – 25°C днем, 19 – 20°C ночью, освещенностью 5 – 6 kLx.

Для совместного культивирования растительной суспензии с *Cms* в коническую колбу на 50 мл вносили 8 мл суспензионной культуры клеток табака, картофеля или арабидопсиса и добавляли 600 мкл стерильной среды С (контрольный вариант) или 600 мкл бактериальной суспензии с оптической плотностью 0,3, что соответствовало титру 10^7 КОЕ/мл. Оптическую плотность бактериальной суспензии определяли на планшетном фотометре

("BioRad") против дистиллированной воды при длине волны 600 нм. Совместное культивирование осуществляли при 26°C на качалке. Жизнеспособность растительных клеток определяли через 6, 8, 12, 24, 48 и 72 часа совместного культивирования с помощью метода, основанного на реакции восстановления ТТХ (Еникеев и др., 1995).

2.3. Температурная обработка

Для создания теплового стресса для изучения индукции синтеза белков теплового шока, а также для проведения предварительной тепловой обработки суспензионные культуры растений инкубировали на водяном термостате Еран 357 (Польша).

Для суспензионной культуры *N. tabacum* применяли следующие условия температурной обработки: 37°C в течение 120 мин, 39°C в течение 120 мин, 43°C в течение 60 мин, 46°C в течение 40 мин, 50°C в течение 10 мин (Rikhvanov et al., 2007).

Для предварительной тепловой обработки суспензионных культур *N. tabacum* и *S. tuberosum* перед последующим заражением бактериальной суспензией использовали температурную обработку 37°C в течение 120 минут, затем культуру клеток выдерживали 120 минут при 26°C.

2.4. Определение выживаемости клеток по реакции восстановления ТТХ

Выживаемость клеток суспензионных культур после ко-культивирования с фитопатогенной бактерией *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* определяли по реакции восстановления 2,3,5-трифенилтетразолий хлорида (ТТХ) по ранее опубликованному методу (Еникеев и др., 1995). Интенсивность восстановления ТТХ свидетельствует о эффективности дыхания клеток растительной культуры. Для определения восстановления ТТХ навеску биомассы заливали 0,05%-ным раствором ТТХ

в 0,05М KH_2PO_4 и выдерживали 3 ч в темноте при 26°C без качания (для создания анаэробнобиоза). Образовавшийся формазан экстрагировали из клеток 95% этанолом при 60°C 15 мин на минитермошейкере TS-100 (“BioSan”, Латвия), полученный раствор колориметрировали при 490 нм на фотоэлектроколориметре ФЭК-46. Экстинкцию рассчитывали на 1 г сырого веса.

2.5. Изучение изменения морфологических параметров клеток растений при действии *Cms*

Для изучения морфометрических параметров растительных клеток табака при заражении возбудителем кольцевой гнили картофеля применялся метод световой микроскопии.

В данной работе для микроскопического анализа растительных клеток при совместном культивировании с фитопатогеном *Cms* также использовали двойное окрашивание флуоресцеин диацетатом (FDA) и пропидий иодидом (PI). Накопление FDA в цитоплазме является показателем целостности клеточной мембраны и метаболической активности клеток, а окрашивание PI свидетельствует о гибели клетки.

Для окрашивания использовали пропидий иодид (в конечной концентрации 10 мкг/мл) и флуоресцеин диацетат (10мМ). Красители добавляли в культуральную среду после совместного культивирования растительных клеток и бактерий *Cms*, инкубировали 2 мин при 26°C и использовали для микроскопического анализа. Для этого использовали инвертированный флуоресцентный микроскоп AxioObserverZ1 (Германия) с цифровой монохромной камерой AxioCamMRm3 и пакетом программного обеспечения для захвата и анализа изображений AxioVisionRel.4.6.

2.6. Определение количества пероксида водорода

Образование пероксида водорода клетками суспензионных культур табака и картофеля определялось с использованием индикатора ксиленоловый оранжевый. Метод основан на реакции восстановления гидропероксида ионами железа в растворе кислоты с образованием комплекса железа с индикатором ксиленоловый оранжевый. Из-за нестабильности реагентов растворы готовили непосредственно перед опытом: 25 мМ FeSO₄ и 25 мМ (NH₄)₂SO₄ разводили в 2,5 М H₂SO₄. 1 мл этого раствора добавляли к 100 мл раствора 125 мкМ ксиленолового оранжевого и 100 мМ сорбитола. В различные временные точки совместного культивирования растительной и бактериальной культур 300 мкл культуры клеток помещали в микропробирки типа Эппендорф, центрифугировали (15 сек при 14500 g) и 100 мкл супернатанта переносили к 1 мл индикатора (ксиленоловый оранжевый). Реакционную смесь инкубировали 30 мин при комнатной температуре. Полученный раствор колориметрировали при 560 нм на фотоэлектроколориметре ФЭК-46. Количество пероксида водорода определяли по калибровочной кривой, построенной на основании разных концентраций H₂O₂ (Bindschedler et al., 2001).

2.7. Выделение суммарного белка

Для выделения суммарного белка суспензионную культуру фильтровали, промывали дистиллированной водой и брали навеску 0,5г. Затем образцы ткани замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -70°C. Перед выделением клетки размораживали, ресуспендировали в буфере для выделения белка (0,1М Трис-НСl, 0,003М ДДС-На, 0,001М β-меркаптоэтанол, рН 7,4 – 7,6), в соотношении 1:4, добавляли 0,5-1мМ фенилметилсульфонилфлюорид (ФМСФ) для ингибирования протеаз, замораживали жидким азотом и тщательно растирали с кварцевым песком в ступке. Грубые клеточные компоненты

удаляли центрифугированием при 15000g в течение 15 мин на центрифуге К-24 (ГДР). Белок из супернатанта осаждали трехкратным объемом охлажденного ацетона. Осадок белка растворяли в буфере для образца Sb (0,625M Трис-НСl, 0,008M ДДС-Na, 0,1M β-меркаптоэтанол, 10% глицерин pH 6,8), инкубировали 5 мин при 100°C, центрифугировали 15 мин при 5000g (Побежимова и др., 2004). Концентрацию белка определяли по методу Лоури (Lowry et al., 1951). Затем разводили с Sb с бромфеноловым синим (0,625M Трис-НСl, 0,008M ДДС-Na, 10% глицерин, 0,001% бромфеноловый синий, pH 6,8). Количество белка в образцах при электрофорезе составляло 50 мкг на трек.

2.8. Электрофорез в полиакриламидном геле

Электрофорез проводили в блоках полиакриламидного геля размером 70x80x1 мм по модифицированной системе Лэммли (Laemmli, 1970), используя прибор для электрофореза Mini-PROTEAN III Electrophoretic Cell ("Bio-Rad", США) по прилагаемой инструкции.

Стеклянные пластины, одна из которых несколько длиннее другой (83x102 и 73x102 мм) вставляли в устройство для заливки геля, прилагаемое к прибору для электрофореза Mini-PROTEAN III. В просвет между стеклянными пластинами заливали раствор мелкопористого полиакриламидного геля, а затем после его полимеризации, заливали крупнопористый гель. В последний погружали зубчатый шаблон для формирования карманов для нанесения проб. Белки наносили на гель, предварительно выровняв их концентрации по методу Лоури. Количество белка в образцах при электрофорезе составляло 50 мкг на трек.

Верхним и нижним электродными буферами служил трис-глицин, pH 8,3 (0,025M Трис-НСl и 0,192M глицин), содержащий 0,1% ДДС-Na. Рабочий гель полимеризовали в 0,375M Трис-НСl буфере, pH 8,8, содержащем 0,1% ДДС-Na, а формирующий гель в 0,0625M Трис-НСl буфере, pH 6,8,

содержащем 0,1% ДДС-Na. Разделяющий гель имел концентрацию 10-14,5% полиакриламида. Для создания ровной верхней границы разделяющего геля на него наслаивали изобутанол, насыщенный водой.

Первые полчаса, когда образцы входят в гель, напряжение –50V на блок. Далее электрофорез проводили при напряжении 180V до тех пор, пока бромфеноловый синий не выходил в раствор. После окончания электрофореза стеклянные пластины вынимали из прибора, и освобожденный гель помещали в камеру для окрашивания или использовали для переноса на нитроцеллюлозную мембрану и последующего иммуноблоттинга.

2.9. Окрашка и обесцвечивание гелей

После окончания электрофореза гели окрашивали в водном растворе, содержащем 0,1% Кумасси R-250 (“Sigma”, США), 25% изопропанол, 10% уксусную кислоту. Для обесцвечивания фона гели переносили в раствор, содержащий 7% уксусную кислоту и 12.5% изопропанол, и отмывали.

2.10. Вестерн-блоттинг

Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану (“Sigma”, США) проводили в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя, в Towbin - буфере (0,025 М Трис-HCl, 0,192 М глицин, 10% метанол, pH 9,2) в специальном приборе для блоттинга (“Bio-Rad”, США). Перенос проводили в холодной комнате в течение 2,5 ч, при напряжении 200 V в течение первых 30 мин, а затем 400 V в течение 2 ч. После переноса белков на нитроцеллюлозную мембрану буфер сливали, мембрану помещали в раствор 0,5% красителя Понсо на 20 секунд, после чего ее тщательно отмывали. После этого нитроцеллюлозную мембрану помещали в блокирующий раствор, содержащий 2% сухое обезжиренное молоко, 10 mM Трис-HCl (pH 7,4) и 150 mM NaCl (трис-солевой буфер – TBS), и оставляли на 12 часов при

0-4⁰С. Далее мембрану инкубировали в растворе первичных антител в TBS на минирокере MR-1(“Biosan”, Латвия) в течение 4 ч. После инкубации мембрану отмывали 3 раза по 5 мин от несвязавшихся антител в TBS, содержащем 0,05% Твин-20 (TTBS). Затем мембрану помещали в раствор вторичных антител, конъюгированных со щелочной фосфатазой, и инкубировали на минирокере. После инкубации мембрану вновь отмывали в TTBS от непрореагировавших антител 3 раза по 10 мин, помещали в раствор, содержащий 100 мМ Трис-НСl (рН 9,5), 100 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂, 0,17 мг/мл 5-бromo-4-хлоро-3-индолил фосфата (“Sigma”, США), 0,33 мг/мл нитротетразолия синего (“Sigma”, США), и инкубировали до проявления окраски.

2.11. Определение молекулярных масс полипептидов

Молекулярные массы полипептидов определяли по длине пробега, используя в качестве калибровочной кривой величину пробега стандартного набора белков, в который входили: бычий сывороточный альбумин (66 кДа), овальбумин (45 кДа), трипсиноген (24 кДа), β-лактоглобулин (18,4 кДа) и лизоцим (14,3 кДа) (“Sigma”, США).

2.12. Используемые антитела

В работе использовали антитела, полученные против Hsp101 (Agriseria As 07253, E. Vierling и M. Escobar, University of Arizona, США), Hsp60 (SPA-807, “StressGen”, США), Hsp70/Hsc70 (SPA-820, “StressGen”, США), Антитела были приготовлены на блокирующем растворе, содержащем 2% сухого обезжиренного молока, 10 мМ Трис-НСl (рН 7,4), 150 мМ NaCl и 20 мкМ азида натрия.

2.13. Определение образования биопленок

Для определения образования биопленок применяли метод статического культивирования микроорганизмов в 96-луночных пластиковых планшетах. Способность к биопленкообразованию определяли после совместного культивирования бактериальной и растительной суспензий, как описано выше. После 2х суток совместного культивирования бактериальные клетки отделяли от растительных путем фильтрования ($d=100$ мкм). Суспензию бактерий вносили в лунки планшета в объеме 150 мкл и инкубировали в течение 48 часов при температуре 26°C. После инкубации в оптимальных условиях планктонная фаза популяции бактерий (неприкрепленные клетки бактерий) удаляли вместе с питательной средой, а образовавшуюся биопленку (клетки, адгезированные к лунке) окрашивали. Окрашивание адгезированных клеток проводили с помощью красителя Генциан Виолет (0,1%) в течение 45 минут при комнатной температуре. После отмывки проводили экстракцию 96% этанолом. Концентрацию красителя определяли спектрофотометрически при длине волны 495 нм (Biorad, США). Результат выражали в виде процентного отношения от контроля – образования биопленок данным микроорганизмом при культивировании в среде MS без внесения растительных клеток (Merritt et al., 2005).

2.14. Статистическая обработка результатов

Во всех случаях биологическая повторность экспериментов была 2 – 8 кратная. Полученные данные обработаны статистически: рассчитаны средние значения и ошибка среднего. Для оценки различий между отдельными показателями использовали расчет критерия Уилкоксона – Манна – Уитни (Ивантер, Коросов, 2010).

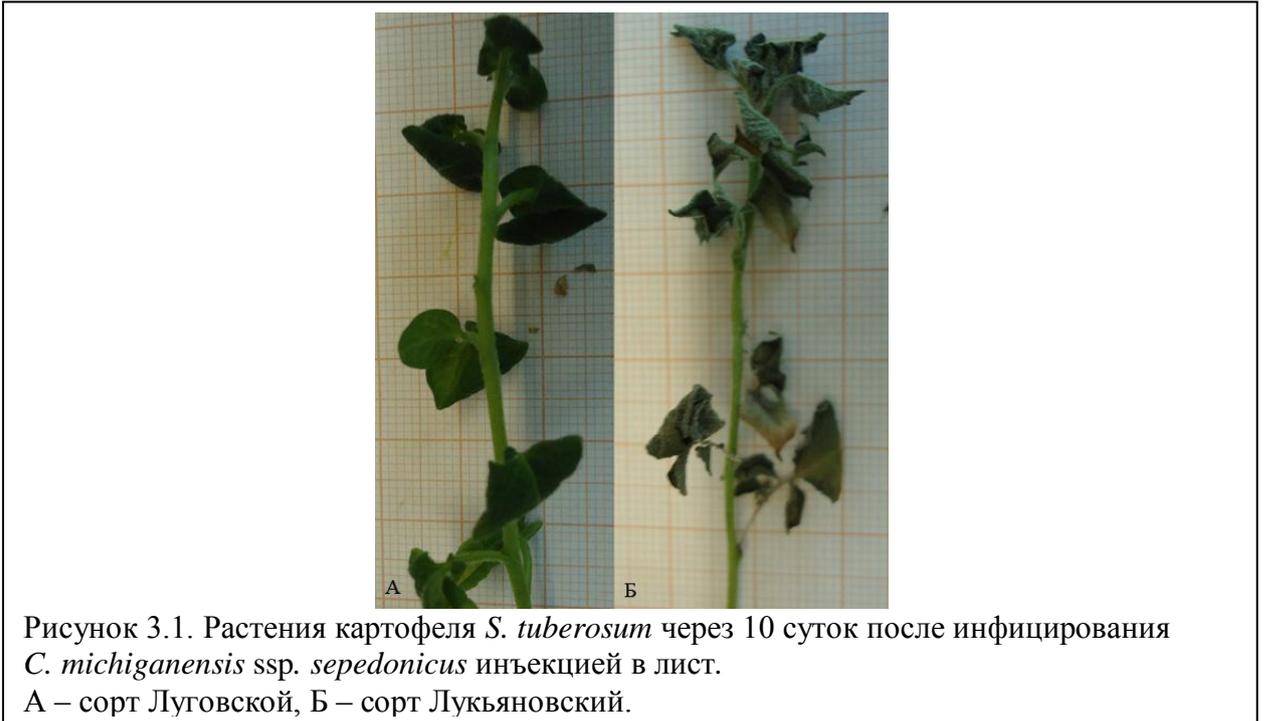
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Изучение ответных реакций растений *in vitro* на действие *Cms* при совместимых и несовместимых взаимоотношениях организмов

3.1.1. Ответные реакции картофеля на воздействие *Cms*

C. michiganensis ssp. *sepedonicus* – грамположительная фитопатогенная бактерия, вызывающая у растения-хозяина системное заболевание – кольцевую гниль картофеля. Ранее было показано, что проникновение патогена *Cms* в растения картофеля *in vitro* происходит как у устойчивого сорта, так и у восприимчивого, но с различной временной динамикой (Папкина и др., 2013). В полевых условиях, инфицирование *Cms* устойчивого сорта картофеля Луговской не приводило к развитию симптомов, таких как wilt, хлороз листьев. Но хранение зараженных клубней устойчивого сорта картофеля приводило к появлению типичных симптомов кольцевой гнили в клубнях. Заражение восприимчивого сорта Лукьяновский приводило к развитию симптомов в конце вегетационного периода (90 суток) (Перфильева и др., 2013).

В настоящей работе заражение растений картофеля, культивируемых *in vitro*, суспензией *Cms* посредством укола в листовую пластинку (Nissinen et al., 1997), а также внесением в прикорневую зону растений, подтверждало имеющиеся данные относительно устойчивости к данному фитопатогену изучаемых сортов картофеля (Рис. 3.1.). Растения картофеля устойчивого сорта Луговской не проявляли симптомов развития заболевания и признаков развития локальных некрозов (СЧ-реакции). У растений восприимчивого к данному патогену сорта Лукьяновский через 10 суток наблюдался wilt – увядание листьев в результате нарушения ксилемного тока и поступления питательных веществ (Рис. 3.1.).



Таким образом, можно сказать, что растение-хозяин – картофель – на внедрение возбудителя кольцевой гнили не отвечает активацией реакции сверхчувствительности. Несмотря на это, устойчивость сорта Луговской обеспечивается индукцией некоторых защитных механизмов, проследить которые на уровне целого растения невозможно, в связи с чем дальнейшие исследования проводились на клеточном уровне, используя при этом суспензионные культуры клеток растений.

3.1.2. Ответные реакции растений табака при взаимодействии с *Cms*

Показано, что при заражении возбудителем кольцевой гнили картофеля листьев табака – растения-нехозяина – в месте инфицирования происходит развитие локальных точечных некрозов – проявление реакции сверхчувствительности (Рис. 3.2.), что согласуется с данными, полученными R. Nissinen с коллегами в работах с другими штаммами *Cms* (Nissinen et al., 1997).



Рисунок 3.2. Реакция СЧ на листе табака в месте инокуляции суспензией *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus*.

Развитие реакции СЧ происходило на листьях растений табака культивируемых *in vivo*, *in vitro* при нанесении капли бактериальной суспензии, а также при инфицировании путем укола. Метод инфицирования листьев посредством укола для изучения ответной реакции растений табака описан в работе Nissinen и соавторов (Nissinen et al., 1997).

Инфицирование корневой системы растений табака также сопровождалось развитием некрозов в месте контакта с патогеном (Рис. 3.3.). Данное явление описано нами впервые.

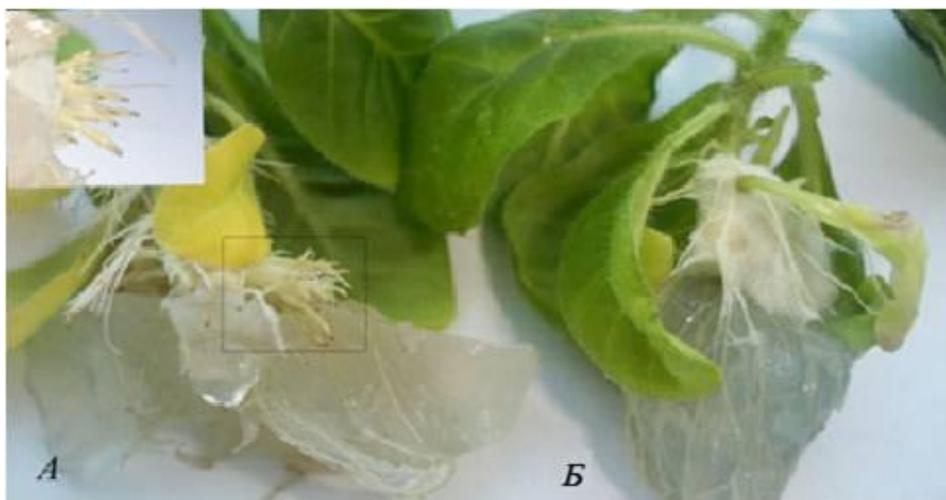
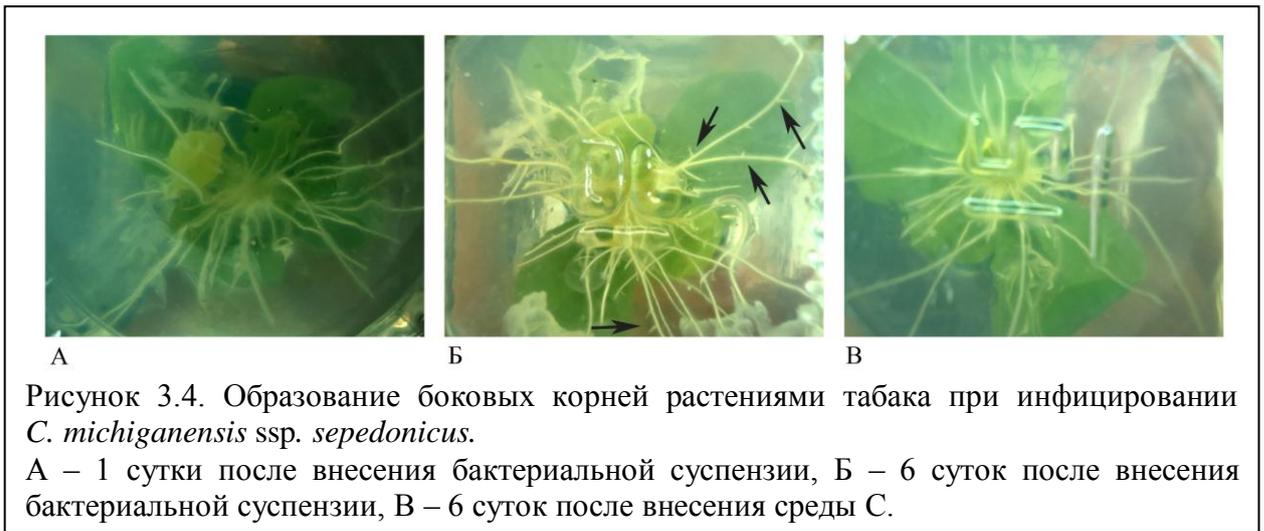


Рисунок 3.3. Локальные некрозы корней растений табака. А – инфицирование *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus*; Б – внесение среды С.

Некрозы по корню не распространялись, т.е. были локальны, что позволяет сделать вывод о возможности развитии реакции сверхчувствительности на корне растения, где, вероятно, сверхчувствительной гибели подвергаются меристематические клетки. Ранее сверхчувствительная гибель клеток меристемы была описана как «верхушечный некроз» для стебля (Шкаликов и др., 2005). Некроз кончика корня сопровождался интенсивным образованием боковых корешков (Рис. 3.4.).



Реакция сверхчувствительности – гибель клеток растения в месте внедрения патогена с целью ограничить распространение его по растению. В гибнущих клетках происходит отложение каллозы и лигнификация клеточных стенок, что создает дополнительный барьер для дальнейшего проникновения микроорганизма.

Можно полагать, что клетки любой растительной ткани способны активировать программу клеточной смерти с целью предотвращения гибели целого организма. Развитие СЧ реакции на кончиках корней растений приводит к локализации инфекции, нарушению дальнейшего роста корней и поступления питательных веществ. Нарушение целостности меристемы снимает апикальное доминирование и пробуждает точки роста боковой

меристемы, в результате чего образуются боковые корни, которые компенсируют потерю клеток апикальной меристемы.

3.2. Развитие системной приобретенной устойчивости у растений табака

Как правило, локальный ответ растения (СЧ реакция) на внедрение патогена индуцирует системную приобретенную устойчивость (СПУ) – повышенную устойчивость растения к повторной атаке тем же самым или иным, даже неродственным патогеном. СПУ обусловлена экспрессией антимикробных белков, обеспечивает долговременную (недели, месяцы) защиту всего организма (системную защиту) от широкого спектра патогенов, включая вирулентные формы (Mur et al., 2008; Vlot et al., 2008).

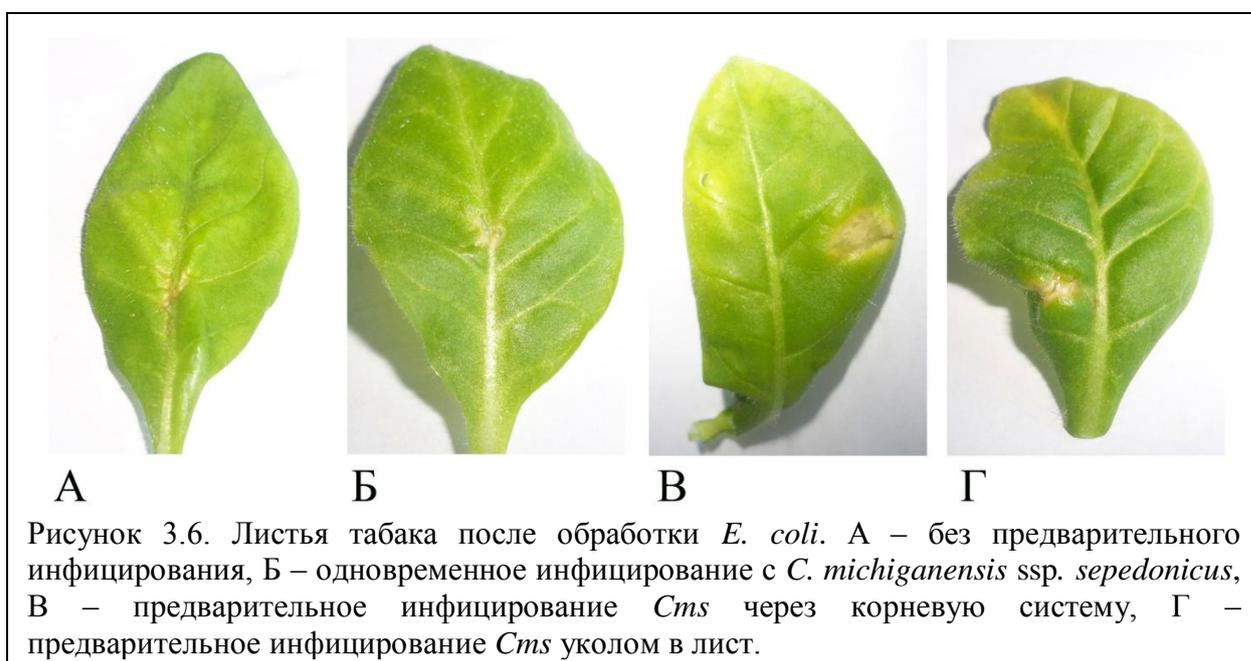
Возможность развития системной приобретенной устойчивости изучалась у растений табака *in vitro* после заражения возбудителем кольцевой гнили. Для вторичного инфицирования использовали нетипичную для растений бактерию *E. coli* не способную вызывать развитие реакции СЧ (Рис. 3.5.).



Рисунок 3.5. Листья табака после инфильтрации суспензии *E. coli*. А – путем нанесения капли бактериальной суспензии на поверхность листа без нарушения его целостности, Б – путем инъекции в жилку листа.

Из представленного рисунка видно, что нанесение капли суспензии *E. coli* на лист растения не вызывало развитие некроза. Инъекция в жилку листа вызывала небольшие механические повреждения листа. Это свидетельствует о том, что независимо от метода воздействия *E. coli* не вызывает развитие видимых ответных реакций, а именно СЧ реакцию у растений табака. Полученные результаты согласуются с основными положениями теории фитоиммунитета: развитие реакции сверхчувствительности возможно при наличии у патогена эффекторов, а у растения – рецепторов, специфически их распознающих и появившихся в ходе длительной эволюции. В системе нетипичный для растений патоген *E.coli* – табак сопряженной эволюции не происходило.

Инъекция *E. coli* в листья растений табака, предварительно зараженных *Cms*, приводила к появлению локальных некрозов в месте вторичной обработки (Рис. 3.6.)



Необходимо отметить, что способ первичного инфицирования *Cms* – инъекцией в лист или в прикорневую зону за 14 суток до внесения *E. coli* – не имел значения. В обоих случаях последующая обработка суспензией *E. coli* сопровождалась развитием СЧ реакции, что свидетельствует о повышении иммунного статуса растений, иначе говоря, о развитии системной

приобретенной устойчивости после первичного инфицирования возбудителем кольцевой гнили. Важно отметить тот факт, что для развития СПУ необходимо время, о чем свидетельствует отсутствие реакции в месте обработки *E. coli* при одновременном инфицировании *Cms*. Таким образом, развитие реакции сверхчувствительности или других реакций специфического уровня иммунитета на внесение нетипичного патогена можно объяснить активацией системной устойчивости у растений табака при действии *Cms*. Активация системной устойчивости растения реализуется в индукции экспрессии генов защитных белков, тем самым повышая иммунный статус растения, который обуславливает защитный ответ к последующему инфицированию (Vlot et al., 2008). Такой генерализованный процесс, как «мобилизация иммунных сил» растительного организма, позволяет активировать реакцию СЧ при детекции у вторичного инфекционного агента (в данном случае, *E. coli*) только молекулярных паттернов, а не эффекторов. Авторы «зигзаг» модели предполагают, что активация СЧ реакции сопровождается не новыми качественными реакциями, а изменением количественных характеристик иммунных реакций, в частности, уровня активных форм кислорода (Jones, Dangl, 2006). Уровень генерации АФК при восприятии одних только молекулярных паттернов ниже, чем при восприятии растительной клеткой эффекторных молекул, сопровождающимся запуском СЧ. Вероятно, СПУ приводит к индукции определенного «предсуществующего» уровня АФК, и повторное восприятие молекулярных паттернов сопровождается генерацией АФК недостающего уровня. Результатом такого «суммирования» является запуск реакции СЧ, как ответ на вторичное инфицирование.

3.3. Влияние экзометаболитов *Cms* на развитие ответных реакций у растений табака

Известно, что факторами патогенности фитопатогенных бактерий, как правило, являются их метаболиты, секретируемые микроорганизмами во внешнюю среду или непосредственно в клетку хозяина. Секреция метаболитов осуществляется специализированными системами секреции бактерий (Mansfield et al., 2012). Для грамположительных патогенов не показано присутствие системы секреции факторов патогенности непосредственно в клетку, и экзометаболиты, например, ферменты деградации клеточной стенки, секретируются во внешнюю среду, но, тем не менее, участвуют в модуляции защитных реакций растения (Setti et al., 2014). В связи с этим, было интересно изучить, участвуют ли экзометаболиты грамположительного фитопатогена *Cms* в индукции реакции сверхчувствительности у табака.

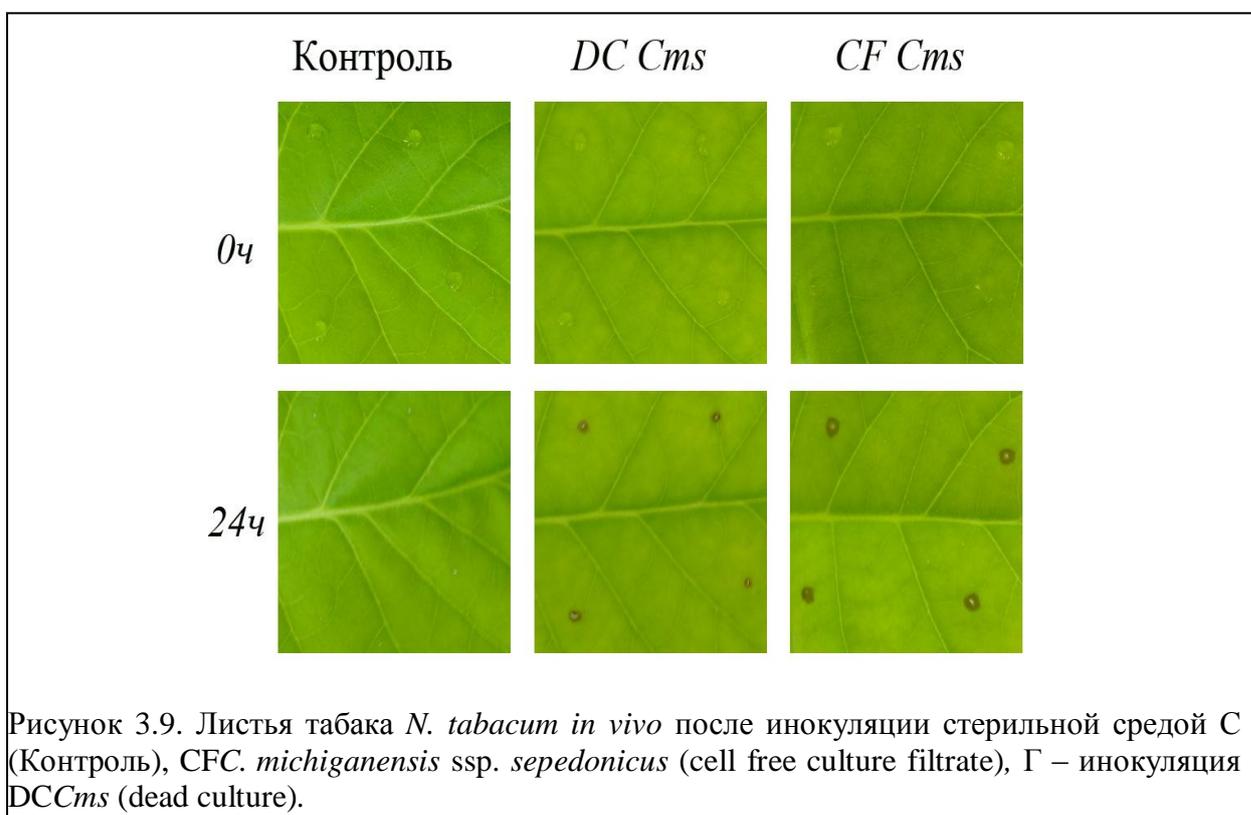
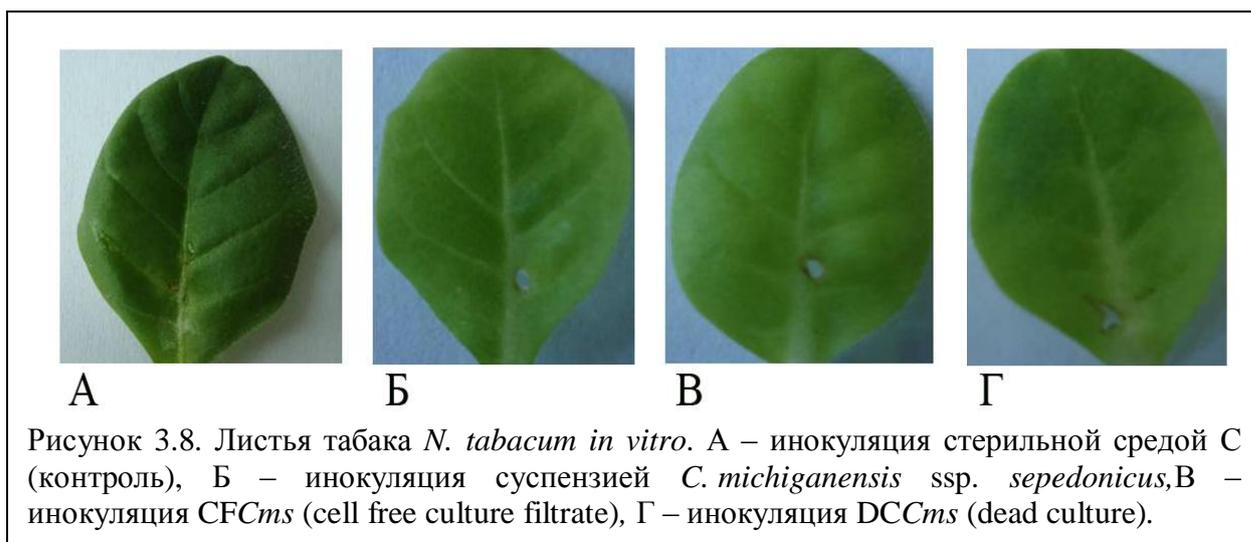
Для изучения влияния экзометаболитов *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus* на развитие локальных защитных реакций табака *in vitro* бактериальную суспензию центрифугировали 5 минут при 8 500 g и пропускали через мембранный фильтр (диаметр пор 0,22 мкм). Фильтрат, лишенный бактерий (CF), инокулировали в прикорневую зону среды культивирования растений табака *in vitro*. Для изучения влияния температуры на активность экзометаболитов *Cms* бактериальную суспензию выдерживали 5 минут при 100°C, и полученную инактивированную бактериальную суспензию (DC) инокулировали в прикорневую зону среды культивирования растений табака *in vitro*. Стерильность фильтрата и инактивированной суспензии контролировали высевом на питательную среду (данные не приведены).

Было установлено, что наряду с бактериальной суспензией возбудителя кольцевой гнили, фильтрат CF *Cms*, а также термически инактивированная

бактериальная суспензия DC *Cms* индуцируют развитие локальных некрозов корня растений табака (Рис.3.7.).



Инокуляция листьев растений табака *in vitro*, *in vivo* CF и DCCms также показала развитие СЧ реакции в месте инъекции. На рисунках 3.8. и 3.9. представлены результаты типичного эксперимента по инфицированию листьев табака *in vitro* и *in vivo*, соответственно.



Полученные данные свидетельствуют о том, что термостабильные экзометаболиты *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus* принимают непосредственное участие в запуске иммунного ответа, а именно реакции СЧ.

В последующих экспериментах проверялась способность экзометаболитов данного патогена индуцировать развитие системной приобретенной устойчивости растений табака. Развитие СПУ

контролировалось инокуляцией бактерий *E. coli* в жилку листа растений, предварительно обработанных фильтратом и термически инактивированной бактериальной суспензией (Рис. 3.10.).



Из представленного рисунка видно, что инокуляция как фильтрата бактериальной суспензии CFCms, так и термически инактивированной бактериальной культуры DCCms в корневую систему растения табака вызывала развитие реакции СЧ при последующем заражении *E. coli* подобно нативной суспензии *Cms*.

Таким образом, можно сказать, что метаболиты, которые выделяет в среду культивирования в процессе своей жизнедеятельности *Cms*, индуцируют развитие защитных реакций у растений табака, таких как реакция сверхчувствительности и сопутствующее ей развитие системной приобретенной устойчивости. Кроме того, действие экзометаболитов сохраняется и после термической обработки 100°C. Современные представления о растительно-микробных взаимоотношениях позволяют предположить присутствие в экзометаболитном комплексе *Cms* термостабильных молекул, обладающих функциями эффекторов.

3.4. Выживаемость культур клеток растений при взаимодействии с бактериальным фитопатогеном *Cms* при совместимых и несовместимых взаимоотношениях организмов

3.4.1. Выживаемость культуры клеток табака при взаимодействии с *Cms*

Было показано, что растения табака *N. tabacum*, культивируемые *in vivo*, *in vitro*, при заражении *Cms* проявляют признаки развития реакции СЧ. Согласно литературным источникам, гибели клеток в ходе развития СЧ реакции присущи основные черты программируемой клеточной смерти. Установлено, что инфицирование листьев вектором на основе ВТМ, содержащим ген про-апоптозного белка млекопитающих Вах, приводит к индукции смерти клеток табака, полностью аналогичной реакции сверхчувствительности, что доказывает единство программ ПКС и реакции сверхчувствительности (Lacomme, Cruz, 1999). Развитие программы самоубийства клетки занимает определенное время, необходимое для передачи сигнала, перепрограммирования экспрессионной активности, синтеза участников ПКС.

В данном исследовании изучение параметров и темпов гибели проводили на суспензионной культуре клеток растений. Для изучения выживаемости клеток культуры табака при совместном культивировании с *Cms* растительную культуру во второй половине логарифмической фазы роста инокулировали бактериальной суспензией. Выживаемость растительных клеток оценивали по их способности восстанавливать ТТХ. В качестве контроля использовали суспензионную культуру клеток табака без заражения данным фитопатогеном. Выживаемость клеток анализировали через 24, 48 и 72 часа совместного культивирования. Результаты представлены в виде абсолютных значений восстановления ТТХ, экстинция рассчитана на 1г сырого веса (Таблица 3.1.).

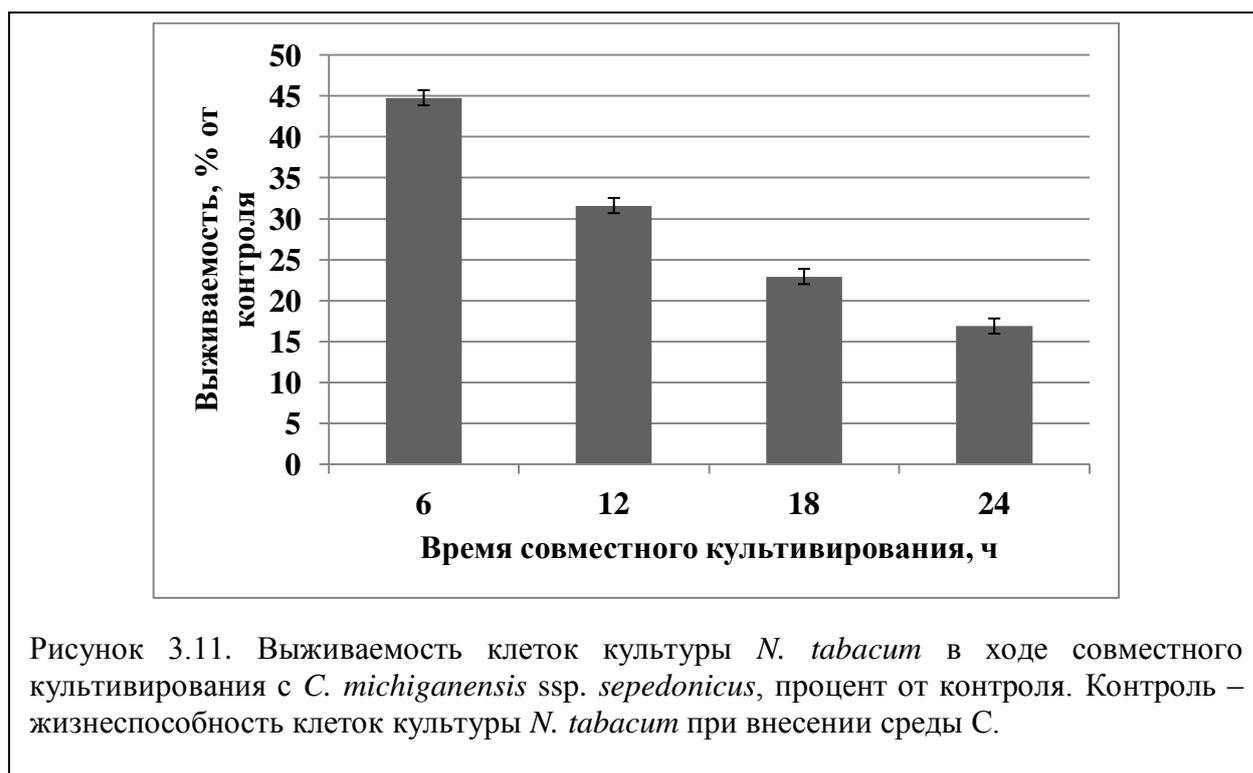
Таблица 3.1.

Выживаемость клеток культуры *N. tabacum* при совместном культивировании с *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus* в течение 24, 48, 72 ч.

Время совместного культивирования, ч	Вариант обработки	Среднее, OD 490 нм ед/г $\bar{x} \pm S_x$
0	контроль	5,01±0,84
24	контроль	4,88±0,51
	<i>Cms</i>	1,14±0,41
48	контроль	5,11±0,45
	<i>Cms</i>	0,64±0,34
72	контроль	3,73±0,65
	<i>Cms</i>	0,08±0,03

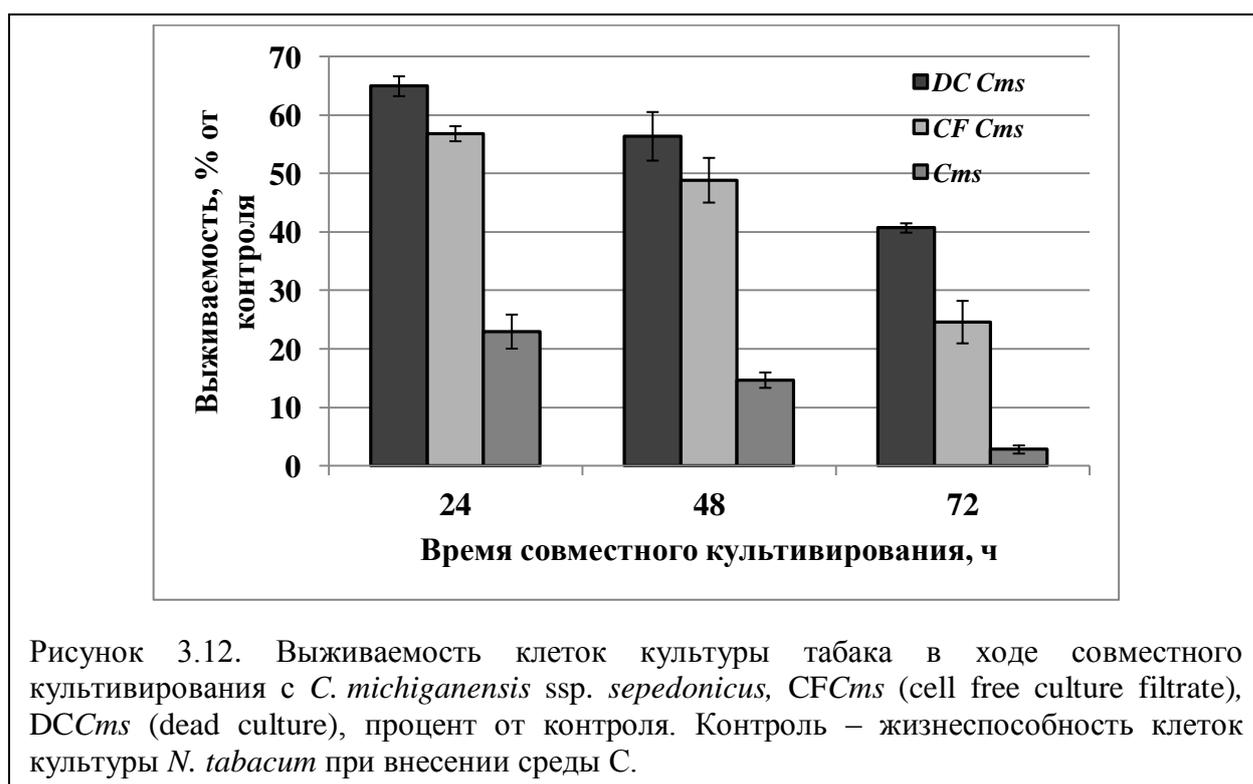
Как видно из таблицы, гибель клеток табака наблюдается уже в первые сутки совместного культивирования. Во вторые и третьи сутки совместного культивирования наблюдается дальнейшее снижение процента живых клеток. Через 72 часа гибель клеток практически 100%.

Для более детального изучения динамики гибели растительных клеток, их жизнеспособность определялась через 6, 12, 18 и 24 часа совместного культивирования. Результаты представлены в виде процента от контроля (Рис. 3.11.). В качестве контроля использовали жизнеспособность клеток табака после внесения среды С.



Как видно из представленного рисунка, процент живых клеток культуры табака через 6 часов после внесения бактериальной суспензии составляет уже только 45%. С течением времени процент живых клеток продолжает снижаться – через 12 часов это уже 30%, а через 24 часа совместного культивирования – 18%. Скоротечность процесса гибели свидетельствует о специфичности протекающих реакций – механизмах развития ПКС. Так, в работе Yoda и соавторов показано, что белковый эффектор фитопатогенного гриба *Phytophthora cryptogea* криптогеин вызывает снижение выживаемости клеток культуры табака на 20% через 12 часов совместного культивирования (Yoda et al., 2006). Для культуры клеток петрушки *Petroselinum crispum* показана гибель 60% клеток через 8 часов после инфицирования фитопатогеном *Phytophthora infestans* (Naton et al., 1996).

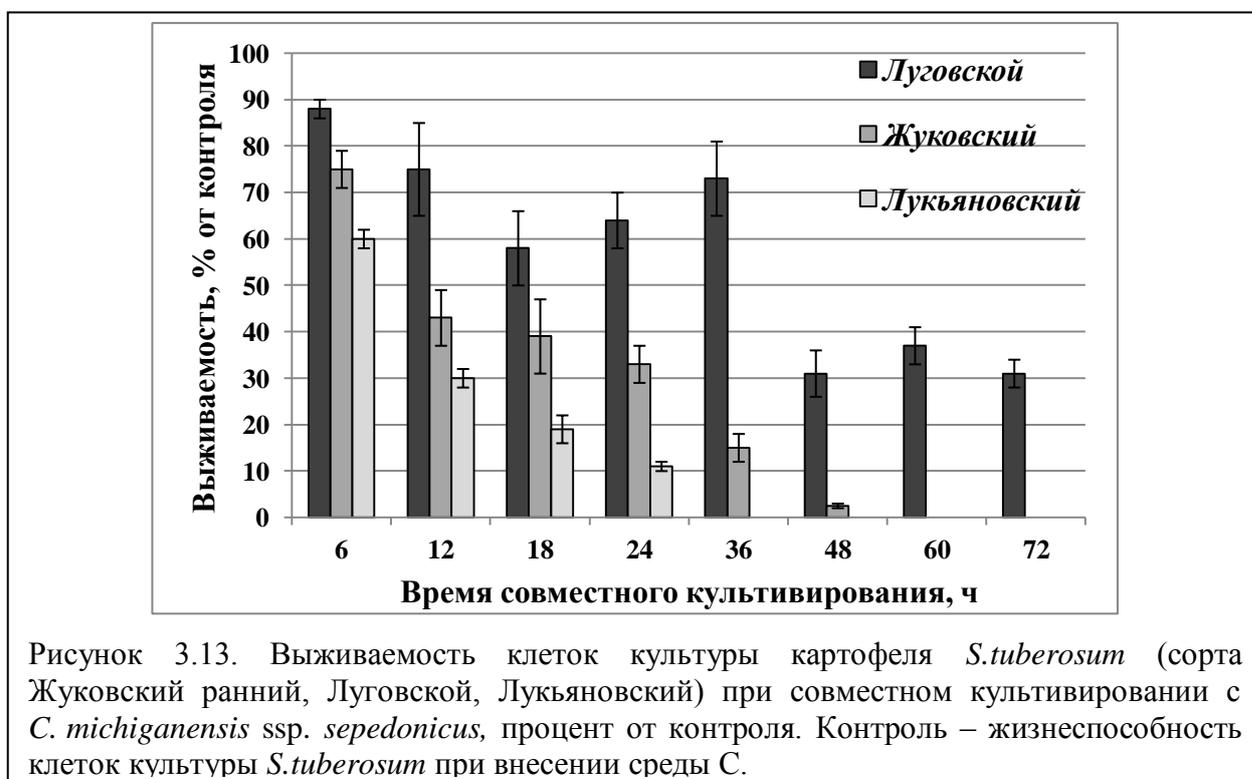
В связи с тем, что было показано, что экзометаболиты *Cms* вызывают развитие СЧ реакции на листьях табака, последующая работа была посвящена определению действия экзометаболитов *Cms* на суспензионную культуру клеток табака (Рис. 3.12.)



Оказалось, что внесение фильтрата бактериальной суспензии, лишенного клеток, и термически инактивированной бактериальной суспензии в культуру клеток табака также приводит к гибели растительных клеток. Но если при внесении бактериальной суспензии процент гибели через 24 часа совместного культивирования составляет около 80 %, то при действии фильтрата и инактивированной суспензии только 45% и 35% соответственно. В ходе дальнейшего совместного культивирования процент мертвых клеток постепенно увеличивается, но и через 72 часа он не достигает 100%, как в случае с суспензией бактерий *Cms*. Наблюдаемая разность в темпах и проценте гибели растительных клеток согласуется с визуальными различиями в индукции СЧ реакции при действии самого возбудителя кольцевой гнили, фильтрата и термически инактивированной бактериальной суспензии (Рис. 3.8., 3.9.). Действие фильтрата бактериальной суспензии, содержащего экзометаболиты, выделяемые *Cms*, но лишенного самих бактериальных клеток, приводит к развитию локальных некрозов меньшего диаметра на целом растении и более низким процентом гибели клеток суспензионной культуры табака (45%) по сравнению с действием нативной бактериальной суспензии (80%). Отсутствие в фильтрате суспензии бактериальных клеток, постоянно увеличивающейся численности, регулирующих свой метаболизм в сторону увеличения синтеза эффекторов в ходе взаимодействия с растительными клетками, объясняет меньший процент гибели по сравнению с действием бактериальной суспензии. Внесение же термически инактивированной бактериальной суспензии приводит к развитию локальных некрозов еще меньшего диаметра и самому низкому проценту гибели среди рассматриваемых вариантов (35%). В качестве объяснения можно предположить, что в экзометаболитный комплекс *Cms* входит ряд молекул эффекторной природы, но только некоторые из них являются термостабильными.

3.4.2. Выживаемость культуры клеток картофеля при взаимодействии с *Cms*

Бактериальный патоген *Cms* при попадании в растения или клубни картофеля вызывает развитие кольцевой гнили. В условиях *in vitro* действие данного фитопатогена на картофель определяли, изучая динамику снижения процента живых клеток суспензионной растительной культуры после внесения в нее суспензии *Cms*. В 7-ми суточную культуру клеток картофеля, различающихся по степени устойчивости к *Cms* сортов: Жуковский ранний, Луговской и Лукьяновский вносили бактериальную суспензию. Выживаемость клеток оценивали по способности растительных клеток восстанавливать ТТХ через каждые 6 часов совместного культивирования. Динамика снижения способности клеток картофеля восстанавливать ТТХ при совместном культивировании с *Cms* представлена в виде процента от контроля на Рис. 3.13.



Из представленной диаграммы можно заключить, значительная гибель клеток восприимчивого сорта Лукьяновский наблюдается уже через 6 часов

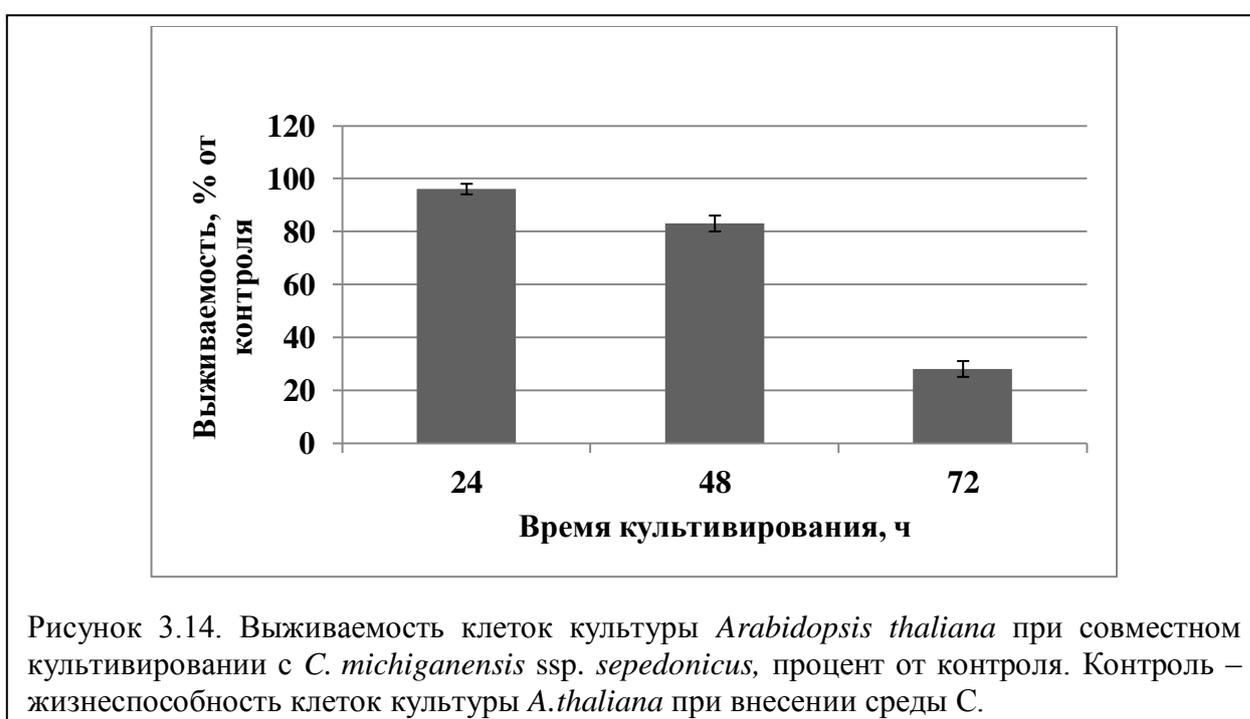
совместного культивирования (40%), и с течением времени процент мертвых клеток все увеличивается. Через 24 часа совместного культивирования процент гибели клеток картофеля сорта Лукьяновский достигает 90%. Гибель клеток среднеустойчивого сорта Жуковского раннего менее интенсивна: процент гибели через 24 часа совместного культивирования составлял 70%, а через 48 часов – чуть меньше 100%. В то время как у относительно устойчивого сорта Луговской наблюдается небольшое снижение жизнеспособности в течение первых суток совместного культивирования (до 65 %), и только к 3-им суткам процент жизнеспособных клеток снижается до 30%. Очевидно, что у устойчивого сорта картофеля Луговского происходит развитие более эффективных защитных реакций, чем у восприимчивого Лукьяновского. Основываясь на современных представлениях о врожденном иммунитете растений и эволюции его в растительно-микробных взаимоотношениях («зиг-заг» модель (Jones, Dangl, 2006)), можно предположить, что картофель сорта Луговской, вероятно, обладает рецепторами, способными распознавать эффекторные молекулы возбудителя кольцевой гнили, и запускать развитие иммунных реакций. Но тот факт, что развитие реакции СЧ не происходит и инфекция в конечном итоге все же распространяется по растению, говорит о том, что возможно также присутствие второго типа эффекторов, распознавание которых не происходит, и их действие на растительную клетку и приводит к снижению эффективности защитных механизмов.

3.4.3. Выживаемость культуры клеток *Arabidopsis thaliana* при взаимодействии с *Cms*

Для подтверждения специфичности действия *Cms* изучалась выживаемость суспензионной культуры клеток *A. thaliana* после заражения данным патогеном. *A. thaliana* не является растением-хозяином для *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus*, не отвечает запуском СЧ реакции на

вторжение этого патогена и относится к другому семейству – капустных (*Brassicaceae*), в то время как картофель и табак являются представителями семейства пасленовых (*Solanaceae*). Суспензионная культура клеток инокулировалась *Cms* аналогичным образом, жизнеспособность клеток также проверялась по способности восстанавливать ТТХ через 24, 48, 74 часа совместного культивирования.

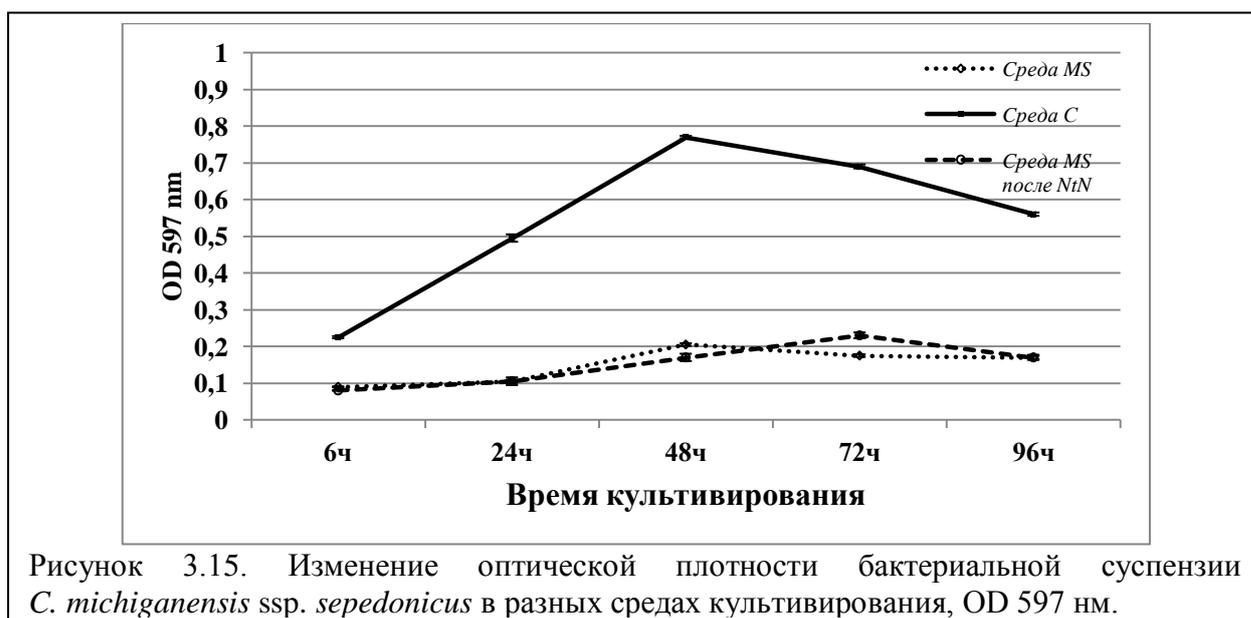
Данные выживаемости растительных клеток представлены в виде процента от контроля на Рис. 3.14.



Из представленного рисунка видно, что через сутки совместного культивирования процент живых клеток *A. thaliana* равен почти 100%, через двое суток гибель клеток составляет всего 15%, и лишь на третьи сутки регистрируется значительный процент гибели (около 60%). Можно предположить, что *Cms* непосредственно не вызывает гибели клеток арабидопсиса ни путем СЧ-реакции, ни путем развития заболевания, но является опосредованной причиной гибели растительных клеток в результате истощения питательной среды и токсического действия продуктов жизнедеятельности бактерий.

В результате анализа полученных данных можно сделать вывод о том, что возбудитель кольцевой гнили картофеля *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* обладает высокой специализацией, вызывая гибель клеток только у растения-хозяина картофеля, в результате развития заболевания, и у растений табака в процессе развития СЧ-реакции.

Для доказательства того, что гибель клеток табака и картофеля в первые сутки совместного культивирования развивается не в результате токсического действия бактерий и истощения среды, изучали способность *Cms* расти в среде Мурасиге-Скуга (MS). В стерильную среду MS, а также среду MS, из которой были удалены (путем фильтрования) растительные клетки после 5 суток культивирования, вносили бактериальную суспензию. Объем и титр вносимой суспензии соответствовал объему, используемому в экспериментах по определению жизнеспособности растительных культур в ходе совместного культивирования с возбудителем кольцевой гнили. Через 6, 24, 48, 72, 96 часов определяли оптическую плотность среды культивирования. Изменение оптической плотности бактериальной суспензии в среде MS сравнивали с изменением оптической плотности бактериальной суспензии в среде С – среде оптимального состава для культивирования данного фитопатогена (Рис. 3.15.).



Очевидно, что скорость размножения *Cms* в среде MS намного ниже скорости прироста в среде С. Данные результаты свидетельствуют о том, что гибель растительных клеток табака и картофеля в первые сутки совместного культивирования не может быть следствием истощения питательной среды в результате интенсивного прироста бактериальной биомассы.

3.5. Морфологические параметры гибели растительных клеток при действии *Cms*

Реакция сверхчувствительности – гибель клеток в месте инфицирования по типу ПКС. Запуск программы гибели приводит к изменению экспрессионного профиля клетки. Активируется экспрессия генов специфических участников клеточной гибели, обеспечивающих деградацию клеточного содержимого – протеаз и нуклеаз. Самым ранним морфологическим признаком развития ПКС является отхождение протопласта от клеточной стенки по всему периметру (плазмолиз), чего не наблюдается при развитии некротических процессов гибели. Этот процесс является активным, осуществляется за счет перестройки цитоскелета и в конечном итоге приводит к сморщиванию протопласта с последующей деградацией его содержимого (Swidzinski et al., 2002). Деградация клеточного содержимого при развитии процесса ПКС осуществляется в рамках целостной плазматической мембраны, в отличие от процессов неуправляемой некротической гибели, характеризующейся образованием пор в мембране, набуханием клетки и, в конечном итоге, разрывом плазматической мембраны (Kroemer et al., 2009).

Микроскопические исследования клеток табака при совместном культивировании с *Cms* позволили изучить морфологию гибели растительных клеток (Рис. 3.16.).

В первые часы совместного культивирования было обнаружено отхождение протопласта от клеточной стенки (плазмолиз), что

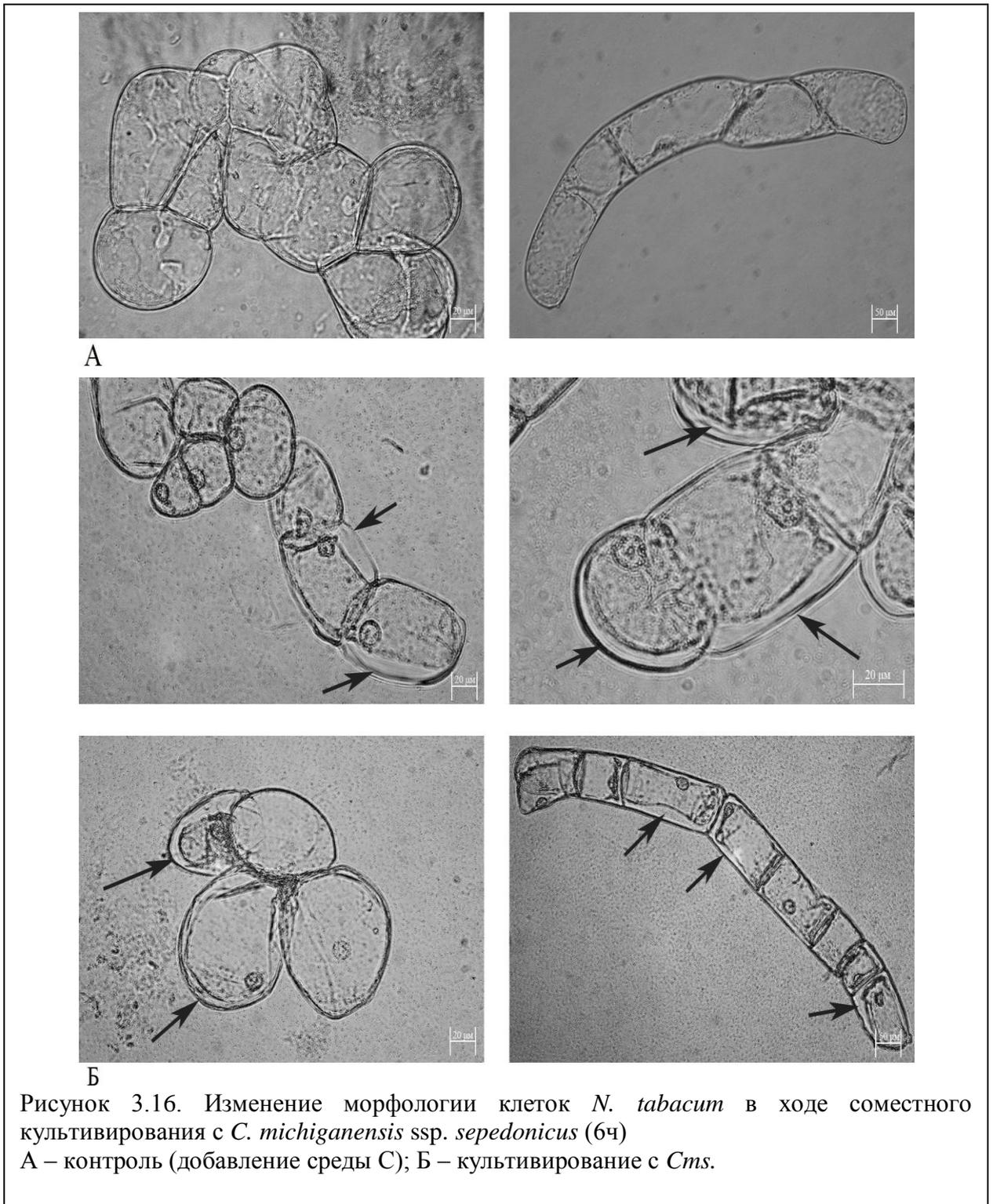


Рисунок 3.16. Изменение морфологии клеток *N. tabacum* в ходе совместного культивирования с *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus* (6ч)
 А – контроль (добавление среды С); Б – культивирование с *Cms*.

свидетельствует о развитии гибели по типу ПКС в культуре клеток табака при действии *Cms*.

Для более полного доказательства гибели клеток табака по типу ПКС изучали морфологию клеток корневых волосков проростков табака при добавлении в среду культивирования бактериальной суспензии *Cms* (Рис. 3.17.).

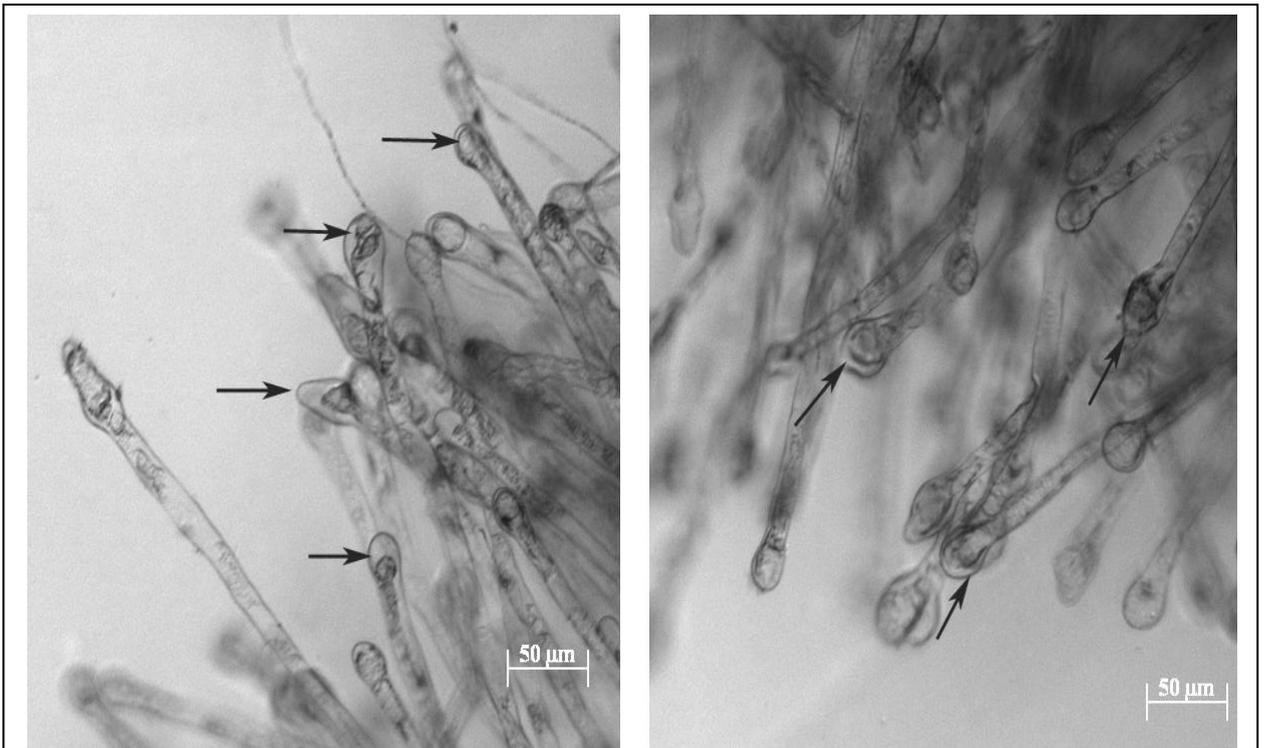


Рисунок 3.17. Морфология клеток корневых волосков *N. tabacum* при совместном культивировании с *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus*.

На представленных микрофотографиях хорошо заметно отхождение протопласта от клеточной стенки в клетках корневых волосков. Данные результаты согласуются с наблюдениями развития реакции сверхчувствительности на корнях табака при действии *Cms*.

Таким образом, морфология гибели, как на уровне клеток культуры, так и на уровне клеток корневых волосков целого растения табака при действии *Cms* подтверждает активацию специфических реакций эффектор-активируемого иммунитета, а именно развитие программируемой клеточной гибели, реализующейся в форме реакции сверхчувствительности у целого растения.

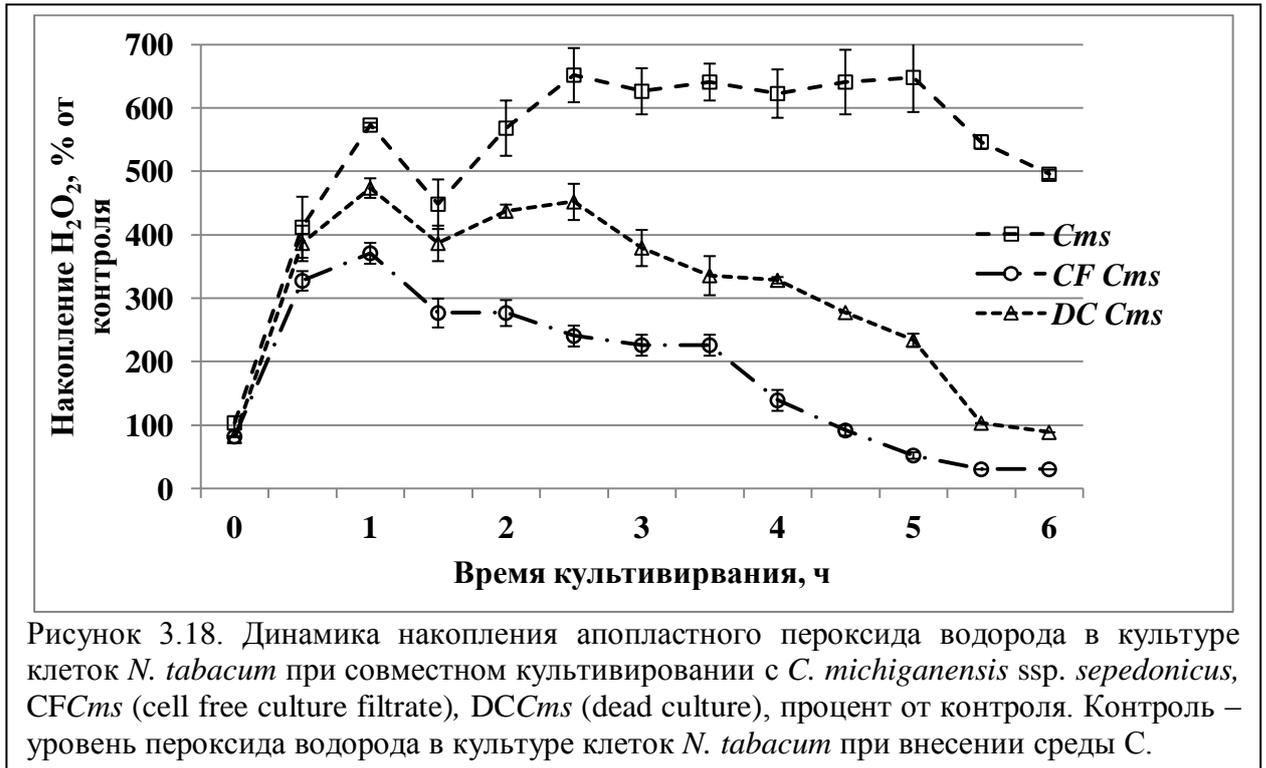
Изучение изменения морфологии клеток картофеля при совместном культивировании с *Cms* не выявило отхождение протопласта от клеточной стенки с сохранением целостности плазматической мембраны.

3.6. Генерация пероксида водорода в суспензионных культурах клеток при взаимодействии с *Cms*

Накопление активных форм кислорода является одной из самых первых реакций растительной клетки на стрессовое воздействие, как абиотической, так и биотической природы. В результате контакта микроорганизма с растительной клеткой также происходит активация генерации АФК. Этот процесс наблюдается как в результате восприятия неспецифического патогена и запуска паттерн-активируемого иммунитета, так и в результате действия специфического патогена и активации эффектор-активируемого уровня иммунитета. Интенсивность генерации АФК в результате запуска специфического и неспецифического иммунитета отличается. Восприятие эффекторных молекул приводит к так называемому окислительному взрыву – быстрому накоплению активных форм кислорода. Таким образом, изучение динамики и интенсивности накопления активных форм кислорода позволяет судить об активируемых механизмах.

3.6.1. Генерация пероксида водорода в культуре клеток табака при взаимодействии с *Cms*

Одна из задач данной работы заключалась в определении характера генерации АФК в культуре клеток табака при инфицировании *Cms*. Для этого использовали метод обнаружения апопластного пероксида водорода. Генерация пероксида изучалась в динамике в течение 6 часов с момента заражения. На рисунке 3.18. представлены результаты экспериментов, демонстрирующие динамику генерации активных форм кислорода (внеклеточный пероксид водорода) после инокуляции в культуру клеток табака суспензии бактерий *Cms*, термически инактивированной суспензии *DCCms*, и фильтрата суспензии *CFCms* (Рис.3.18.).



Результаты представлены в виде процента от максимального контрольного значения – уровня накопления внеклеточного пероксида водорода в культуре клеток табака при внесении стерильной среды С, как предложено авторами используемой методики (Bindschedler et al., 2001). Из рисунка видно, что сразу после инокуляции патогена в клеточную среду активно начинает выделяться пероксид водорода, уже через 1 час количество апопластных форм АФК составляет 35 мкМ – практически 600% от контроля, но затем концентрация начинает снижаться. Повышение уровня пероксида водорода через час совместного культивирования и затем снижение этого уровня можно наблюдать и при внесении термически инактивированной бактериальной суспензии и бесклеточного фильтрата.

Известно, что окислительный взрыв при развитии реакции СЧ характеризуется двухфазностью. Первый пик генерации АФК характеризует неспецифичный ответ на воздействие инфекционного агента. Второй пик генерации АФК характерен для специфического уровня иммунитета, интенсивность его значительна и достаточна для активации последующих реакций эффектор-активируемого иммунитета. Как видно из

представленного графика, второй пик повышения концентрации активных форм кислорода наблюдали через 3 часа после внесения бактериальной суспензии в культуру клеток табака. Вместе с тем, методом цейтраферной съемки была зарегистрирована остановка движения цитоплазмы через 4 часа после инокуляции бактериями, что свидетельствует в пользу того, что идут активные процессы развития гибели клетки по типу ПКС. К 6 часам совместного культивирования содержание пероксида водорода начинает постепенно снижаться, и как указывалось выше, наблюдается снижение жизнеспособности растительных клеток до 45% (Рис. 3.11.).

Необходимо обратить внимание на тот факт, что при внесении инактивированной бактериальной суспензии также регистрировался второй пик увеличения концентрации пероксида, но меньшей интенсивности. При действии бесклеточного фильтрата второй пик накопления активных форм кислорода не выражен. Различия в интенсивности генерации АФК в ответ на воздействие различных инфекционных агентов могут объяснить полученные ранее результаты по развитию в месте инокуляции DC и *SFCms* локальных некрозов меньшего диаметра, чем при внесении суспензии *Sms*. Чем же можно объяснить такое различие в интенсивности генерации АФК? Несомненно, при контакте растительных и бактериальных клеток происходит не только активация защитных механизмов растения, но и изменяется метаболизм бактериальной клетки. Детекция присутствия растительной клетки микроорганизмом приводит к изменению профилей транскрипции и синтеза белка, при этом повышается экспрессия факторов вирулентности данного патогена, и, как следствие, возрастает количество метаболитов, действующих на растительную клетку. В варианте с термически инактивированной бактериальной суспензией бактериальные клетки мертвы, и соответственно, такого эффекта не наблюдается, но активация окислительного взрыва происходит в результате присутствия молекулярных паттернов и термостабильных молекул эффекторной природы. Механизмы

снижения интенсивности генерации АФК при действии фильтрата по сравнению с инактивированной бактериальной суспензией пока непонятны, но можно предположить, что при внесении фильтрата бактериальной суспензии, в котором отсутствуют молекулярные микробные паттерны, активация генерации АФК происходит только при восприятии растительной клеткой эффекторных молекул, соответственно уровень пероксида водорода еще ниже. Можно ожидать, что внесение одних только молекулярных паттернов, без эффекторов приведет к генерации АФК еще меньшей интенсивности, не достаточной для запуска СЧ реакции.

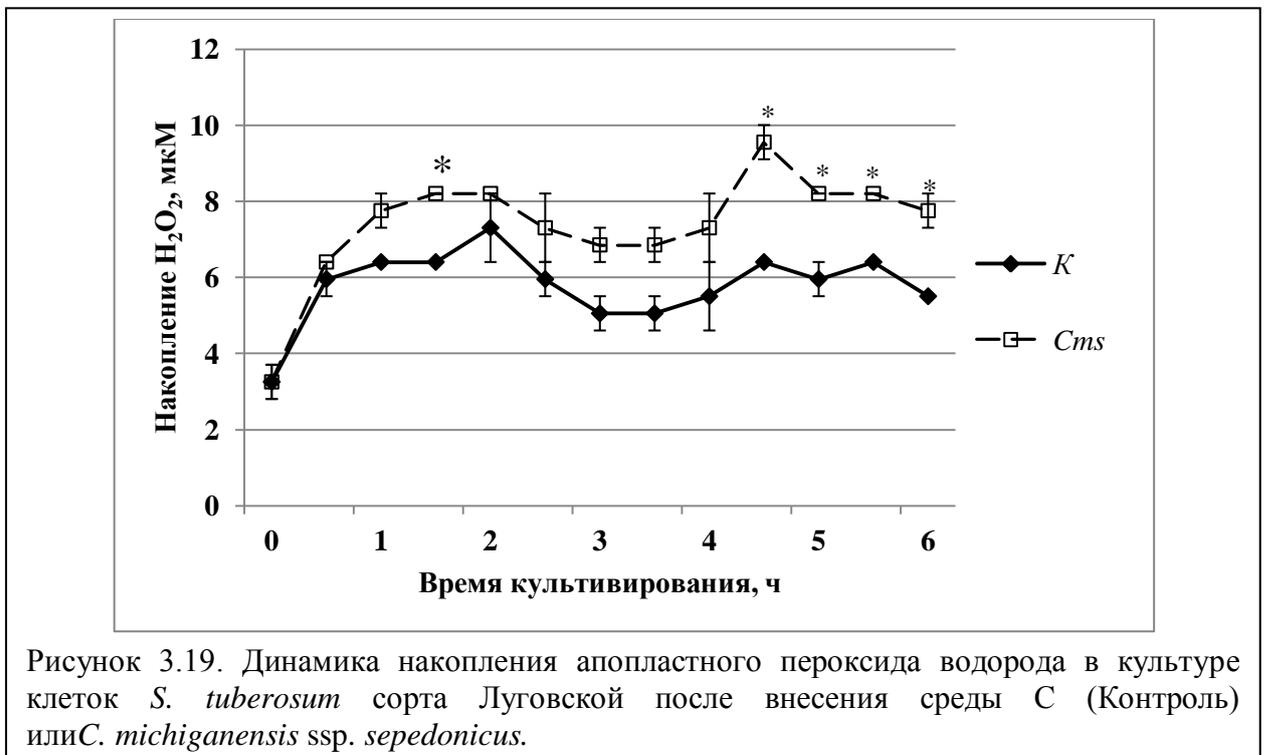
В то же время, возможен другой вариант объяснения различий в интенсивности генерации АФК. В ряде работ, посвященных различным фитопатосистемам, было показано, что эффекторы подавляют развитие окислительного взрыва. Например, эффектор Per1 биотрофного патогена *Ustilago maydis* подавлял развитие окислительного взрыва в клетках кукурузы путем непосредственного ингибирования действия апопластной пероксидазы (Nemetsberger et al., 2012). Можно предположить, что *Sms* также обладает эффекторными молекулами, способными подавлять развитие окислительного взрыва, и вероятно, данные эффекторные молекулы не являются термостабильными. Вместе с тем, нельзя исключить как совместного, так и последовательного действия предложенных выше механизмов.

3.6.2. Генерация пероксида водорода в культуре клеток картофеля при взаимодействии с *Sms*

На следующем этапе работы был определен уровень накопления АФК в системе картофель - *S.michiganensis* ssp. *sepedonicus*.

Данная система, как уже отмечалось, является примером реализации совместимых взаимоотношений организмов и развитие активных реакций растения в такой системе не ожидается. Для изучения интенсивности

образования внеклеточного пероксида водорода в культуре клеток картофеля и сравнения интенсивности и временных рамок этого образования с генерацией АФК в культуре табака применялась аналогичная схема проведения эксперимента. Генерацию активных форм кислорода изучали у двух контрастных по устойчивости к *Cms* сортов картофеля: Луговской – устойчивый, и Лукьяновский – восприимчивый к возбудителю кольцевой гнили. В культуру клеток вносили бактериальную суспензию либо термически инактивированную суспензию или фильтрат. В качестве контрольного варианта использовали инокуляцию стерильной средой С.



На рисунке 3.19. видно, что при заражении культуры клеток картофеля сорта Луговской патогеном *C. michiganensis ssp. sepedonicus* наблюдается образование незначительного количества активных форм кислорода. Максимальная концентрация пероксида водорода отмечается через 4,5 часа после инокуляции патогеном и составляет чуть меньше 10 мкМ. Значимое отличие от контроля (на графике отмечено звездочками) концентрации пероксида водорода регистрируется только в точке 1,5 часа и после 4,5 часов совместного культивирования. Таким образом, у устойчивого сорта

картофеля, согласно полученным результатам, наблюдается слабо выраженное двухфазное увеличение концентрации АФК, которое, вероятно, и обеспечивает некоторую задержку в развитии процессов гибели растительных клеток.

Внесение инактивированной суспензии и фильтрата вызывало изменение концентрации активных форм кислорода соответствующие контрольному варианту (Рис. 3.20.).



Значимое отличие от контроля регистрируется только в точке 4,5 часа совместного культивирования при внесении термически инактивированной бактериальной суспензии.

На рисунке 3.21. представлено изменение содержания активных форм кислорода в культуре клеток картофеля восприимчивого сорта Лукьяновский после внесения среды С, бактериальной суспензии *Cms*.

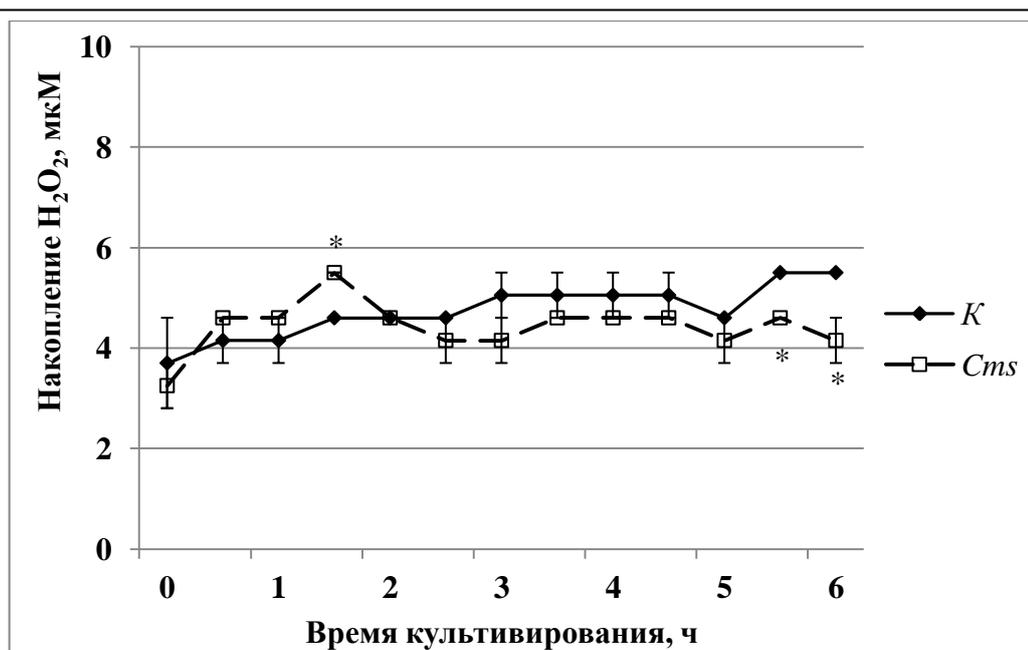


Рисунок 3.21. Динамика накопления апопластного пероксида водорода в культуре клеток *S. tuberosum* сорта Лукьяновский после внесения среды С (Контроль) или *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus*.

Содержание апопластного пероксида водорода колеблется в диапазоне от 3 до 6 мкМ и с течением времени практически не изменяется. При этом установлено, что в точке 1,5 часа совместного культивирования культуры картофеля и бактериальной суспензии наблюдается увеличение концентрации пероксида водорода, достоверно отличающееся от контроля. С большей степенью вероятности можно предполагать, что это первый неспецифический пик генерации активных форм кислорода. В ходе дальнейшего культивирования концентрация АФК не увеличивается, и даже снижается по сравнению с контрольным вариантом (достоверно меньше в точках 5,5 и 6 часов совместного культивирования), что говорит о гашении иммунных механизмов в данной системе. Внесение фильтрата бактериальной суспензии и термически инактивированной суспензии не приводило к изменениям в концентрации пероксида водорода достоверно отличным от контроля (Рис. 3.22.).

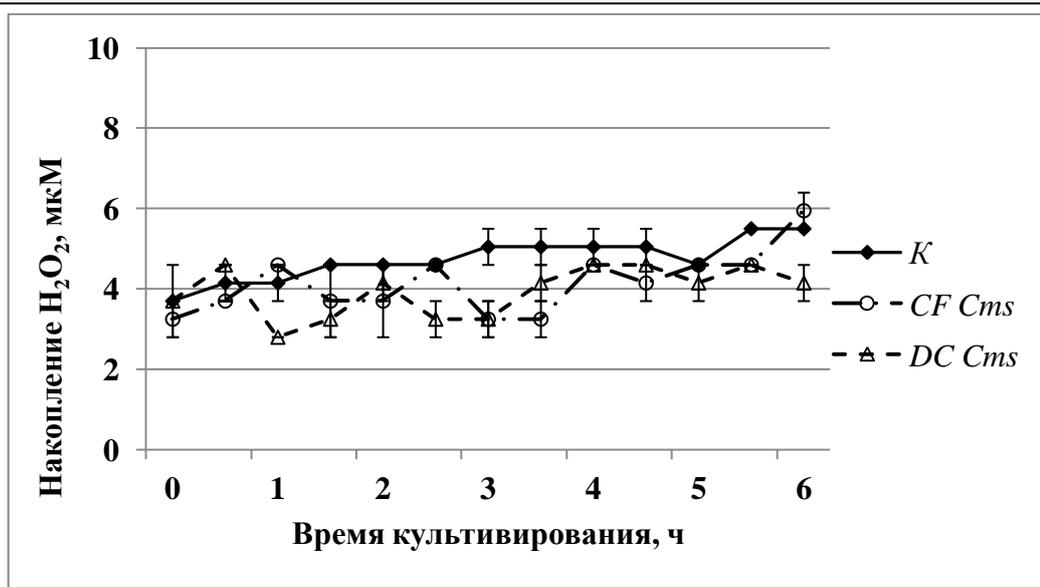


Рисунок 3.22. Динамика накопления апопластного пероксида водорода в культуре клеток *S. tuberosum* сорта Лукьяновский при совместном культивировании после внесения среды С (Контроль); CF *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus* (cell free culture filtrate), DC Cms (dead culture).

Сравнение динамики накопления пероксида водорода в разных системах – несовместимой (табак-патоген) и совместимой (картофель-патоген) представлено на Рисунке 3.23.

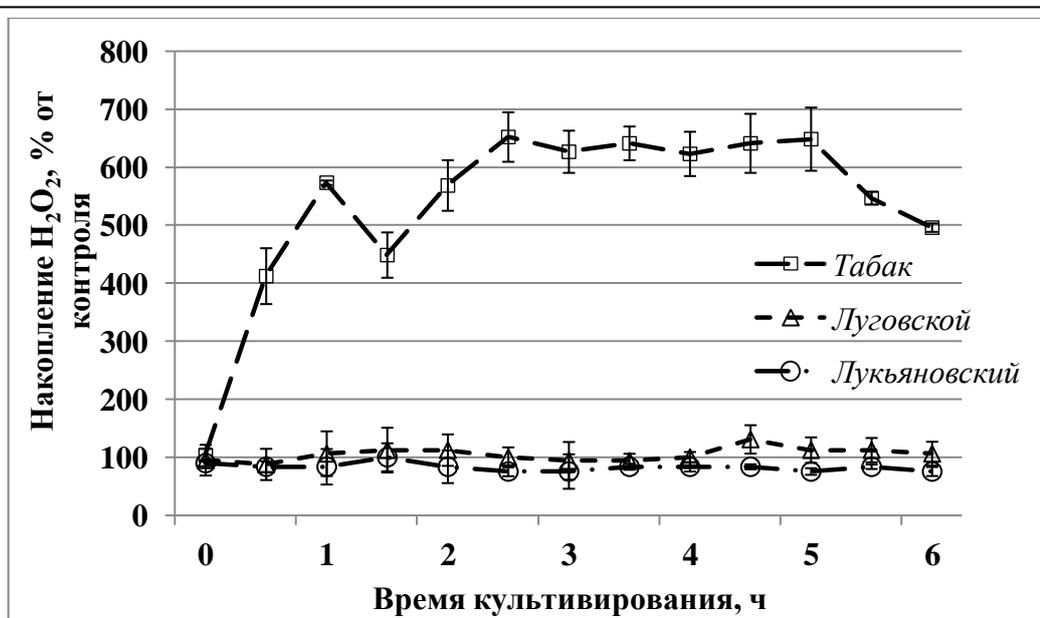


Рисунок 3.23. Динамика накопления апопластного пероксида водорода в культурах клеток *S. tuberosum* сортов Луговской и Лукьяновский, *N. tabacum* при совместном культивировании с *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Процент от контроля. Контроль – уровень перекиси водорода в соответствующих культурах клеток при внесении среды С.

Данные, представленные на рисунке, свидетельствуют о явно выраженных концентрационных различиях накопления АФК при совместимых и несовместимых взаимоотношениях организмов. Интенсивность генерации пероксида водорода в системе табак-*Cms* значительно выше, чем в системе взаимоотношений картофель-*Cms*, что свидетельствует в пользу активации эффектор-активируемого уровня врожденного иммунитета и объясняет развитие реакции сверхчувствительности, приводящей к гибели клеток табака.

3.7. Защитные функций белков теплового шока при заражении растительных культур фитопатогеном *Cms*

Из литературы известно, что синтез БТШ наблюдается у растений при действии различных видов стресса, например, низких температур, ультрафиолета, тяжелых металлов, окислительном и осмотическом стрессах, а также и при инфицировании патогеном. В условиях стресса они восстанавливают поврежденные белки, а если их невозможно восстановить – способствуют их деградации. Важно выяснить принимают ли участие БТШ в развитии ответных реакций на патоген, определить их роль в развитии защитного ответа, изучить функции белков теплового шока в иммунных реакциях растений при развитии совместимых и несовместимых взаимоотношений растений и микроорганизмов.

Для изучения влияния БТШ на выживаемость растительных клеток при заражении фитопатогеном *Cms* предварительно устанавливали температуру, оптимальную для индукции синтеза БТШ, а также определяли температурный порог, при котором начинается гибель клеток. Для этого была изучена экспрессия БТШ и выживаемость растительных клеток при воздействии теплового шока различной интенсивности.

Для определения участия и установления роли БТШ в развитии ответных реакций на воздействие патогена индуцировали их синтез двумя способами:

1) Посредством умеренного теплового воздействия (37°C) на культуры клеток табака.

2) С помощью трансформации растений табака геном *Hsp101*.

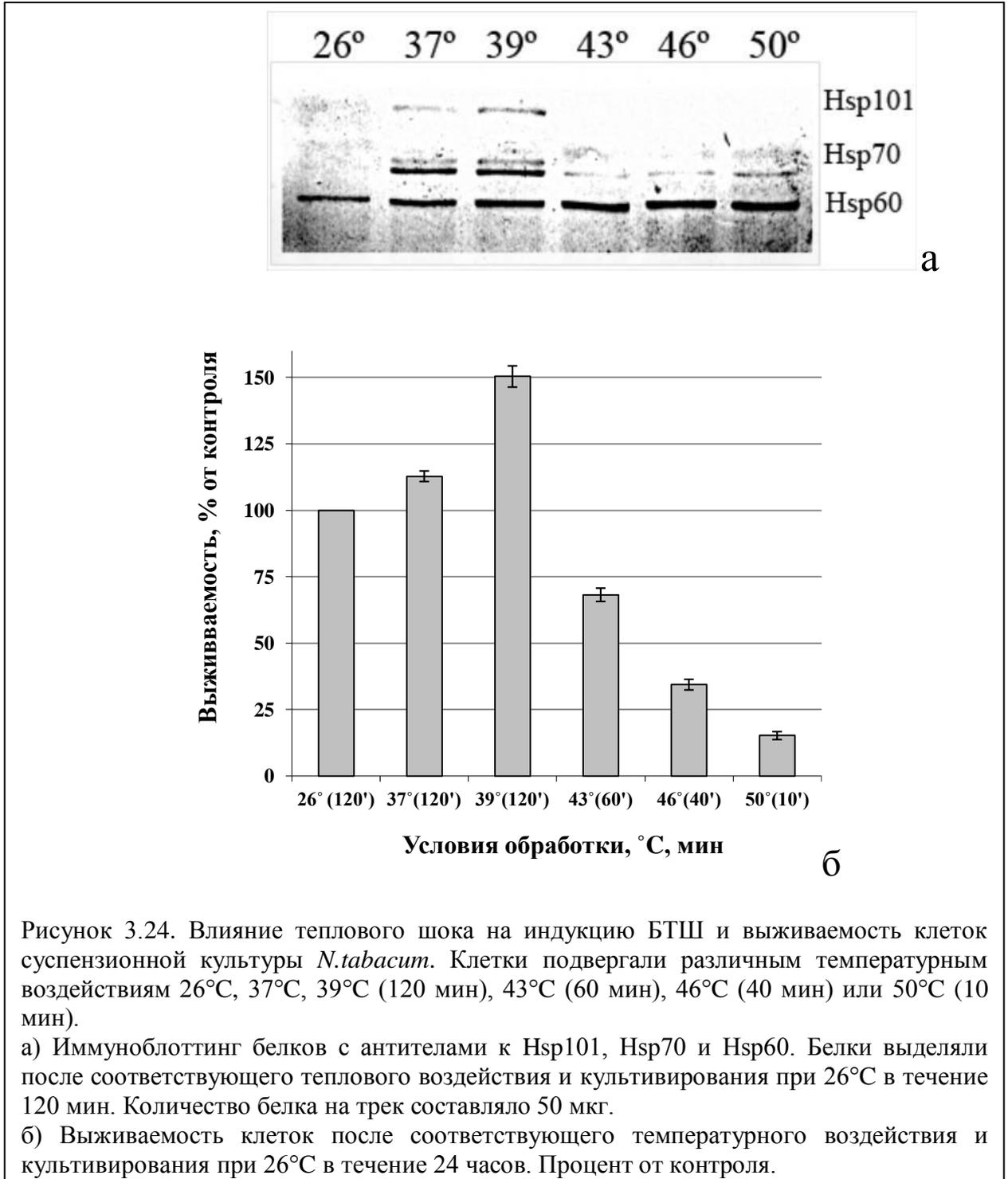
3.7.1. Влияния теплового шока на индукцию БТШ и жизнеспособность клеток культуры табака

Для определения действия теплового шока на индукцию БТШ и выживаемость культур клеток табака их подвергали тепловым воздействиям различной интенсивности и продолжительности, а затем определяли относительное содержание исследуемых БТШ и жизнеспособность клеток.

Культуру клеток *N. tabacum* подвергали следующим температурным обработкам: 37°C - 120 мин, 39°C - 120 мин, 43°C - 60 мин, 46°C – 40 мин, 50°C – 10 мин. Через 120 мин при 26°C (период времени, необходимый для экспрессии и синтеза белков теплового шока) выделяли общую белковую фракцию. Дизайн эксперимента был предложен на основании работы Е.Г.Рихванова с соавт. (Rihvanov et al., 2007). В качестве контроля использовали культуру, выращиваемую при 26°C. Количественное содержание БТШ регистрировали методом Вестерн-блоттинга с соответствующими антителами против Hsp101, Hsp70 и Hsp60. Данные эксперимента представлены на Рис.3.24а.

При культивировании клеток табака в нормальных условиях (26°C) регистрируется присутствие конститутивно синтезируемого митохондриального белка Hsp60. При 26°C уровень Hsp60 минимальный, но с увеличением температуры инкубации увеличивается и уровень синтеза белка Hsp60. Синтез белков Hsp70 и Hsp101 впервые регистрируется при температуре 37°C, и имеет максимальное значение в двух точках

экспериментах – при температуре инкубации 37°C и 39°C. При более высоких температурах синтез Hsp101 не регистрируется, а уровень синтеза Hsp70 ниже, чем при температурах 37°C и 39°C.



Для оценки выживаемости культуры клеток табака при действии различных температур применялась аналогичная схема эксперимента.

Суспензионная культура клеток табака подвергалась тепловым обработкам: 37°C – 120 мин, 39°C – 120 мин, 43°C – 60 мин, 46°C – 40 мин, 50°C – 10 мин. Через 24 часа при 26°C определяли жизнеспособность клеток по реакции восстановления 2,3,5 – трифенилтетразолия хлористого, показывающей эффективность дыхания клеток (Рис. 3.24б.).

Процент живых клеток табака снижался при обработке температурой 43°C и выше. Жизнеспособность клеток табака при действии температуры 37°C была сопоставима с жизнеспособностью клеток в нормальных условиях культивирования (26°C), чего нельзя сказать о температурной обработке 39°C. Температурное воздействие 39°C не только не снижало жизнеспособность клеток табака, но даже значительно повышало ее, активируя неизвестные механизмы.

Из представленных выше экспериментальных данных можно заключить, что температуры 37°C и 39°C являлись оптимальными для индукции синтеза белков Hsp70 и Hsp101. Более высокие температуры (43°C, 46°C и 50°C) снижали процент живых клеток и не приводили к повышению уровня белков Hsp 70 и Hsp101, однако увеличивали синтез белка Hsp60. На основании полученных результатов для дальнейшей экспериментальной работы по определению участия БТШ в защитном ответе растения при действии *Sms* была выбрана температура 37°C. Несмотря на высокие уровни синтеза Hsp 70 и Hsp101 температурное воздействие 39°C не применяли в дальнейшей работе, для того чтобы исключить возможное влияние эффекта повышения жизнеспособности на развитие защитных реакций клеток табака при действии *Sms*.

3.7.2. Участие БТШ в защитном ответе табака на действие патогена *Sms*

Несовместимая система взаимоотношений растения и патогена характеризуется развитием реакции сверхчувствительности – быстрой гибели

клеток в месте внедрения патогена по типу ПКС. Для изучения функций белков теплового шока в процессе развития ПКС табака при действии несовместимого патогена *Cms* использовалась следующая схема эксперимента. Суспензионную культуру клеток инкубировали при 37°C в течение 120 минут, затем выдерживали при 26°C в течении 120 минут, что необходимо для достаточного накопления БТШ, и заражали суспензией *Cms*. Выживаемость растительных клеток оценивали по реакции восстановления ТТХ через 24 часа совместного культивирования. Результаты рассчитывали в виде процента от контроля. Контролем считали жизнеспособность растительных клеток подвергнутых данной тепловой обработке, но не зараженных бактериальной суспензией. Полученные данные сравнивали с жизнеспособностью растительных клеток без воздействия температуры перед заражением *Cms* (Рис. 3.25.).

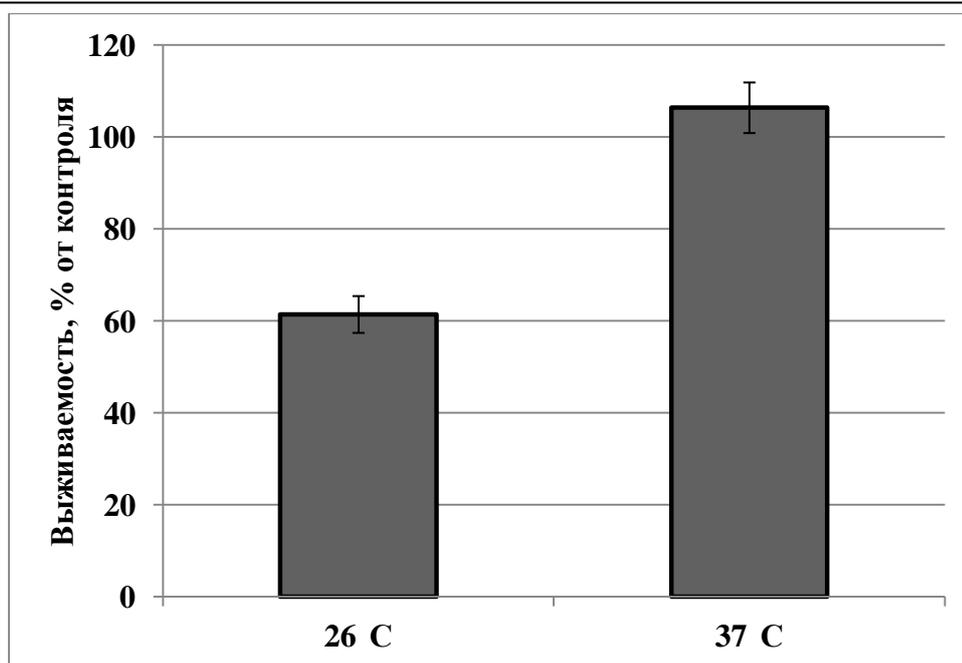


Рисунок 3.25. Выживаемость клеток культуры *N. tabacum* через 24 часа после инфицирования *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus* с предварительной температурной обработкой и без нее, процент от контроля. Контроль – жизнеспособность культур клеток при внесении среды С при соответствующих температурах.

26°C – выживаемость растительных клеток при заражении без предварительной тепловой обработки.

37°C – выживаемость растительных клеток при заражении после предварительной тепловой обработки 37°C (120 мин), 26°C(120 мин).

Обнаружено, что гибель клеток табака без предварительного температурного воздействия при заражении возбудителем кольцевой гнили составляла примерно 40% от контроля. В то время как при заражении культуры клеток табака после инкубации при температуре 37°C гибель клеток не регистрировалась. Таким образом, можно говорить о том, что воздействие температурой 37°C в течение 120 минут и выдерживание 120 минут при температуре 26°C способствовали развитию защитных механизмов, направленных на подавление гибели клеток в результате реакции сверхчувствительности. Данное тепловое воздействие вызывало индукцию синтеза БТШ, которые, как можно полагать, проявляют протекторные свойства, а также могут модулировать развитие ПКС и обладают антиапоптозным эффектом.

Так, известно, что Hsp90 и ко-шаперон подобные молекулы RAR1 и SGT1 принимают участие в сборке, контроле стабильности и активации иммунного рецепторного комплекса, воспринимающего эффекторные молекулы и индуцирующего запуск СЧ реакции (Shirasu, 2009; Thao et al., 2007). Сверхэкспрессия Hsp70 ингибирует MAPK сигнальный каскад, активация которого в ходе запуска реакций эффектор-активируемого иммунитета приводит к развитию апоптотической гибели клетки (Hwang et al., 2005).

Определяли образование внеклеточного пероксида водорода в культуре клеток табака с предварительной тепловой обработкой при действии *Cms* (Рис. 3.26.).

Из представленного рисунка видно, что интенсивность генерации данного типа АФК при действии *Cms* в культуре клеток табака, предварительно подвергнутой действию температуры 37°C, ниже, чем в культуре при стандартных условия культивирования. Вероятно, синтез БТШ модулирует развитие ПКС и понижает интенсивность генерации активных форм кислорода.

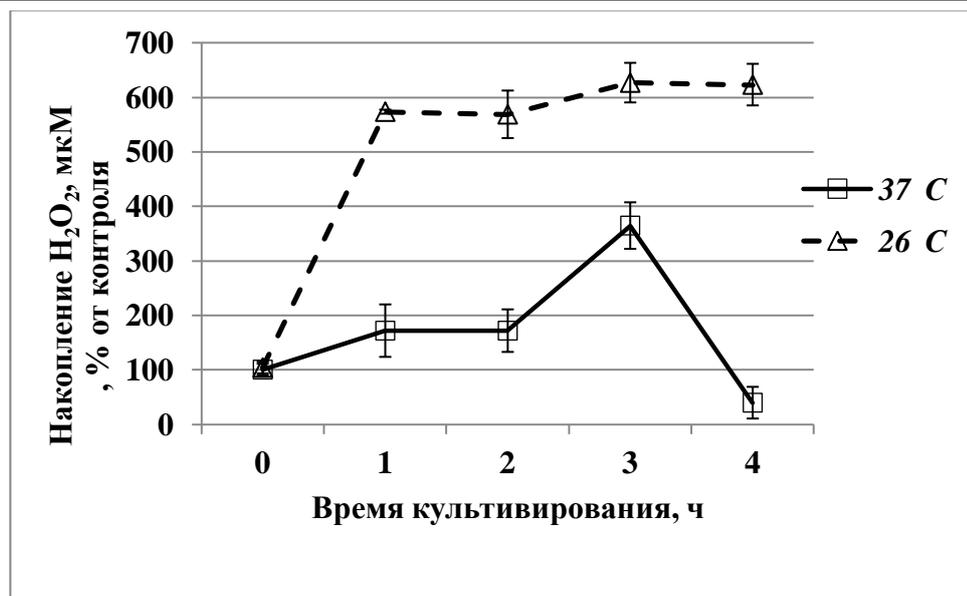


Рисунок 3.26. Динамика накопления внеклеточного пероксида водорода в культурах клеток табака *N. tabacum* при совместном культивировании с *S. michiganensis* ssp. *sepedonicus* с предварительной температурной обработкой и без нее, процент от контроля. Контроль – уровень пероксида водорода в культурах клеток при внесении среды С при соответствующих температурах.

26°C – культура клеток без предварительной тепловой обработки,

37°C – культура клеток после предварительной тепловой обработки 37°C (120 мин),
26°C(120 мин).

Для выяснения функций белка Hsp101 в развитии ответных реакций растений табака на внедрение фитопатогена *Sms* применяли культуру клеток, полученную из растений табака, трансформированных геном *hsp101 Arabidopsis thaliana*.

В культуре клеток трансформированного табака наблюдается усиленная экспрессия индуцибельного в норме белка Hsp101, что было подтверждено методом Вестерн-блоттинга с соответствующими антителами (Рис. 3.27.) (Шафикова Т.Н. и др., 2013).

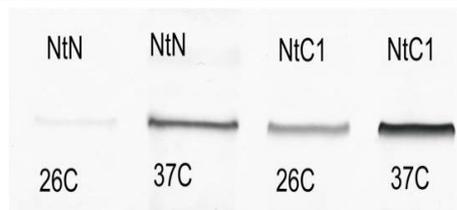


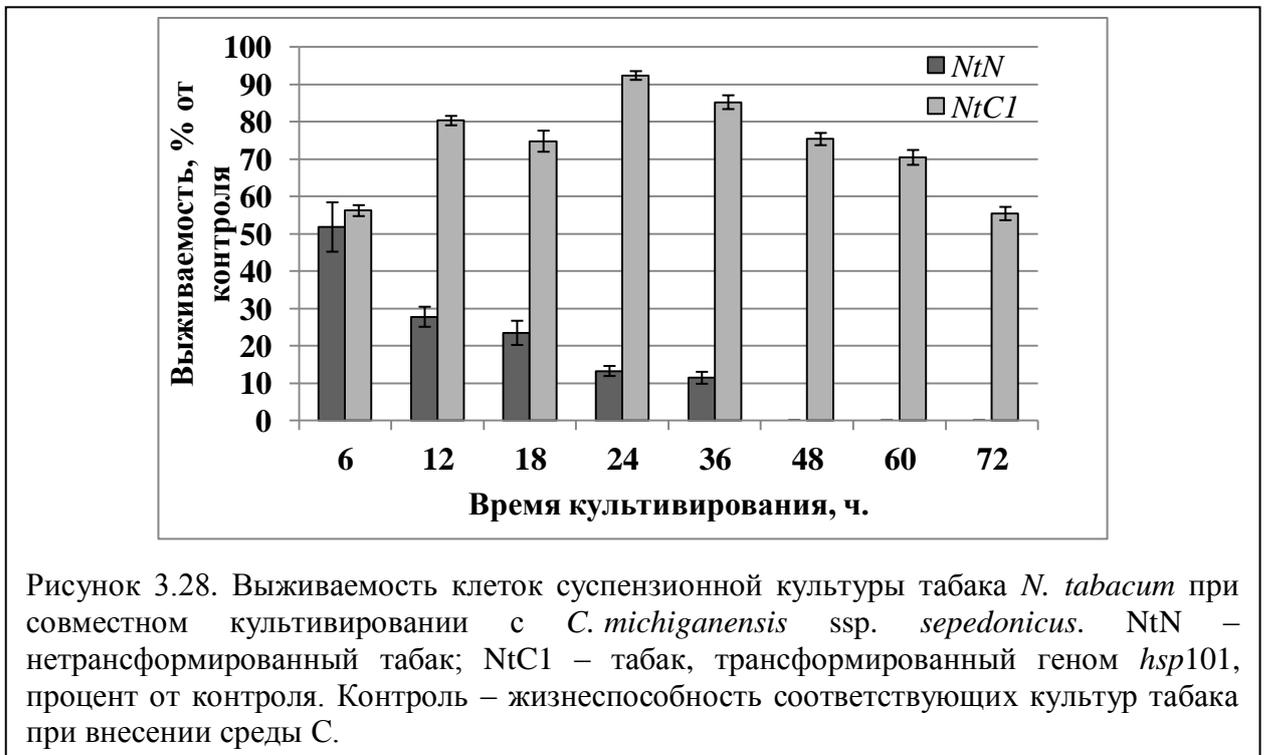
Рисунок 3.27. Иммуноблоттинг белков *N. tabacum* с антителами к Hsp101.

NtN – нетрансформированный табак, NtC1 – табак, трансформированный геном *hsp101*.

Количество белка на трек – 50мкг.

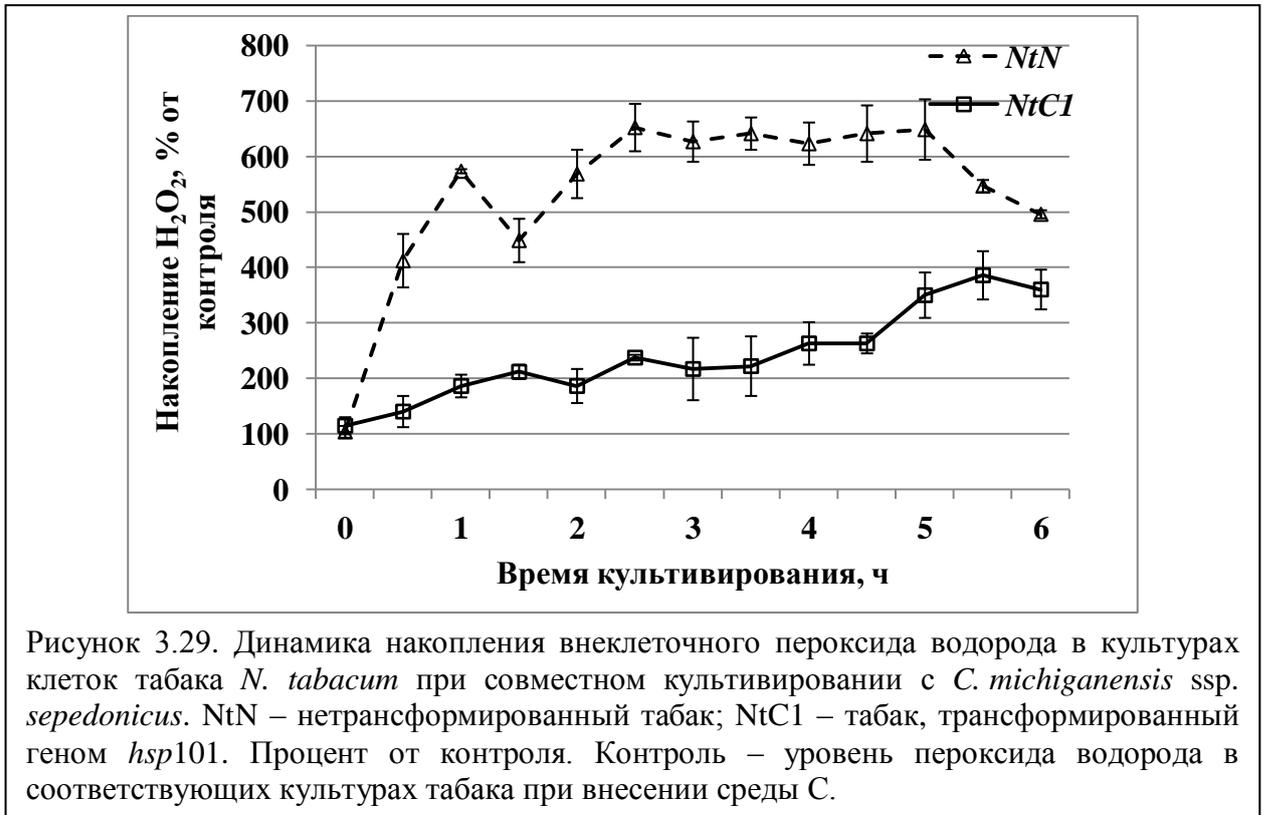
Культуру клеток табака, трансформированного геном *hsp101*, инокулировали бактериальной суспензией *Cms*. Выживаемость растительных клеток в ходе совместного культивирования оценивали по реакции восстановления ТТХ. В качестве контроля брали растительную суспензию, инокулированную стерильной средой С.

На рисунке 3.28. представлены данные изменения процента живых клеток трансформированной культуры по отношению к контролю. Для сравнения представлена выживаемость клеток нетрансформированного табака.



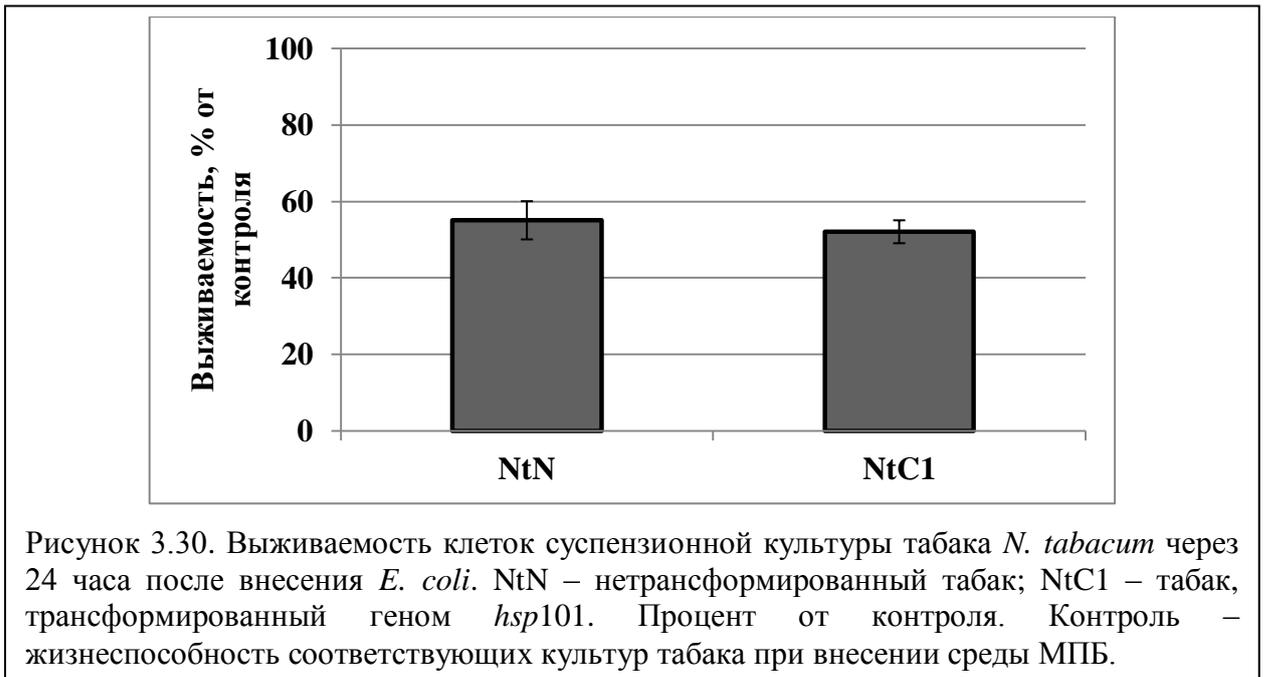
Процент живых клеток нетрансформированного табака резко снижался в первые сутки совместного культивирования с *Cms*: к 24 часам он составлял только 15%, в то время как выживаемость клеток трансформированного табака – 90% и постепенно начинала снижаться только к третьим суткам совместного культивирования. Полученные результаты дают основания предполагать, что Hsp101 может быть задействован в механизмах развития программируемой гибели клеток растений.

Определяли образование активных форм кислорода в культуре клеток трансформированного табака при действии *Cms* (Рис. 3.29.).



Из представленных на рисунке результатов видно, что интенсивность генерации пероксида водорода при действии *Cms* в культуре клеток табака, трансформированного геном *hsp101*, значительно ниже, чем у нетрансформированного табака. Методом цейтраферной съемки регистрировали движение цитоплазмы в культуре клеток трансформированного табака через 4 часа после внесения *Cms*, в то время как у нетрансформированного табака в это момент уже не наблюдалось движение цитоплазмы. Таким образом, высокий уровень *Hsp101* в трансгенной культуре табака подавляет развитие ПКС и резко снижает уровень внеклеточного пероксида водорода.

Специфичность защитных функций БТШ, т.е. участие именно в иммунных реакциях, определяли по оценке выживаемости клеток культур трансформированного и нетрансформированного табака в ходе совместного культивирования с *E. coli* (Рис.3.30.).



Из представленного рисунка видно, что внесение *E. coli* влияло на выживаемость растительных клеток, причем практически одинаково снижало ее, как в клетках нетрансформированного (55%), так и трансформированного табака (50%). *E. coli*, являясь патогеном животных, а не фитопатогеном, не обладает эффекторами, специфично активирующими иммунные реакции растения, в том числе СЧ реакцию. Этому патогену, вероятно, присущи только консервативные микробные молекулярные паттерны. Таким образом, отсутствие какого-либо эффекта сверхэкспрессии *Hsp101* на жизнеспособность клеток табака при действии *E. coli*, в отличие от описанного выше повышения жизнеспособности при действии *Cms*, говорит в пользу участия *Hsp101* в активации реакций специфического эффектор-активируемого иммунитета.

3.7.3. Участие БТШ в защитных реакциях картофеля при заражении *Cms*

Фитопатоген *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus* у единственного известного природного хозяина картофеля вызывает бактериоз, приводящий к неуправляемой гибели клеток растения.

Для изучения роли БТШ в процессе гибели растительной клетки при развитии заболевания использовали условия максимально эффективные для усиленной экспрессии белков групп Hsp70 и Hsp101. Суспензионную культуру клеток картофеля сорта Жуковский ранний инкубировали при температуре 37°C в течение 120 минут, после периода 120 минут при 26°C культуру заражали бактериальной суспензией *Cms*. Выживаемость растительных клеток оценивали через 24 часа совместного культивирования с *Cms* по способности восстанавливать ТТХ по ранее описанному методу. Результаты рассчитывали в виде процента от контроля. Контролем считали жизнеспособность растительных клеток, подвергнутых данной тепловой обработке, но не зараженных бактериальной суспензией. Полученные данные сравнивали с выживаемостью растительных клеток, необработанных температурой перед заражением *Cms* (Рис. 3.31.).

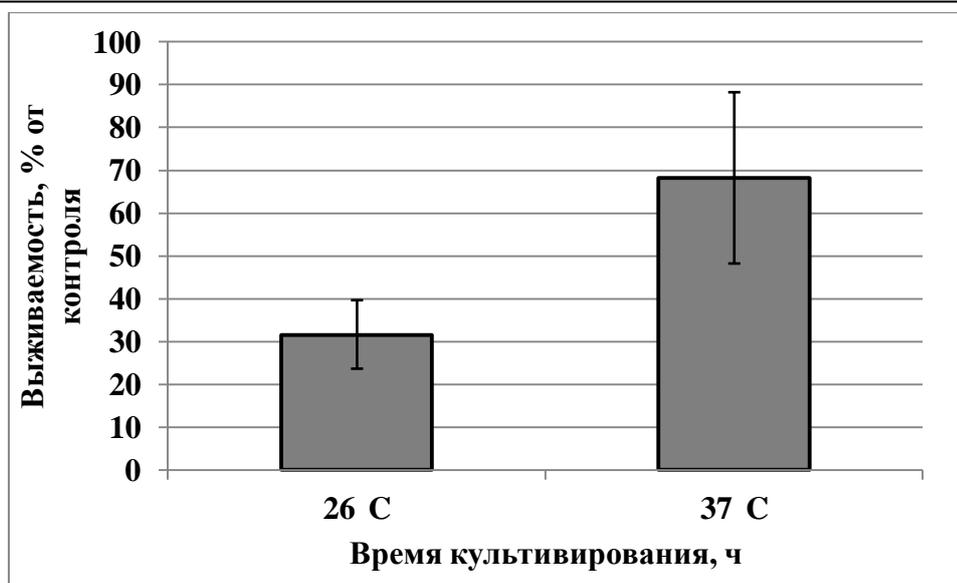


Рисунок 3.31. Влияние предварительной тепловой обработки на выживаемость суспензионной культуры клеток *S. tuberosum* восприимчивого сорта Жуковский ранний при заражении *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus* с предварительной температурной обработкой и без нее, процент от контроля. Контроль – жизнеспособность культур клеток при внесении среды С при соответствующих температурах.

26°C – выживаемость растительных клеток при заражении без предварительной тепловой обработки.

37°C – выживаемость растительных клеток при заражении после предварительной тепловой обработки 37°C (120 мин), 26°C (120 мин).

Процент живых клеток культуры картофеля после 24 часов совместного культивирования с *Sms* составляет около 40% (вариант 26°C). Предварительная инкубация растительной культуры при 37°C (вариант 37°C) увеличивала процент живых клеток примерно до 70%. Таким образом, полученные данные позволяют предполагать проявление протекторной функции белков теплового шока в системе несовместимых взаимоотношений растения и патогена.

Так как гибель у клеток табака и картофеля при заражении *Sms* обусловлена разными процессами (СЧ-реакция и развитие заболевания), можно предположить, что функции белков теплового шока в этих процессах гибели носят неспецифический протекторный характер. Но данные, полученные с помощью культуры клеток табака, трансформированного *hsp101*, позволяют говорить о специфических функциях Hsp101. То есть наряду с неспецифическими функциями шаперонов при действии патогенна Hsp101 принимает участие в развитии реакций специфического эффектор-активируемого иммунитета. Механизм этого действия для Hsp101 остается неизвестен. Имеются сведения, что Hsp90 и Hsp70 регулируют стабильность участников реакций эффектор-активируемого иммунитета, предотвращая аутоиммунную гибель клетки (Kadota et al., 2010; Kawano et al., 2010). Можно ожидать, что роль Hsp101 в развитии реакций специфического уровня иммунитета аналогична роли выше упомянутых белков, а именно регуляция функциональности каких-либо участников реакций эффектор-активируемого иммунитета.

3.8. Влияние устойчивости растений на способность фитопатогена *Sms* формировать биопленки

Большинство микроорганизмов в естественных и искусственно созданных окружающих средах существует в виде структурированных, прикрепленных к поверхности сообществ – биопленок (Donlan, 2002).

Развитие биопленочных сообществ является одной из основных стратегий выживания бактерий в занимаемой ими экологической нише. Бактерии в прикрепленном состоянии, будучи интегрированными в биопленку, защищены от повреждающих факторов внешней среды и антибактериальных препаратов в организме хозяина при инфекции. Показано, что микробные биопленки ответственны за этиологию и патогенез многих острых и, особенно, хронических бактериальных инфекций у человека (Costerton et al., 1999). Для фитопатогенных и симбиотических микроорганизмов также характерно формирование биопленок на поверхности и внутри растительного организма (Vogino et al., 2013).

В настоящее время установлено, что *Cms*, как и другие васкулярные фитопатогены, формирует биопленки в сосудистой системе растений картофеля (Вае et al., 2014). Способность к образованию биопленку васкулярных патогенов является одним из факторов вирулентности, так как способствует увеличению резистентности к растительным антимикробным соединениям и блокированию ксилемного тока (Mansfield et al., 2012).

Но в отличие от искусственных поверхностей, растительный организм не является инертным, и процессы адгезии и агрегации микроорганизмов должны сопровождаться реакциями растительной клетки. Но каким образом растения регулируют процесс формирования биопленок фитопатогенами – на данный момент не до конца изучено. Поэтому представлялось важным изучить влияние растения на процесс образования биопленок патогенами в зависимости от резистентности, как сортовой, так и видовой.

С помощью методов микроскопии было показано, что фитопатоген *Cms* способен к формированию биопленочных образований не только в сосудах ксилемы, но и на клетках суспензионной культуры табака.

С использованием дифференционно-интерференционного контраста (DIC) была показана агрегация бактерий *Cms* на клетках суспензионной культуры табака через 24 часа совместного культивирования (Рис. 3.32.).

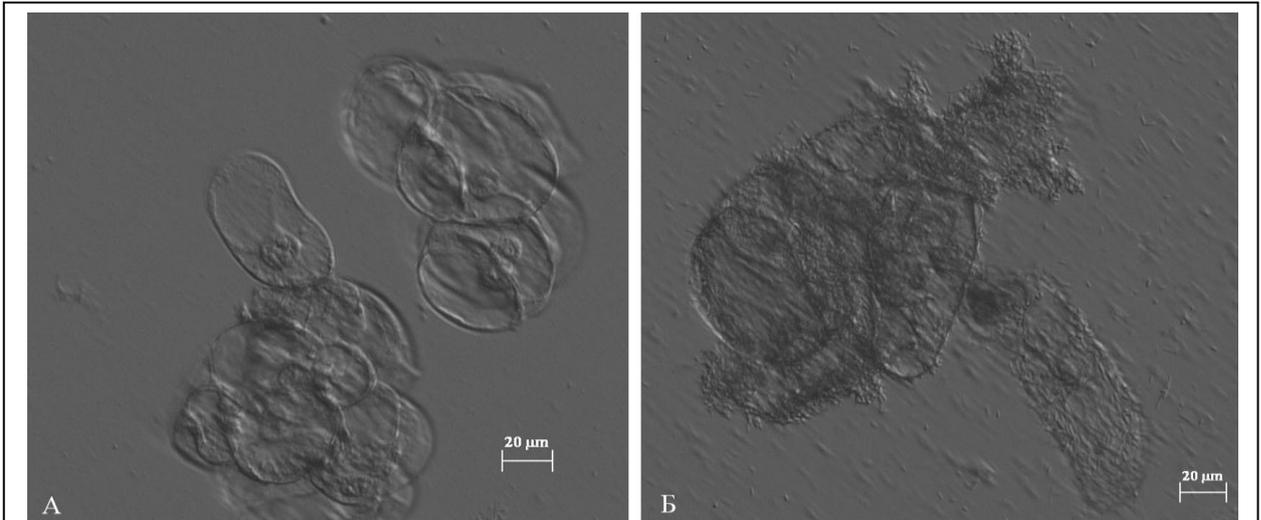


Рисунок 3.32. Агрегация фитопатогена *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus* на клетках культуры табака *N. tabacum* после 24ч совместного культивирования. А – контроль; Б – культивирование с *Cms*.

Микрофотография в дифференционно-интерференционном контрасте (DIC). Бар равен 20 мкм.

Флуоресцентная микроскопия с использованием двойного окрашивания флуоресцеин диацетатом (FDA) и пропидий йодидом (PJ) позволила определить жизнеспособность растительных и бактериальных клеток при формировании биопленочных образований (Рис. 3.33.).

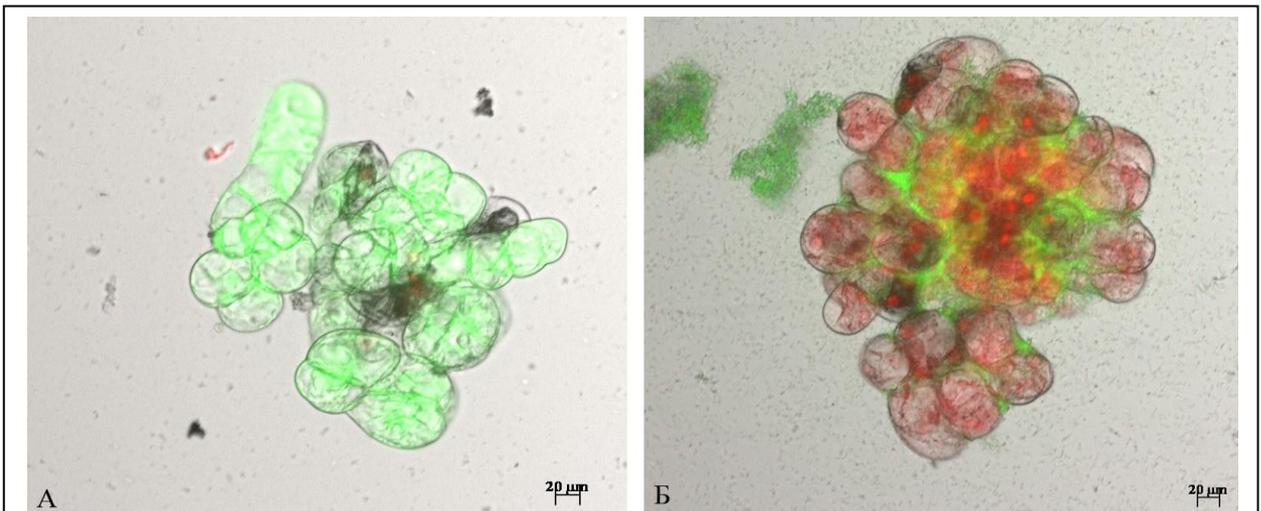
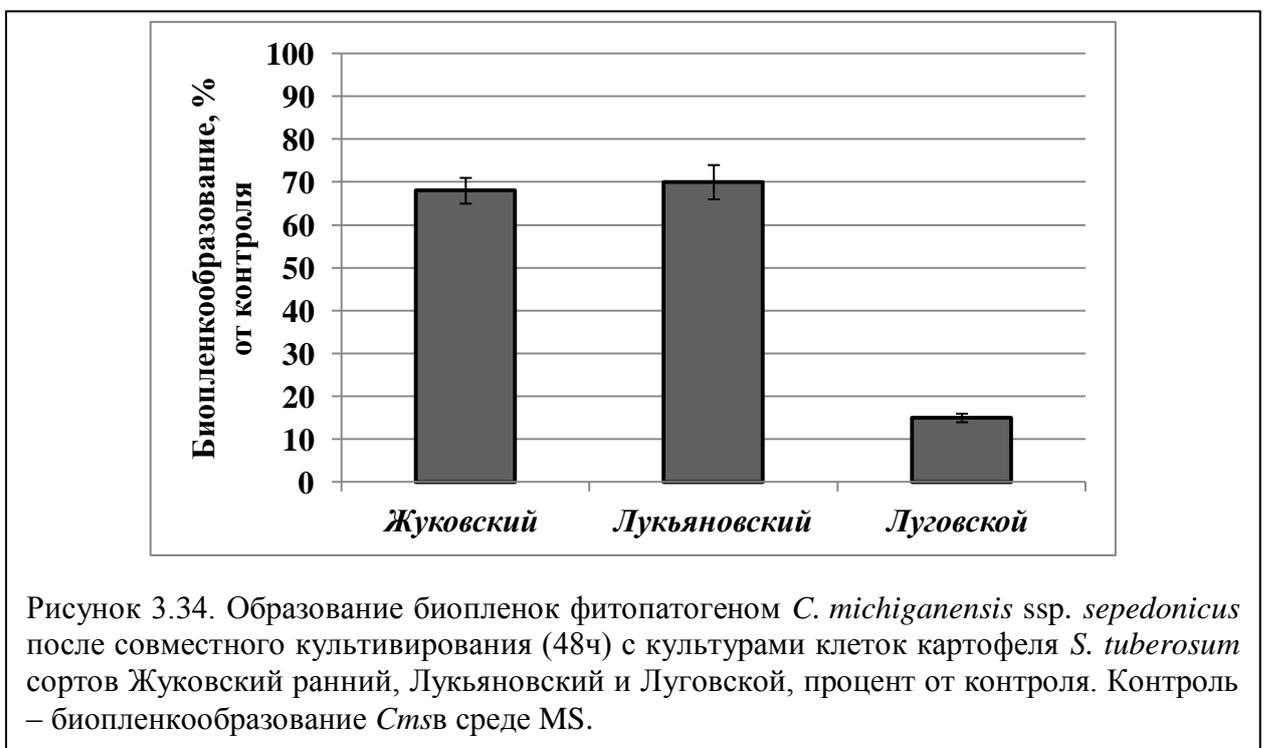


Рисунок 3.33. Жизнеспособность растительных и бактериальных клеток при агрегации фитопатогена *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus* на клетках культуры табака *N. tabacum* после 24ч совместного культивирования. А – контроль (внесение среды С); Б – культивирование с *Cms*.

Флуоресцентная микроскопия (10мг/мл PJ – мертвые клетки красный канал, 10мМ FDA – живые клетки зеленый канал).

Накопление FDA в цитоплазме и флуоресценция в зеленом канале является показателем целостности клеточной мембраны и метаболической активности клеток, а флуоресценция PJ в красном канале свидетельствует о гибели эукариотических клеток. При агрегации фитопатогена на растительных клетках происходит гибель клеток, о чем свидетельствует флуоресценция пропидий йодида в красном канале.

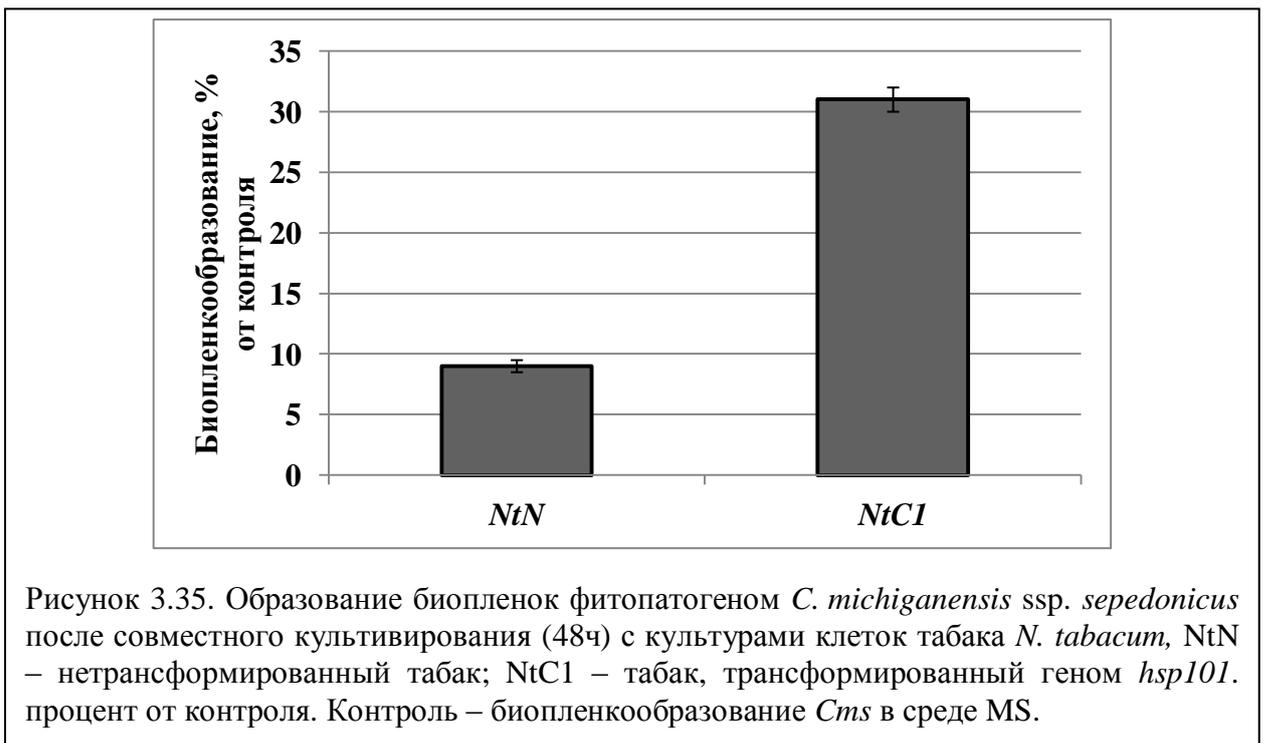
Количественную оценку образования биопленок проводили с помощью метода статического культивирования и использования красителя Генциан виолет. Проводили оценку способности патогена к биопленкообразованию после совместного культивирования с культурами клеток растений в течение 48 часов. Способность к биопленкообразованию оценивали в виде процента от контроля. Контролем считали биопленкообразование *Cms* в среде MS. На рисунке 3.34. представлена оценка способности *Cms* к биопленкообразованию после совместного культивирования с культурами клеток картофеля, различных по устойчивости сортов (Рис. 3.34.).



Выявлено, что наибольшее образование биопленок *Cms* происходило после взаимодействия бактерий с восприимчивыми (неустойчивыми) к

патогену сортами картофеля: Лукьяновский и Жуковский ранний (70% и 67% соответственно). При взаимодействии фитопатогена с устойчивым сортом Луговской биопленкообразование составляло 15% от контроля. Следовательно, процесс образования пленок фитопатогеном зависит от влияния растения-хозяина и определяется сортовой устойчивостью картофеля к данному патогену. А устойчивость и восприимчивость сорта определяется иммунным статусом растения и выражается в наличии или отсутствии защитных реакций и их интенсивность.

Определяли способность к биопленкообразованию *Cms* после совместного культивирования с культурами клеток табака – нетрансформированного и трансформированного геном *hsp101* (Рис. 3.35.).

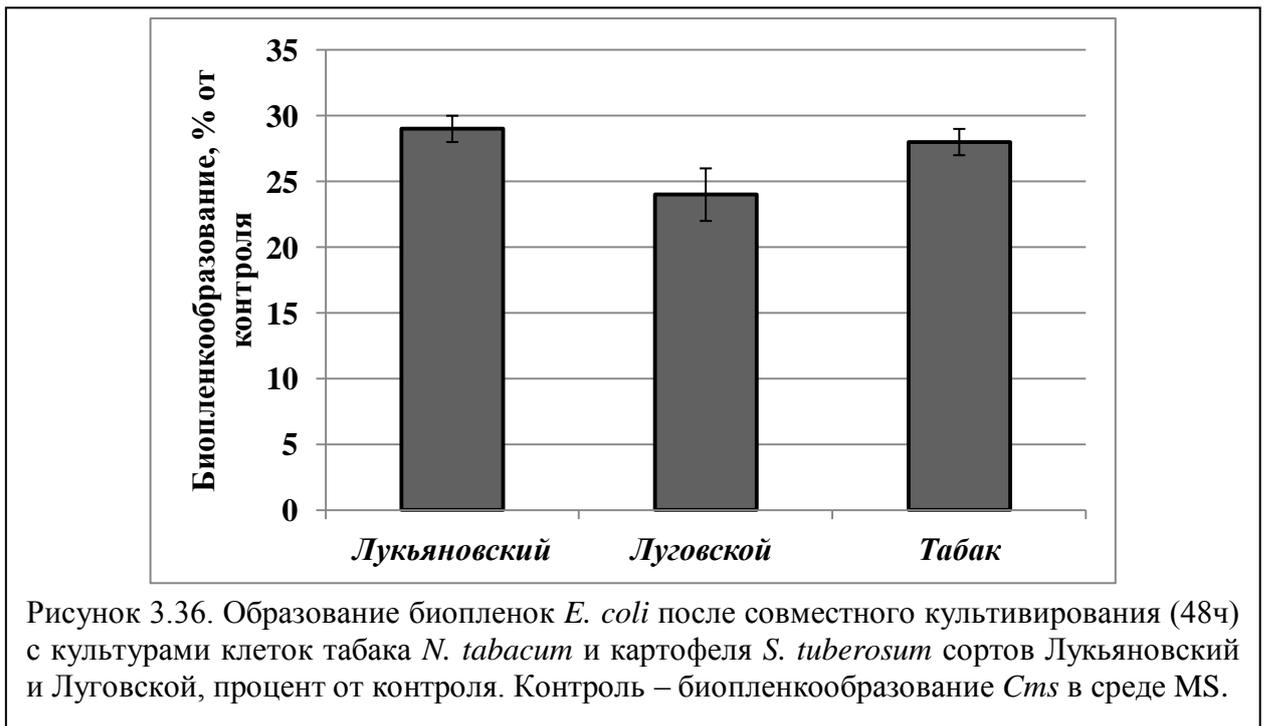


Оказалось, что совместное культивирование возбудителя кольцевой гнили картофеля с культурой клеток табака значительно подавляет его способность к биопленкообразованию (9% от контроля).

Было выявлено, что трансформированный геном *hsp101* табак менее подавлял биопленкообразование *Cms* по сравнению с нетрансформированным табаком (30% и 9% соответственно). Как было

показано ранее, табак, трансформированный *hsp101*, обладает повышенным уровнем Hsp101 (Рис. 3.27.), что модулирует развитие процесса программируемой гибели при действии патогена, в частности, снижает генерацию апопластного пероксида водорода (Рис. 3.29.). Учитывая тот факт, что активные формы кислорода, помимо реализации сигнальных функций, оказывают непосредственное повреждающее действие на патоген. Можно заключить, что интенсивность защитных реакций растения, а именно генерации активных форм кислорода, играют роль в подавлении способности к биопленкообразованию фитопатогена.

Определяли, будет ли растительный организм влиять на способность к биопленкообразованию нетипичного для растений микроорганизма – возбудителя заболеваний человека и животных – *E. coli* (Рис. 3.36.).



Культивирование *E. coli* с клетками табака и картофеля сортов, различающихся по резистентности к *Sms*, не показало зависимости биопленкообразования у нетипичного для растения патогена от сортовой и видовой специфичности растения. Для всех культур наблюдалось биопленкообразование в диапазоне 20-30% от контроля.

Следовательно, способность к образованию биопленок у фитопатогена зависит от иммуностатуса растения, а интенсивность их образования определяется степенью резистентности растения к патогену. Биопленкообразование не являющегося патогеном растений микроорганизма не зависит от сортовой и видовой резистентности. По-видимому, это связано с отсутствием сопряженной эволюции у данного патогена с растительными организмами, что привело к тому, что у патогена нет специфических эффекторов, а у растений систем их рецепции, определяющих активацию защитных реакций.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе изучены ответные реакции на действие *S. michiganensis* ssp. *sepedonicus* у картофеля, как растения-хозяина, и табака, как растения-нехозяина, при совместимых и несовместимых взаимоотношениях организмов. При заражении *Sms* листьев табака в месте инфицирования происходит развитие локальных некрозов – проявление реакции сверхчувствительности. Выявлено, что реакция эта проявляется как на листьях (Рис. 3.2.), так и на корнях растения (Рис. 3.3.), где сверхчувствительной гибели подвергаются меристематические клетки. Гибель меристематических клеток подавляет апикальное доминирование и активирует точки роста боковой меристемы, в результате чего наблюдалось интенсивное образование боковых корешков (Рис. 3.4.), что компенсирует потерю функций апикальной меристемы, заключающихся в регуляции гормонального баланса растений. Данный эффект образования боковых корешков позволяет растению не ограничивать поступление воды и питательных веществ. В работе нами установлено, что развитие реакции сверхчувствительности как на листьях, так и на корнях, сопровождается индукцией долговременной системной приобретенной устойчивости растений к широкому кругу патогенов, в том числе, к нетипичному для растений патогену – возбудителю заболеваний человека и животных *E.coli* (Рис. 3.6.).

Из результатов полученных нами следует, что действие патогена *S. michiganensis* ssp. *sepedonicus* на растительные клетки приводит к быстрому двухфазному накоплению активных форм кислорода (Рис. 3.18.), остановке движения цитоплазмы, отхождению протопласта от клеточной стенки (Рис. 3.16.) и быстрой гибели растительных клеток (Рис. 3.11.), что свидетельствует в пользу активаций механизмов эффектор-активируемого иммунитета у растений табака при действии *Sms*. Нами показано, что табак

значительно подавляет способность *Cms* к образованию биопленок (Рис. 3.35.), что является свидетельством эффективности иммунных реакций этого растения, так как биопленкообразование имеет важное значение для фитопатогенов, колонизирующих сосудистую систему растений, в том числе и *Cms* (Mansfield et al., 2012).

Результаты нашей работы показывают, что экзометаболиты возбудителя кольцевой гнили вызывают у табака развитие реакций эффектор-активируемого иммунитета, что проявляется в развитии реакции СЧ в месте инокуляции и СПУ в целом растении (Рис. 3.9., 3.10.). При этом в культуре клеток экзометаболитов вызывают значительное накопление активных форм кислорода (Рис. 3.18.) и быстро развивающийся процесс гибели клеток (Рис. 3.12.). Данные, полученные нами на двух уровнях организации растительного организма, подтверждают друг друга и позволяют полагать о наличии эффекторов в составе экзометаболического комплекса возбудителя кольцевой гнили.

У картофеля, растения-хозяина, происходит развитие защитных реакций на действие *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus* в зависимости от сортовой устойчивости к данному патогену. В основе сортовой устойчивости лежат механизмы специфического уровня врожденного иммунитета, а именно, присутствие *R*-генов и их продуктов, способных распознать эффекторную молекулу патогена и своевременно активировать защитные механизмы (Jones, Dangl, 2006). В проведенных нами исследованиях отсутствие СЧ реакции, как фенотипического проявления эффектор-активируемого иммунитета, у растений картофеля при действии изучаемого патогена говорит о низкой эффективности защитных реакций. В пользу данного предположения свидетельствует низкий уровень генерации активных форм кислорода у устойчивого сорта картофеля (Рис. 3.19.). При этом прослеживается двухфазность этого процесса, свидетельствующая об индукции механизма эффектор-активируемого иммунитета, но

интенсивность данных реакций не достаточна для развития сверхчувствительного ответа. В настоящей работе показано, что у восприимчивого сорта наблюдается незначительное повышение содержания АФК (Рис. 3.21.), соответствующее неспецифической реакции на стресс, а также подавление специфических защитных механизмов. Гибель клеток восприимчивого сорта картофеля происходит в результате развития болезни по типу неуправляемого некроза. Результаты наших экспериментов свидетельствуют о том, что резистентность сортов картофеля влияет на способность *Cms* к биопленкообразованию: устойчивый сорт снижает способность патогена к формированию биопленок, что вызвано развитием защитных реакций эффектор-активируемого иммунитета; восприимчивые сорта не подавляют биопленкообразование данного патогена (Рис. 3.34.). Влияние растений на биопленкообразование обусловлено отличием в развитии защитных реакций у сортов картофеля, различающихся по степени резистентности к *Cms*.

В защитных реакциях растений на патоген задействовано множество молекулярных участников. В настоящей работе анализировали роль стрессового белка Hsp101 в реализации ответа растения на воздействие фитопатогена *Cms*. Результаты показали, что усиление экспрессии БТШ при температурном воздействии приводило к снижению эффективности защитных реакций табака на действие *Cms*, таких как накопление активных форм кислорода (Рис. 3.26.). Полученные результаты позволяют предполагать об участии БТШ в реализации иммунных механизмов в несовместимой системе. Менее интенсивная генерация активных форм кислорода (Рис. 3.29.), более поздняя остановка движения цитоплазмы в культуре трансформированного табака с конститутивным синтезом Hsp101 при действии *Cms* подтверждает это предположение. Нами показано, что клетки культуры трансформированного табака меньше подавляли биопленкообразование *Cms*, чем клетки культуры нетрансформированного

табака (Рис. 3.35.). В то же время, сверхэкспрессия Hsp101 не оказывала ни какого эффекта на жизнеспособность культуры табака при культивировании с *E. coli* (Рис. 3.30.) – нетипичного патогена, который не активирует специфичные защитные реакции в клетках табака. Таким образом, БТШ модулируют развитие реакций специфического эффектор-активируемого иммунитета растений в условиях искусственного повышения их экспрессии в модельной системе.

Результаты нашей работы показали, что повышение температуры культивирования для индукции синтеза БТШ, при инфицировании культуры клеток картофеля восприимчивого сорта способствует большей выживаемости растительных клеток (Рис. 3.31.). Так как в совместимой системе подавлены механизмы эффектор-активируемого иммунитета, повышение жизнеспособности растительных клеток происходит в результате реализации неспецифических функций комплекса БТШ в качестве белков-шаперонов. Таким образом, БТШ влияют на развитие иммунитета при совместимых и несовместимых взаимоотношениях организмов.

Эволюцию взаимоотношений возбудителя кольцевой гнили картофеля с растениями можно представить следующим образом. *S. michiganensis* ssp. *sepedonicus*, как и любой микроорганизм, обладает консервативными молекулярными паттернами (МAMP), которые узнаются паттерн-распознающими рецепторами растительных клеток. Их детекция приводит к активации паттерн-активируемого неспецифического иммунитета. Считается, что возбудитель кольцевой гнили картофеля произошел от непатогенной эндوفитной бактерии, не вызывающей патологический процесс у растений (Eichenlaub, Gartemann, 2011). Вероятно, произошло это в результате приобретения патогеном в ходе эволюции факторов патогенности и эффекторов, способных подавить неспецифические защитные реакции. Результатом взаимодействия обладающей эффекторами бактерии *Sms* и растения является развитие заболевания – совместимый тип

взаимоотношений растения и микроорганизма. В изучаемой нами системе этот тип взаимоотношений иллюстрирует пара *Cms* – картофель восприимчивого сорта. Эволюция со стороны растений, а также направленная селекция, привели к появлению относительно устойчивых сортов картофеля. Устойчивость таких сортов можно объяснить развитием защитных реакций, активация которых стала возможной при появлении рецепторов, распознающих эффекторные молекулы патогена. Как показали результаты нашего исследования, интенсивность защитных реакций не достаточна для активации абсолютной устойчивости. Возможно, происходит это за счет присутствия нескольких типов эффекторных молекул (что часто встречается у многих патогенов), некоторые из них могут не распознаваться в растительной клетке, что снижает интенсивность защитных реакций и в итоге приводит к задержке развития заболевания (латентная фаза болезни). У табака, представителя семейства пасленовых, очевидно, присутствуют рецепторы к большему количеству различных эффекторов *Cms*, что определяет развитие защитных реакции большей интенсивности, достаточной для развития СЧ-реакции и СПУ и реализации несовместимого типа взаимоотношений растения и микроорганизма. Данную гипотезу можно проверить с помощью биоинформационного анализа на основании поиска и сравнения предполагаемых генов устойчивости (*R*-генов) у представителей семейства пасленовых, а также генов вирулентности у представителей рода *Clavibacter*, большинство из которых являются фитопатогенами для растений данного семейства.

ВЫВОДЫ

1. В системе несовместимых взаимоотношений табак *N.tabacum-Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus* происходит индукция специфического эффектор-активируемого иммунитета, о чем свидетельствует развитие реакции сверхчувствительности (накопление пероксида водорода, быстрая остановка движения цитоплазмы, плазмолиз), а также формирование системной приобретенной устойчивости.
2. Экзометаболиты *C. michiganensis ssp. sepedonicus* у растений табака определяют индукцию специфического эффектор-активируемого иммунитета с развитием характерных реакций: накопление пероксида водорода, быстрое развитие процесса гибели, развитие реакции сверхчувствительности и системной приобретенной устойчивости. Предполагается, что экзометаболитный комплекс *C. michiganensis ssp. sepedonicus* содержит ряд молекул эффекторной природы, некоторые из них являются термостабильными.
3. Действие *C. michiganensis ssp. sepedonicus* на устойчивый сорт картофеля Луговской приводит к двухфазному повышению уровня пероксида водорода, свидетельствующему в пользу индукции эффектор-активируемого иммунитета, что характеризует несовместимый тип взаимоотношений.
4. У восприимчивых сортов картофеля при действии *C. michiganensis ssp. sepedonicus* происходит подавление защитных специфических реакций (образование пероксида водорода), а также гибель клеток в результате неуправляемого некротического процесса, что характеризует совместимый тип взаимоотношений.
5. Комплекс белков теплового шока обеспечивает повышение жизнеспособности клеток картофеля при действии *C. michiganensis ssp. sepedonicus* за счет реализации неспецифических функций в качестве

белков-шаперонов. Сверхэкспрессия Hsp101 в трансформированной культуре табака увеличивает выживаемость клеток при действии *S. michiganensis ssp. sepedonicus*, принимая участие в регуляции механизмов эффектор-активируемого иммунитета. Таким образом, БТШ влияют на развитие иммунитета при совместимых и несовместимых взаимоотношениях организмов.

6. Растения табака и картофеля влияют на способность *S. michiganensis ssp. sepedonicus* формировать биопленки в зависимости от видовой и сортовой резистентности к данному фитопатогену и не оказывают влияния на способность формировать биопленки нетипичного для растений патогена человека и животных *E. coli*, что обусловлено отсутствием сопряженной эволюции растений с данным микроорганизмом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бояркина С.В. Применение метода ПЦР в диагностике возбудителя кольцевой гнили картофеля / С. В. Бояркина, Ю. В. Омеличкина, Т. Н. Шафикова // Известия Иркутского Государственного Университета, Серия: Биология, Экология. – 2008. – Т. 1, № 2. – С. 41–44.
2. Ванюшин Б.Ф. Апоптоз у растений / Б. Ф. Ванюшин // Успехи Биологической Химии. – 2001. – Т. 41. – С. 3–38.
3. Васильев Л.А. Вызванная CN- гибель клеток в листьях растений / Л. А. Васильев, А. А. Воробьев, Е. В. Дзюбинская, А. В. Несов, А. А. Шестак, В. Д. Самуилов // Биохимия. – 2007. – Т. 72, № 5. – С. 707–713.
4. Войников В.А. Белки теплового шока / В. А. Войников, Г. Г. Иванова, А. В. Рудиковский // Физиология Растений. – 1984. – Т. 31. – С. 970–979.
5. Еникеев А.Г. Об использовании 2,3,5,-трифенилтетразолий хлорида для оценки жизнеспособности культур растительных клеток / А. Г. Еникеев, Е. Ф. Высоцкая, Л. А. Леонова, К. З. Гамбург // Физиология Растений. – 1995. – Т. 42, № 3. – С. 423–426.
6. Ивантер Э.В. Элементарная биометрия / Э. В. Ивантер, А. В. Коросов – Петрозаводск: ПетрГУ, 2010.– 104с.
7. Ильина Т.С. Системы коммуникаций у бактерий и их роль в патогенности / Т. С. Ильина, Ю. М. Романова, А. Л. Гинцбург // Молекулярная Генетика Микробиология и Вирусология. – 2006. – № 3. – С. 22–29.
8. Максимов И.В. Влияние салициловой и жасмоновой кислот на компоненты про-/антиоксидантной системы в растениях картофеля при фитофторозе / И. В. Максимов, А. В. Сорокань, Е. А. Черепанова, О. Б. Сурина, Н. Б. Трошина, Л. Г. Яруллина // Физиология Растений. – 2011. – Т. 58, № 2. – С. 243–251.

9. Маркова Ю.А. Природная среда как потенциальное местообитание патогенных и условно-патогенных энтеробактерий / Ю. А. Маркова, Е. Д. Савилов, Е. В. Анганова, В. А. Войников – Иркутск: РИО ГБОУ ДПО ИГМАПО, 2013.– 144с.
10. Омеличкина Ю.В. Ответные реакции растений и культуры клеток табака на заражение *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus* / Ю. В. Омеличкина, Т. Н. Шафикова, А. Л. Алексеенко, Ю. А. Маркова, А. Г. Еникеев, Е. Г. Рихванов // В Мире Научных Открытий. – 2010. – № 1-4. – С. 89–94.
11. Папкина А.В. Модифицированный метод определения проникновения и распространения бактерий в растениях картофеля *in vitro* / А. В. Папкина, Ю. А. Маркова, М. А. Живетьев, А. Л. Турская, А. И. Перфильева, Е. В. Рымарева, И. А. Граскова, В. К. Войников // Вестник ВСГУТУ. – 2013. – № 3 (42). – С. 62–66.
12. Перфильева А.И. Влияние моноодацетата натрия и тепловой обработки на продуктивность картофеля в вегетационных и полевых опытах / А. И. Перфильева, Е. В. Рымарева, Е. Г. Рихванов // Агрохимия. – 2013. – № 6. – С. 40–46.
13. Романенко А.С. Высокая инфекционная нагрузка возбудителя кольцевой гнили картофеля вызывает у растения-хозяина необычные симптомы заболевания / А. С. Романенко, Л. А. Ломоватская, И. А. Граскова, Р. К. Саляев // Доклады Академии Наук. – 2000. – Т. 374, № 5. – С. 712.
14. Сорокань А.В. Взаимодействие салицилат- и жасмонат-индуцируемых сигнальных путей в развитии устойчивости картофеля к фитофторозу с участием гена пероксидазы *M21334* / А. В. Сорокань, Г. Ф. Бурханова, И. В. Максимов // Физиология Растений – 2014. – Т. 61, № 4. – С. 522–528.

15. Таланова В.В. Экспрессия генов транскрипционного фактора *WRKY* и стрессовых белков у растений пшеницы при холодовом закаливании и действии АБК / В. В. Таланова, А. Ф. Титов, Л. В. Топчиева, И. Е. Малышева, Ю. В. Венжик, С. А. Фролова // Физиология Растений. – 2009. – Т. 56. – С. 776–782.
16. Тарчевский И.А. Индукция салициловой кислотой компонентов олигомерных белковых комплексов / И. А. Тарчевский, В. Г. Яковлева, А. М. Егорова // Физиология Растений. – 2012. – Т. 59, № 4. – С. 532–542.
17. Тарчевский И.А. Компартиментация салицилат-индуцируемых белков / И. А. Тарчевский // Прикладная Биохимия и Микробиология. – 2014. – Т. 50, № 4. – С. 243–251.
18. Фомичева А.С. Программированная клеточная смерть у растений / А. С. Фомичева, А. И. Тужиков, Р. Е. Белошистов, С. В. Трусова, Р. А. Галиуллина, Л. В. Мочалова, Н. В. Чичкова, А. Б. Вартапетян // Успехи Биологической Химии. – 2012. – Т. 52. – С. 97–126.
19. Шакирова Ф.М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция / Ф. М. Шакирова – Уфа: Гилем, 2001. – 160с.
20. Шафикова Т.Н. Экзополисахариды возбудителя кольцевой гнили картофеля и их взаимодействие с рецепторами плазмалеммы клеток растения-хозяина / Т. Н. Шафикова – Иркутск: Сельское Хозяйство, 2003. – 139с.
21. Шафикова Т.Н. Обнаружение внеклеточных протеиназ у возбудителя кольцевой гнили картофеля / Т. Н. Шафикова, Е. Ю. Эпова, А. С. Романенко, Р. К. Салаяев // Доклады Академии Наук. – 2009. – Т. 425, № 2. – С. 280–282.
22. Шафикова Т.Н. Трансформированная геном *hsp101* культура клеток табака обладает повышенной выживаемостью при заражении *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* / Т.Н. Шафикова, Ю.В. Омеличкина, А.С. Солдатенко, А.Г. Еникеев, Т.В. Копытина, Т.М.

- Русалёва, О.Д. Волкова // Доклады академии наук. – 2013. – Т.450, № 5. – С.621–623.
23. Шкалик В.А. Иммунитет растений / В. А. Шкалик, Ю. Т. Дьяков, А. Н. Смирнов – Москва: КолосС, 2005.– 190с.
24. Ali R. Death don't have no mercy and neither does calcium: Arabidopsis CYCLIC NUCLEOTIDE GATED CHANNEL2 and innate immunity / R. Ali, W. Ma, F. Lemtiri-Chlieh, D. Tsaltas, Q. Leng, S. von Bodman, G. A. Berkowitz // Plant Cell Online. – 2007. – V. 19, №3. – P. 1081–1095.
25. Allen I.C. The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA / I. C. Allen, M. A. Scull, C. B. Moore, E. K. Holl, E. McElvania-TeKippe, D. J. Taxman, E. H. Guthrie, R. J. Pickles, J. P.-Y. Ting // Immunity. – 2009. – V. 30, №4. – P. 556–565.
26. Anderson C.M. WAKs: cell wall-associated kinases linking the cytoplasm to the extracellular matrix / C. M. Anderson, T. A. Wagner, M. Perret, Z. H. He, D. He, B. D. Kohorn // Plant Mol. Biol. – 2001. – V. 47, №1-2. – P. 197–206.
27. Arasimowicz M. Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses / M. Arasimowicz, J. Floryszak-Wieczorek // Plant Sci. – 2007. – V. 172, №5. – P. 876–887.
28. Bae Y.-M. Growth characteristics and biofilm formation of various spoilage bacteria isolated from fresh produce: growth and biofilm of spoilage bacteria / Y.-M. Bae, L. Zheng, J.-E. Hyun, K.-S. Jung, S. Heu, S.-Y. Lee // J. Food Sci. – 2014. – V. 79, №10. – P. M2072–M2080.
29. Bai S. Structure-function analysis of barley NLR immune receptor MLA10 reveals its cell compartment specific activity in cell death and disease resistance / S. Bai, J. Liu, C. Chang, L. Zhang, T. Maekawa, Q. Wang, W. Xiao, Y. Liu, J. Chai, F. L. W. Takken, P. Schulze-Lefert, Q.-H. Shen // PLoS Pathog. – 2012. – V. 8, №6. – P. e1002752.

30. Bai X. AY-WB Phytoplasma secretes a protein that targets plant cell nuclei / X. Bai, V. R. Correa, T. Y. Toruño, E.-D. Ammar, S. Kamoun, S. A. Hogenhout // *Mol. Plant. Microbe Interact.* – 2008. – V. 22, №1. – P. 18–30.
31. Beckwith J. The Sec-dependent pathway / J. Beckwith // *Res. Microbiol.* – 2013. – V. 164, №6. – P. 497–504.
32. Bednarek P. Chemical warfare or modulators of defence responses - the function of secondary metabolites in plant immunity / P. Bednarek // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2012. – V. 15, №4. – P. 407–414.
33. Belenghi B. Metacaspase activity of *Arabidopsis thaliana* is regulated by S-nitrosylation of a critical cysteine residue / B. Belenghi, M. C. Romero-Puertas, D. Vercammen, A. Brackenier, D. Inzé, M. Delledonne, F. Van Breusegem // *J. Biol. Chem.* – 2007. – V. 282, №2. – P. 1352–1358.
34. Belkhadir Y. Brassinosteroids modulate the efficiency of plant immune responses to microbe-associated molecular patterns / Y. Belkhadir, Y. Jaillais, P. Epple, E. Balsemão-Pires, J. L. Dangl, J. Chory // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2012. – V. 109, №1. – P. 297–302.
35. Bentley S.D. Genome of the actinomycete plant pathogen *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus* suggests recent niche adaptation / S. D. Bentley, C. Corton, S. E. Brown, A. Barron, L. Clark, J. Doggett, B. Harris, D. Ormond, M. A. Quail, G. May, D. Francis, D. Knudson, J. Parkhill, C. A. Ishimaru // *J. Bacteriol.* – 2008. – V. 190, №6. – P. 2150–2160.
36. BERPPOHL A. Exopolysaccharides in the pathogenic interaction of *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* with tomato plants / A. BERPPOHL, J. Dreier, R. Bahro, R. Eichenlaub // *Microbiol. Res.* – 1996. – V. 151. – P. 391–399.
37. Besson-Bard A. New insights into nitric oxide signaling in plants / A. Besson-Bard, A. Pugin, D. Wendehenne // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2008. – V. 59. – P. 21–39.
38. Bestwick C.S. Hrp Mutant of *Pseudomonas syringae pv phaseolicola* induces cell wall alterations but not membrane damage leading to the

- hypersensitive reaction in lettuce / C. S. Bestwick, M. H. Bennett, J. W. Mansfield // *Plant Physiol.* – 1995. – V. 108, №2. – P. 503–516.
39. Bindschedler L.V. Early signalling events in the apoplastic oxidative burst in suspension cultured French bean cells involve cAMP and Ca²⁺ / L. V. Bindschedler, F. Minibayeva, S. L. Gardner, C. Gerrish, D. R. Davies, G. P. Bolwell // *New Phytol.* – 2001. – V. 151, №1. – P. 185–194.
40. Bingle L.E. Type VI secretion: a beginner's guide / L. E. Bingle, C. M. Bailey, M. J. Pallen // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2008. – V. 11, №1. – P. 3–8.
41. Boccara M. Flavohaemoglobin HmpX from *Erwinia chrysanthemi* confers nitrosative stress tolerance and affects the plant hypersensitive reaction by intercepting nitric oxide produced by the host / M. Boccara, C. E. Mills, J. Zeier, C. Anzi, C. Lamb, R. K. Poole, M. Delledonne // *Plant J. Cell Mol. Biol.* – 2005. – V. 43, №2. – P. 226–237.
42. Bodman S.B. von Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria / S. B. von Bodman, W. D. Bauer, D. L. Coplin // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 2003. – V. 41, №1. – P. 455–482.
43. Bogino P.C. The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations / P. C. Bogino, M. de las M. Oliva, F. G. Sorroche, W. Giordano // *Int. J. Mol. Sci.* – 2013. – V. 14, №8. – P. 15838–15859.
44. Bolwell G.P. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system / G. P. Bolwell, L. V. Bindschedler, K. A. Blee, V. S. Butt, D. R. Davies, S. L. Gardner, C. Gerrish, F. Minibayeva // *J. Exp. Bot.* – 2002. – V. 53, №372. – P. 1367–1376.
45. Bot N. Le Entosis: cell death by invasion / N. Le Bot // *Nat. Cell Biol.* – 2007. – V. 9, №12. – P. 1346.
46. Bouarab K. A saponin-detoxifying enzyme mediates suppression of plant defences / K. Bouarab, R. Melton, J. Peart, D. Baulcombe, A. Osbourn // *Nature.* – 2002. – V. 418, №6900. – P. 889–892.

47. Brennan M.A. Salmonella induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis / M. A. Brennan, B. T. Cookson // *Mol. Microbiol.* – 2000. – V. 38, №1. – P. 31–40.
48. Brown S.E. Linear plasmid in the genome of *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus* / S. E. Brown, D. L. Knudson, C. A. Ishimaru // *J. Bacteriol.* – 2002. – V. 184, №10. – P. 2841–2844.
49. Brunings A.M. *Xanthomonas citri*: breaking the surface / A. M. Brunings, D. W. Gabriel // *Mol. Plant Pathol.* – 2003. – V. 4, №3. – P. 141–157.
50. Brutus A. A domain swap approach reveals a role of the plant wall-associated kinase 1 (WAK1) as a receptor of oligogalacturonides / A. Brutus, F. Sicilia, A. Macone, F. Cervone, G. De Lorenzo // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2010. – V. 107, №20. – P. 9452–9457.
51. Burkinshaw B.J. Assembly and structure of the T3SS / B. J. Burkinshaw, N. C. J. Strynadka // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2014. – V. 1843, №8. – P. 1649–1663.
52. Bush G.L. The refolding activity of the yeast heat shock proteins Ssa1 and Ssa2 defines their role in protein translocation / G. L. Bush, D. I. Meyer // *J. Cell Biol.* – 1996. – V. 135, №5. – P. 1229–1237.
53. Byth-Illing H.-A. Heat shock, with recovery, promotes protection of *Nicotiana tabacum* during subsequent exposure to *Ralstonia solanacearum* / H.-A. Byth-Illing, L. Bornman // *Cell Stress Chaperones.* – 2014. – V. 19, №2. – P. 193–203.
54. Catlett M.G. Sgt1p is a unique co-chaperone that acts as a client adaptor to link Hsp90 to Skp1p / M. G. Catlett, K. B. Kaplan // *J. Biol. Chem.* – 2006. – V. 281, №44. – P. 33739–33748.
55. Challa S. Going up in flames: necrotic cell injury and inflammatory diseases / S. Challa, F. K.-M. Chan // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2010. – V. 67, №19. – P. 3241–3253.
56. Chalupowicz L. Sequential expression of bacterial virulence and plant defense genes during infection of tomato with *Clavibacter michiganensis*

- subsp. *michiganensis* / L. Chalupowicz, M. Cohen-Kandli, O. Dror, R. Eichenlaub, K.-H. Gartemann, G. Sessa, I. Barash, S. Manulis-Sasson // *Phytopathology*. – 2010. – V. 100, №3. – P. 252–261.
57. Chalupowicz L. Colonization and movement of GFP-labeled *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* during tomato infection / L. Chalupowicz, E.-M. Zellermann, M. Fluegel, O. Dror, R. Eichenlaub, K.-H. Gartemann, A. Savidor, G. Sessa, N. Iraki, I. Barash, S. Manulis-Sasson // *Phytopathology*. – 2012. – V. 102, №1. – P. 23–31.
58. Chamnongpol S. Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by H₂O₂ in transgenic tobacco / S. Chamnongpol, H. Willekens, W. Moeder, C. Langebartels, H. Sandermann, M. Van Montagu, D. Inzé, W. Van Camp // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1998. – V. 95, №10. – P. 5818–5823.
59. Chanda B. Glycerol-3-phosphate is a critical mobile inducer of systemic immunity in plants / B. Chanda, Y. Xia, M. K. Mandal, K. Yu, K.-T. Sekine, Q. Gao, D. Selote, Y. Hu, A. Stromberg, D. Navarre, A. Kachroo, P. Kachroo // *Nat. Genet.* – 2011. – V. 43, №5. – P. 421–427.
60. Chatterjee S. Structure and biophysics of type III secretion in bacteria / S. Chatterjee, S. Chaudhury, A. C. McShan, K. Kaur, R. N. De Guzman // *Biochemistry (Mosc.)*. – 2013. – V. 52, №15. – P. 2508–2517.
61. Chaturvedi R. Plastid omega3-fatty acid desaturase-dependent accumulation of a systemic acquired resistance inducing activity in petiole exudates of *Arabidopsis thaliana* is independent of jasmonic acid / R. Chaturvedi, K. Krothapalli, R. Makandar, A. Nandi, A. A. Sparks, M. R. Roth, R. Welti, J. Shah // *Plant J. Cell Mol. Biol.* – 2008. – V. 54, №1. – P. 106–117.
62. Che F.-S. Biochemical and Morphological Features of Rice Cell Death Induced by *Pseudomonas avenae* / F.-S. Che, M. Iwano, N. Tanaka, S. Takayama, E. Minami, N. Shibuya, I. Kadota, A. Isogai // *Plant Cell Physiol.* – 1999. – V. 40, №10. – P. 1036–1045.

63. Cheng Y.T. Stability of plant immune-receptor resistance proteins is controlled by SKP1-CULLIN1-F-box (SCF)-mediated protein degradation / Y. T. Cheng, Y. Li, S. Huang, Y. Huang, X. Dong, Y. Zhang, X. Li // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2011. – V. 108, №35. – P. 14694–14699.
64. Chichkova N.V. Phytaspase, a relocatable cell death promoting plant protease with caspase specificity / N. V. Chichkova, J. Shaw, R. A. Galiullina, G. E. Drury, A. I. Tuzhikov, S. H. Kim, M. Kalkum, T. B. Hong, E. N. Gorshkova, L. Torrance, A. B. Vartapetian, M. Taliansky // *EMBO J.* – 2010. – V. 29, №6. – P. 1149–1161.
65. Cho Y.S. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation / Y. S. Cho, S. Challa, D. Moquin, R. Genga, T. D. Ray, M. Guildford, F. K.-M. Chan // *Cell.* – 2009. – V. 137, №6. – P. 1112–1123.
66. Christensen B. The role of extracellular polysaccharides in biofilms / B. Christensen // *J. Biotechnol.* – 1989. – V. 10.. – P. 181–202.
67. Christofferson D.E. Necroptosis as an alternative form of programmed cell death / D. E. Christofferson, J. Yuan // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2010. – V. 22, №2. – P. 263–268.
68. Coffeen W.C. Purification and characterization of serine proteases that exhibit caspase-like activity and are associated with programmed cell death in *Avena sativa* / W. C. Coffeen, T. J. Wolpert // *Plant Cell.* – 2004. – V. 16, №4. – P. 857–873.
69. Collier S.M. NB-LRRs work a “bait and switch” on pathogens / S. M. Collier, P. Moffett // *Trends Plant Sci.* – 2009. – V. 14, №10. – P. 521–529.
70. Collmer A. Lifestyles of the effector rich: genome-enabled characterization of bacterial plant pathogens / A. Collmer, D. J. Schneider, M. Lindeberg // *Plant Physiol.* – 2009. – V. 150, №4. – P. 1623–1630.
71. Costerton J.W. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections / J. W. Costerton, P. S. Stewart, E. P. Greenberg // *Science.* – 1999. – V. 284, №5418. – P. 1318–1322.

72. Cronjé M.J. Salicylic acid-mediated potentiation of Hsp70 induction correlates with reduced apoptosis in tobacco protoplasts / M. J. Cronjé, I. E. Weir, L. Bornman // *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* – 2004. – V. 61, №1. – P. 76–87.
73. Dangl J.L. Plant pathogens and integrated defence responses to infection / J. L. Dangl, J. D. Jones // *Nature.* – 2001. – V. 411, №6839. – P. 826–833.
74. Danhorn T. Biofilm Formation by Plant-Associated Bacteria / T. Danhorn, C. Fuqua // *Annu. Rev. Microbiol.* – 2007. – V. 61, №1. – P. 401–422.
75. Dardick C. Plant and animal pathogen recognition receptors signal through non-RD kinases / C. Dardick, P. Ronald // *PLoS Pathog.* – 2006. – V. 2, №1. – P. e2.
76. Davey M.E. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics / M. E. Davey, G. A. O’toole // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2000. – V. 64, №4. – P. 847–867.
77. Davis M.J. *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov., subsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and bermudagrass stunting disease / M. J. Davis, A. G. Gillaspie, A. K. Vidaver, R. W. Harris // *Int. J. Syst. Bacteriol.* – 1984. – V. 34, №2. – P. 107–117.
78. Delledonne M. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance / M. Delledonne, Y. Xia, R. A. Dixon, C. Lamb // *Nature* – 1998. – V. 394, №6693. – P. 585–588.
79. Desikan R. Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on defence gene expression in *Arabidopsis* suspension cultures / R. Desikan, A. Reynolds, J. T. Hancock, S. J. Neill // *Biochem. J.* – 1998. – V. 330. – P. 115–120.
80. Doherty H.M. The wound response of tomato plants can be inhibited by aspirin and related hydroxy-benzoic acids / H. M. Doherty, R. R.

- Selvendran, D. J. Bowles // *Physiol. Mol. Plant Pathol.* – 1988. – V. 33, №3. – P. 377–384.
81. Doke N. Involvement of an O-2-Generating System in the Induction of Necrotic Lesions on Tobacco-Leaves Infected with Tobacco Mosaic-Virus / N. Doke, Y. Ohashi // *Physiol. Mol. Plant Pathol.* – 1988. – V. 32, №1. – P. 163–175.
82. Dong J. Expression profiles of the Arabidopsis WRKY gene superfamily during plant defense response / J. Dong, C. Chen, Z. Chen // *Plant Mol. Biol.* – 2003. – V. 51, №1. – P. 21–37.
83. Donlan R.M. Biofilms: microbial life on surfaces / R. M. Donlan // *Emerg. Infect. Dis.* – 2002. – V. 8, №9. – P. 881–890.
84. Dow M. The induction and modulation of plant defense responses by bacterial lipopolysaccharides / M. Dow, M.-A. Newman, E. von Roepenack // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 2000. – V. 38. – P. 241–261.
85. Dreier J. Characterization of the plasmid encoded virulence region pat-1 of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* / J. Dreier, D. Meletzus, R. Eichenlaub // *Mol. Plant-Microbe Interact.* – 1997. – V. 10, №2. – P. 195–206.
86. Duan Y.-H. Characterization of a wheat HSP70 gene and its expression in response to stripe rust infection and abiotic stresses / Y.-H. Duan, J. Guo, K. Ding, S.-J. Wang, H. Zhang, X.-W. Dai, Y.-Y. Chen, F. Govers, L.-L. Huang, Z.-S. Kang // *Mol. Biol. Rep.* – 2011. – V. 38, №1. – P. 301–307.
87. Dubreuil-Maurizi C. Role of glutathione in plant signaling under biotic stress / C. Dubreuil-Maurizi, B. Poinssot // *Plant Signal. Behav.* – 2012. – V. 7, №2. – P. 210–212.
88. Dubreuil-Maurizi C. Glutathione deficiency of the Arabidopsis mutant pad2-1 affects oxidative stress-related events, defense gene expression, and the hypersensitive response / C. Dubreuil-Maurizi, J. Vitecek, L. Marty, L. Branciard, P. Frettinger, D. Wendehenne, A. J. Meyer, F. Mauch, B. Poinssot // *Plant Physiol.* – 2011. – V. 157, №4. – P. 2000–2012.

89. Durrant W.E. Systemic acquired resistance / W. E. Durrant, X. Dong // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 2004. – V. 42. – P. 185–209.
90. Eichenlaub R. *The Clavibacter michiganensis* subspecies: molecular investigation of gram-positive bacterial plant pathogens / R. Eichenlaub, K.-H. Gartemann // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 2011. – V. 49. – P. 445–464.
91. Eichmann R. The endoplasmic reticulum in plant immunity and cell death / R. Eichmann, P. Schäfer // *Front. Plant Sci.* – 2012. – V. 3. – P. 200.
92. Eitas T.K. NB-LRR proteins: pairs, pieces, perception, partners, and pathways / T. K. Eitas, J. L. Dangl // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2010. – V. 13, №4. – P. 472–477.
93. Fink S.L. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells / S. L. Fink, B. T. Cookson // *Infect. Immun.* – 2005. – V. 73, №4. – P. 1907–1916.
94. Fink S.L. Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages / S. L. Fink, B. T. Cookson // *Cell. Microbiol.* – 2006. – V. 8, №11. – P. 1812–1825.
95. Flügel M. Analysis of the interaction of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* with its host plant tomato by genome-wide expression profiling / M. Flügel, A. Becker, K.-H. Gartemann, R. Eichenlaub // *J. Biotechnol.* – 2012. – V. 160, №1-2. – P. 42–54.
96. Fonseca S. (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate / S. Fonseca, A. Chini, M. Hamberg, B. Adie, A. Porzel, R. Kramell, O. Miersch, C. Wasternack, R. Solano // *Nat. Chem. Biol.* – 2009. – V. 5, №5. – P. 344–350.
97. Forrest R.S. Substrate degradation patterns of polygalacturonic acid lyase from *Erwinia carotovora* and *Bacillus polymyxa* and release of phytoalexin-eliciting oligosaccharides from potato cell walls / R. S. Forrest, G. D. Lyon // *J. Exp. Bot.* – 1990. – V. 41, №4. – P. 481–488.
98. Fradin E.F. Genetic dissection of *Verticillium* wilt resistance mediated by tomato Ve1 / E. F. Fradin, Z. Zhang, J. C. Juarez Ayala, C. D. M.

- Castroverde, R. N. Nazar, J. Robb, C.-M. Liu, B. P. H. J. Thomma // *Plant Physiol.* – 2009. – V. 150, №1. – P. 320–332.
99. Fraiture M. Killing two birds with one stone: trans-kingdom suppression of PAMP/MAMP-induced immunity by T3E from enteropathogenic bacteria / M. Fraiture, F. Brunner // *Front. Microbiol.* – 2014. – V. 5. – P. 320.
100. Fu Z.Q. NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants / Z. Q. Fu, S. Yan, A. Saleh, W. Wang, J. Ruble, N. Oka, R. Mohan, S. H. Spoel, Y. Tada, N. Zheng, X. Dong // *Nature* – 2012. – V. 486, №7402. – P. 228–232.
101. Galluzzi L. To die or not to die: that is the autophagic question / L. Galluzzi, J. M. Vicencio, O. Kepp, E. Tasdemir, M. C. Maiuri, G. Kroemer // *Curr. Mol. Med.* – 2008. – V. 8, №2. – P. 78–91.
102. Gartemann K.H. Isolation and characterization of IS1409, an insertion element of 4-chlorobenzoate-degrading *Arthrobacter* sp. strain TM1, and development of a system for transposon mutagenesis / K. H. Gartemann, R. Eichenlaub // *J. Bacteriol.* – 2001. – V. 183, №12. – P. 3729–3736.
103. Gilmore A.P. Anoikis / A. P. Gilmore // *Cell Death Differ.* – 2005. – V. 12. – P. 1473–1477.
104. Gonzalez A.J. *Clavibacter michiganensis* subsp. *phaseoli* subsp. nov., pathogenic in bean / A. J. Gonzalez, E. Trapiello // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2014. – V. 64, №5. – P. 1752–1755.
105. Grant M. The RPM1 plant disease resistance gene facilitates a rapid and sustained increase in cytosolic calcium that is necessary for the oxidative burst and hypersensitive cell death / M. Grant, I. Brown, S. Adams, M. Knight, A. Ainslie, J. Mansfield // *Plant J. Cell Mol. Biol.* – 2000. – V. 23, №4. – P. 441–450.
106. Grün S. Nitric oxide and gene regulation in plants / S. Grün, C. Lindermayr, S. Sell, J. Durner // *J. Exp. Bot.* – 2006. – V. 57, №3. – P. 507–516.
107. Gutierrez J.R. Prf immune complexes of tomato are oligomeric and contain multiple Pto-like kinases that diversify effector recognition / J. R. Gutierrez,

- A. L. Balmuth, V. Ntoukakis, T. S. Mucyn, S. Gimenez-Ibanez, A. M. E. Jones, J. P. Rathjen // *Plant J. Cell Mol. Biol.* – 2010. – V. 61, №3. – P. 507–518.
108. Hara-Nishimura I. The role of vacuole in plant cell death / I. Hara-Nishimura, N. Hatsugai // *Cell Death Differ.* – 2011. – V. 18, №8. – P. 1298–1304.
109. Hatsugai N. Two vacuole-mediated defense strategies in plants / N. Hatsugai, I. Hara-Nishimura // *Plant Signal. Behav.* – 2010. – V. 5, №12. – P. 1568–1570.
110. Hatsugai N. A novel membrane fusion-mediated plant immunity against bacterial pathogens / N. Hatsugai, S. Iwasaki, K. Tamura, M. Kondo, K. Fuji, K. Ogasawara, M. Nishimura, I. Hara-Nishimura // *Genes Dev.* – 2009. – V. 23, №21. – P. 2496–2506.
111. Hatsugai N. A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death / N. Hatsugai, M. Kuroyanagi, K. Yamada, T. Meshi, S. Tsuda, M. Kondo, M. Nishimura, I. Hara-Nishimura // *Science.* – 2004. – V. 305, №5685. – P. 855–858.
112. Hayafune M. Chitin-induced activation of immune signaling by the rice receptor CEBiP relies on a unique sandwich-type dimerization / M. Hayafune, R. Berisio, R. Marchetti, A. Silipo, M. Kayama, Y. Desaki, S. Arima, F. Squeglia, A. Ruggiero, K. Tokuyasu, A. Molinaro, H. Kaku, N. Shibuya // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2014. – V. 111, №3. – P. E404–413.
113. Heath M.C. Hypersensitive response-related death / M. C. Heath // *Plant Mol. Biol.* – 2000. – V. 44, №3. – P. 321–334.
114. Hemetsberger C. The *Ustilago maydis* effector pep1 suppresses plant immunity by inhibition of host peroxidase activity / C. Hemetsberger, C. Herrberger, B. Zechmann, M. Hillmer, G. Doehlemann // *PLoS Pathog.* – 2012. – V. 8, №5. – P. e1002684.

115. Hengartner M.O. The biochemistry of apoptosis / M. O. Hengartner // Nature. – 2000. – V. 407, №6805. – P. 770–776.
116. Hoeberichts F.A. A tomato metacaspase gene is upregulated during programmed cell death in *Botrytis cinerea*-infected leaves / F. A. Hoeberichts, A. ten Have, E. J. Woltering // Planta – 2003. – V. 217, №3. – P. 517–522.
117. Holtsmark I. Expression of putative virulence factors in the potato pathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* during infection / I. Holtsmark, G. W. Takle, M. B. Brurberg // Arch. Microbiol. – 2008. – V. 189, №2. – P. 131–139.
118. Hong S.W. Hsp101 is necessary for heat tolerance but dispensable for development and germination in the absence of stress / S. W. Hong, E. Vierling // Plant J. Cell Mol. Biol. – 2001. – V. 27, №1. – P. 25–35.
119. Hoorn R.A.L. van der From Guard to Decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors / R. A. L. van der Hoorn, S. Kamoun // Plant Cell. – 2008. – V. 20, №8. – P. 2009–2017.
120. Hwang J.R. C-terminus of heat shock protein 70-interacting protein facilitates degradation of apoptosis signal-regulating kinase 1 and inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1-dependent apoptosis / J. R. Hwang, C. Zhang, C. Patterson // Cell Stress Chaperones. – 2005. – V. 10, №2. – P. 147–156.
121. Ishihama N. Post-translational regulation of WRKY transcription factors in plant immunity / N. Ishihama, H. Yoshioka // Curr. Opin. Plant Biol. – 2012. – V. 15, №4. – P. 431–437.
122. Jahr H. The endo-beta-1,4-glucanase CelA of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* is a pathogenicity determinant required for induction of bacterial wilt of tomato / H. Jahr, J. Dreier, D. Meletzus, R. Bahro, R. Eichenlaub // Mol. Plant-Microbe Interact. – 2000. – V. 13, №7. – P. 703–714.

123. Jalloul A. Lipid peroxidation in cotton: *Xanthomonas* interactions and the role of lipoxygenases during the hypersensitive reaction / A. Jalloul, J. L. Montillet, K. Assigbetsé, J. P. Agnel, E. Delannoy, C. Triantaphylidès, J. F. Daniel, P. Marmey, J. P. Geiger, M. Nicole // *Plant J. Cell Mol. Biol.* – 2002. – V. 32, №1. – P. 1–12.
124. Janeway C.A. Autoimmune disease: immunotherapy by peptides? / C. A. Janeway // *Nature.* – 1989. – V. 341, №6242. – P. 482–483.
125. Jaskiewicz M. Chromatin modification acts as a memory for systemic acquired resistance in the plant stress response / M. Jaskiewicz, U. Conrath, C. Peterhänsel // *EMBO Rep.* – 2011. – V. 12, №1. – P. 50–55.
126. Jones J.D.G. The plant immune system / J. D. G. Jones, J. L. Dangl // *Nature.* – 2006. – V. 444, №7117. – P. 323–329.
127. Jung H.W. Priming in systemic plant immunity / H. W. Jung, T. J. Tschaplinski, L. Wang, J. Glazebrook, J. T. Greenberg // *Science.* – 2009. – V. 324, №5923. – P. 89–91.
128. Jung K.-H. Genome-wide expression analysis of HSP70 family genes in rice and identification of a cytosolic HSP70 gene highly induced under heat stress / K.-H. Jung, H.-J. Gho, M. X. Nguyen, S.-R. Kim, G. An // *Funct. Integr. Genomics.* – 2013. – V. 13, №3. – P. 391–402.
129. Kadota Y. NLR sensors meet at the SGT1-HSP90 crossroad / Y. Kadota, K. Shirasu, R. Guerois // *Trends Biochem. Sci.* – 2010. – V. 35, №4. – P. 199–207.
130. Kasparovsky T. Ergosterol elicits oxidative burst in tobacco cells via phospholipase A2 and protein kinase C signal pathway / T. Kasparovsky, J.-P. Blein, V. Mikes // *Plant Physiol. Biochem.* – 2004. – V. 42, №5. – P. 429–435.
131. Katagiri F. Understanding the plant immune system / F. Katagiri, K. Tsuda // *Mol. Plant-Microbe Interact.* – 2010. – V. 23, №12. – P. 1531–1536.

132. Kawai T. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors / T. Kawai, S. Akira // *Nat. Immunol.* – 2010. – V. 11, №5. – P. 373–384.
133. Kawano Y. The function of rac small gtpase and associated proteins in rice innate immunity / Y. Kawano, L. Chen, K. Shimamoto // *Rice.* – 2010. – V. 3, №2-3. – P. 112–121.
134. Kepp O. Pyroptosis - a cell death modality of its kind? / O. Kepp, L. Galluzzi, L. Zitvogel, G. Kroemer // *Eur. J. Immunol.* – 2010. – V. 40, №3. – P. 627–630.
135. Kerr J.F. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics / J. F. Kerr, A. H. Wyllie, A. R. Currie // *Br. J. Cancer.* – 1972. – V. 26, №4. – P. 239–257.
136. Kiba A. Comparative analysis of induction pattern of programmed cell death and defense-related responses during hypersensitive cell death and development of bacterial necrotic leaf spots in eggplant / A. Kiba, O. Takata, K. Ohnishi, Y. Hikichi // *Planta.* – 2006. – V. 224, №5. – P. 981–994.
137. Knight V.I. Hydroperoxides of fatty acids induce programmed cell death in tomato protoplasts / V. I. Knight, H. Wang, J. E. Lincoln, E. C. Lulai, D. G. Gilchrist, R. M. Bostock // *Physiol. Mol. Plant Pathol.* – 2001. – V. 59, №6. – P. 277–286.
138. Koczan J.M. Cell surface attachment structures contribute to biofilm formation and xylem colonization by *Erwinia amylovora* / J. M. Koczan, B. R. Lenneman, M. J. McGrath, G. W. Sundin // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2011. – V. 77, №19. – P. 7031–7039.
139. Koczan J.M. Contribution of *Erwinia amylovora* exopolysaccharides amylovoran and levan to biofilm formation: implications in pathogenicity / J. M. Koczan, M. J. McGrath, Y. Zhao, G. W. Sundin // *Phytopathology.* – 2009. – V. 99, №11. – P. 1237–1244.
140. Kopp E. Recognition of microbial infection by Toll-like receptors / E. Kopp, R. Medzhitov // *Curr. Opin. Immunol.* – 2003. – V. 15, №4. – P. 396–401.

141. Krause M. Harpin inactivates mitochondria in Arabidopsis suspension cells / M. Krause, J. Durner // *Mol. Plant-Microbe Interact.* – 2004. – V. 17, №2. – P. 131–139.
142. Kroemer G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009 / G. Kroemer, L. Galluzzi, P. Vandenabeele, J. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, W. S. El-Deiry, P. Golstein, D. R. Green, M. Hengartner, R. A. Knight, S. Kumar, S. A. Lipton, W. Malorni, G. Nuñez, M. E. Peter, J. Tschopp, J. Yuan, M. Piacentini, B. Zhivotovsky, G. Melino, Nomenclature Committee on Cell Death 2009 // *Cell Death Differ.* – 2009. – V. 16, №1. – P. 3–11.
143. Kroemer G. Caspase-independent cell death / G. Kroemer, S. J. Martin // *Nat. Med.* – 2005. – V. 11, №7. – P. 725–730.
144. Kulye M. Hrip1, a novel protein elicitor from necrotrophic fungus, *Alternaria tenuissima*, elicits cell death, expression of defence-related genes and systemic acquired resistance in tobacco / M. Kulye, H. Liu, Y. Zhang, H. Zeng, X. Yang, D. Qiu // *Plant Cell Environ.* – 2012. – V. 35, №12. – P. 2104–2120.
145. Kunze G. The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in Arabidopsis plants / G. Kunze, C. Zipfel, S. Robatzek, K. Niehaus, T. Boller, G. Felix // *Plant Cell.* – 2004. – V. 16, №12. – P. 3496–3507.
146. Lacomme C. Bax-induced cell death in tobacco is similar to the hypersensitive response / C. Lacomme, S. S. Cruz // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1999. – V. 96, №14. – P. 7956–7961.
147. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // *Nature.* – 1970. – V. 227, №5259. – P. 680–685.
148. Laine M.J. The cellulase encoded by the native plasmid of *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus* plays a role in virulence and contains an

- expansin-like domain / M. J. Laine, M. Haapalainen, T. Wahlroos, K. Kankare, R. Nissinen, S. Kassuwi, M. C. Metzler // *Physiol. Mol. Plant Pathol.* – 2000. – V. 57, №5. – P. 221–233.
149. Lamb C. The oxidative burst in plant disease resistance / C. Lamb, R. A. Dixon // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* – 1997. – V. 48. – P. 251–275.
150. Lecourieux D. Calcium in plant defence-signalling pathways / D. Lecourieux, R. Ranjeva, A. Pugin // *New Phytol.* – 2006. – V. 171, №2. – P. 249–269.
151. Lee A.H.-Y. Phytopathogen type III effectors as probes of biological systems / A. H.-Y. Lee, M. A. Middleton, D. S. Guttman, D. Desveaux // *Microb. Biotechnol.* – 2013. – V. 6, №3. – P. 230–240.
152. Lee S.-W. A type I-secreted, sulfated peptide triggers XA21-mediated innate immunity / S.-W. Lee, S.-W. Han, M. Sririyanum, C.-J. Park, Y.-S. Seo, P. C. Ronald // *Science.* – 2009. – V. 326, №5954. – P. 850–853.
153. Lee U. The Arabidopsis ClpB/Hsp100 family of proteins: chaperones for stress and chloroplast development / U. Lee, I. Rioflorido, S.-W. Hong, J. Larkindale, E. R. Waters, E. Vierling // *Plant J. Cell Mol. Biol.* – 2007. – V. 49, №1. – P. 115–127.
154. Levine A. Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response / A. Levine, R. I. Pennell, M. E. Alvarez, R. Palmer, C. Lamb // *Curr. Biol.* – 1996. – V. 6, №4. – P. 427–437.
155. Levine A. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response / A. Levine, R. Tenhaken, R. Dixon, C. Lamb // *Cell.* – 1994. – V. 79, №4. – P. 583–593.
156. Levine B. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy / B. Levine, D. J. Klionsky // *Dev. Cell.* – 2004. – V. 6, №4. – P. 463–477.
157. Liebrand T.W.H. Chaperones of the endoplasmic reticulum are required for Ve1-mediated resistance to *Verticillium* / T. W. H. Liebrand, A. Kombrink,

- Z. Zhang, J. Sklenar, A. M. E. Jones, S. Robatzek, B. P. H. J. Thomma, M. H. A. J. Joosten // *Mol. Plant Pathol.* – 2014. – V. 15, №1. – P. 109–117.
158. Lippens S. Death penalty for keratinocytes: apoptosis versus cornification / S. Lippens, G. Denecker, P. Ovaere, P. Vandenabeele, W. Declercq // *Cell Death Differ.* – 2005. – V. 12. – P. 1497–1508.
159. Liu B. Lysin motif-containing proteins LYP4 and LYP6 play dual roles in peptidoglycan and chitin perception in rice innate immunity / B. Liu, J.-F. Li, Y. Ao, J. Qu, Z. Li, J. Su, Y. Zhang, J. Liu, D. Feng, K. Qi, Y. He, J. Wang, H.-B. Wang // *Plant Cell.* – 2012. – V. 24, №8. – P. 3406–3419.
160. Liu J.-X. Endoplasmic reticulum protein quality control and its relationship to environmental stress responses in plants / J.-X. Liu, S. H. Howell // *Plant Cell Online.* – 2010. – V. 22, №9. – P. 2930–2942.
161. Liu Y. Genome-wide identification and analysis of heat shock protein 90 in tomato / Y. Liu, H. Wan, Y. Yang, Y. Wei, Z. Li, Q. Ye, R. Wang, M. Ruan, Z. Yao, G. Zhou // *Yi Chuan.* – 2014. – V. 36, №10. – P. 1043–1052.
162. Lohar D.P. A transient decrease in reactive oxygen species in roots leads to root hair deformation in the legume-rhizobia symbiosis / D. P. Lohar, S. Haridas, J. S. Gantt, K. A. VandenBosch // *New Phytol.* – 2007. – V. 173, №1. – P. 39–49.
163. Lohou D. Type III chaperones & Co in bacterial plant pathogens: a set of specialized bodyguards mediating effector delivery / D. Lohou, F. Lonjon, S. Genin, F. Vaillau // *Front. Plant Sci.* – 2013. – V. 4. – P. 435.
164. Lotze M.T. The grateful dead: damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity / M. T. Lotze, H. J. Zeh, A. Rubartelli, L. J. Sparvero, A. A. Amoscato, N. R. Washburn, M. E. Devera, X. Liang, M. Tör, T. Billiar // *Immunol. Rev.* – 2007. – V. 220. – P. 60–81.
165. Low P.S. The oxidative burst in plant defense: Function and signal transduction / P. S. Low, J. R. Merida // *Physiol. Plant.* – 1996. – V. 96, №3. – P. 533–542.

166. Lowry O.H. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall // J. Biol. Chem. – 1951. – V. 193, №1. – P. 265–275.
167. Lukasik E. STANDING strong, resistance proteins instigators of plant defence / E. Lukasik, F. L. W. Takken // Curr. Opin. Plant Biol. – 2009. – V. 12, №4. – P. 427–436.
168. Luna E. Next-generation systemic acquired resistance / E. Luna, T. J. A. Bruce, M. R. Roberts, V. Flors, J. Ton // Plant Physiol. – 2012. – V. 158, №2. – P. 844–853.
169. Maimbo M. Induction of a small heat shock protein and its functional roles in Nicotiana plants in the defense response against *Ralstonia solanacearum* / M. Maimbo, K. Ohnishi, Y. Hikichi, H. Yoshioka, A. Kiba // Plant Physiol. – 2007. – V. 145, №4. – P. 1588–1599.
170. Maximova L.A. Agrobacterium-mediated transformation of Nicotiana tabacum by disarmed strain At 699 resulted in considerable raising of growth and development of transgenic plants / L.A. Maximova, J.V. Nurminskaya, T.V. Kopytina, A.G. Enikeev // Journal of Stress Physiol. and Biochem. – 2012. – V. 8, №1. – P. 138–148.
171. Malamud F. The *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* flagellum is required for mature biofilm and canker development / F. Malamud, P. S. Torres, R. Roeschlin, L. A. Rigano, R. Enrique, H. R. Bonomi, A. P. Castagnaro, M. R. Marano, A. A. Vojnov // Microbiology. – 2011. – V. 157, №3. – P. 819–829.
172. Mansfield J. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology / J. Mansfield, S. Genin, S. Magori, V. Citovsky, M. Sriariyanum, P. Ronald, M. Dow, V. Verdier, S. V. Beer, M. A. Machado, I. Toth, G. Salmond, G. D. Foster // Mol. Plant Pathol. – 2012. – V. 13, №6. – P. 614–629.
173. Manzer F.E. Factors affecting infection, disease development, and symptom expression of bacterial ring rot / F. E. Manzer, N. C. Gudmestad, G. A. Nelson // Am. Potato J. – 1987. – V. 64, №12. – P. 671–676.

174. Marques L.L.R. Evaluation of biofilms formed by *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* / L. L. R. Marques, S. H. De Boer, H. Ceri, M. E. Olson // *Phytopathology*. – 2003. – V. 93. – P. S57.
175. Mayer M.P. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism / M. P. Mayer, B. Bukau // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2005. – V. 62, №6. – P. 670–684.
176. McCulloch L. *Aplanobacter insidiosum* n. sp., the cause of an alfalfa disease / L. McCulloch // *Phytopathology*. – 1925. – V. 15. – P. 496–497.
177. Meletzus D. Evidence for plasmid-encoded virulence factors in the phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382 / D. Meletzus, A. Bermphol, J. Dreier, R. Eichenlaub // *J. Bacteriol.* – 1993. – V. 175, №7. – P. 2131–2136.
178. Meletzus D. Transformation of the phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* by electroporation and development of a cloning vector / D. Meletzus, R. Eichenlaub // *J. Bacteriol.* – 1991. – V. 173, №1. – P. 184–190.
179. Miller G. Reactive oxygen signaling and abiotic stress / G. Miller, V. Shulaev, R. Mittler // *Physiol. Plant.* – 2008. – V. 133, №3. – P. 481–489.
180. Mittler R. Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hyperresponsive to pathogen infection / R. Mittler, E. H. Herr, B. L. Orvar, W. van Camp, H. Willekens, D. Inzé, B. E. Ellis // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1999. – V. 96, №24. – P. 14165–14170.
181. Mittler R. Identification, characterization, and purification of a tobacco endonuclease activity induced upon hypersensitive response cell death / R. Mittler, E. Lam // *Plant Cell*. – 1995. – V. 7, №11. – P. 1951–1962.
182. Mittler R. Characterization of nuclease activities and DNA fragmentation induced upon hypersensitive response cell death and mechanical stress / R. Mittler, E. Lam // *Plant Mol. Biol.* – 1997. – V. 34, №2. – P. 209–221.
183. Miya A. CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis* / A. Miya, P. Albert, T. Shinya, Y. Desaki, K.

- Ichimura, K. Shirasu, Y. Narusaka, N. Kawakami, H. Kaku, N. Shibuya // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2007. – V. 104, №49. – P. 19613–19618.
184. Mogen B.D. Distribution and partial characterization of pCS1, a highly conserved plasmid present in *Clavibacter michiganense subsp. sepedonicum* / B. D. Mogen, A. E. Oleson, R. B. Sparks, N. C. Gudmestad, G. A. Secor // Phytopathol. USA. – 1988.
185. Monack D.M. Salmonella-induced macrophage death: the role of caspase-1 in death and inflammation / D. M. Monack, W. W. Navarre, S. Falkow // Microbes Infect. Inst. Pasteur. – 2001. – V. 3, №14-15. – P. 1201–1212.
186. Monteiro-Vitorello C.B. The genome sequence of the gram-positive sugarcane pathogen *Leifsonia xyli subsp. xyli* / C. B. Monteiro-Vitorello, L. E. A. Camargo, M. A. Van Sluys, J. P. Kitajima, D. Truffi, D. Wood, C. L. Marino, C. F. Menck // Mol. Plant-Microbe Interact. – 2004. – V. 17, №8. – P. 827–836.
187. Montillet J.-L. The upstream oxylipin profile of *Arabidopsis thaliana*: a tool to scan for oxidative stresses / J.-L. Montillet, J.-L. Cacas, L. Garnier, M.-H. Montané, T. Douki, J.-J. Bessoule, L. Polkowska-Kowalczyk, U. Maciejewska, J.-P. Agnel, A. Vial, C. Triantaphylidès // Plant J. Cell Mol. Biol. – 2004. – V. 40, №3. – P. 439–451.
188. Montillet J.-L. Fatty acid hydroperoxides and H₂O₂ in the execution of hypersensitive cell death in tobacco leaves / J.-L. Montillet, S. Chamnongpol, C. Rustérucci, J. Dat, B. van de Cotte, J.-P. Agnel, C. Battesti, D. Inzé, F. Van Breusegem, C. Triantaphylidès // Plant Physiol. – 2005. – V. 138, №3. – P. 1516–1526.
189. Moore J.W. Transcription dynamics in plant immunity / J. W. Moore, G. J. Loake, S. H. Spoel // Plant Cell. – 2011. – V. 23, №8. – P. 2809–2820.
190. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // Physiol. Plant. – 1962. – V. 15, №3. – P. 473–497.

191. Mur L.A.J. The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death / L. A. J. Mur, P. Kenton, R. Atzorn, O. Miersch, C. Wasternack // *Plant Physiol.* – 2006. – V. 140, №1. – P. 249–262.
192. Mur L.A.J. The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? / L. A. J. Mur, P. Kenton, A. J. Lloyd, H. Ougham, E. Prats // *J. Exp. Bot.* – 2008. – V. 59, №3. – P. 501–520.
193. Nanda A.K. Reactive oxygen species during plant-microorganism early interactions / A. K. Nanda, E. Andrio, D. Marino, N. Pauly, C. Dunand // *J. Integr. Plant Biol.* – 2010. – V. 52, №2. – P. 195–204.
194. Naton B. Correlation of rapid cell death with metabolic changes in fungus-infected, cultured parsley cells / B. Naton, K. Hahlbrock, E. Schmelzer // *Plant Physiol.* – 1996. – V. 112, №1. – P. 433–444.
195. Navarro L. The transcriptional innate immune response to flg22. Interplay and overlap with Avr gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis / L. Navarro, C. Zipfel, O. Rowland, I. Keller, S. Robatzek, T. Boller, J. D. G. Jones // *Plant Physiol.* – 2004. – V. 135, №2. – P. 1113–1128.
196. Nelson G.A. *Corynebacterium sepedonicum* in potato: Effect of inoculum concentration on ring rot symptoms and latent infection / G. A. Nelson // *Can. J. Plant Pathol.* – 1982. – V. 4, №2. – P. 129–133.
197. Neu T.R. Microflora on explanted silicone rubber voice prostheses: taxonomy, hydrophobicity and electrophoretic mobility / T. R. Neu, G. J. Verkerke, I. F. Herrmann, H. K. Schutte, H. C. Van der Mei, H. J. Busscher // *J. Appl. Bacteriol.* – 1994. – V. 76, №5. – P. 521–528.
198. Nicaise V. Recent advances in PAMP-triggered immunity against bacteria: pattern recognition receptors watch over and raise the alarm / V. Nicaise, M. Roux, C. Zipfel // *Plant Physiol.* – 2009. – V. 150, №4. – P. 1638–1647.

199. Nicotera P. Regulation of the apoptosis-necrosis switch / P. Nicotera, G. Melino // *Oncogene*. – 2004. – V. 23, №16. – P. 2757–2765.
200. Nissinen R. In planta - complementation of *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus* strains deficient in cellulase production or hr induction restores virulence / R. Nissinen, S. Kassuwi, R. Peltola, M. C. Metzler // *Eur. J. Plant Pathol.* – 2001. – V. 107, №2. – P. 175–182.
201. Nissinen R. *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus* elicits a hypersensitive response in tobacco and secretes hypersensitive response-inducing protein(s) / R. Nissinen, F. M. Lai, M. J. Laine, P. J. Bauer, A. A. Reilley, X. Li, S. H. De Boer, C. A. Ishimaru, M. C. Metzler // *Phytopathology* – 1997. – V. 87, №7. – P. 678–684.
202. Nissinen R. The putative secreted serine protease chp-7 is required for full virulence and induction of a nonhost hypersensitive response by *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus* / R. Nissinen, Y. Xia, L. Mattinen, C. A. Ishimaru, D. L. Knudson, S. E. Knudson, M. Metzler, M. Pirhonen // *Mol. Plant. Microbe Interact.* – 2009. – V. 22, №7. – P. 809–819.
203. Nover L. The heat shock response of eukaryotic cells / L. Nover, D. Hellmund, B. Neumann, K.-D. Scharf, E. Serfling // *Biol Zbl* – 1984. – V. 103. – P. 357–435.
204. Orrenius S. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link / S. Orrenius, B. Zhivotovsky, P. Nicotera // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2003. – V. 4, №7. – P. 552–565.
205. Pajerowska-Mukhtar K.M. Tell me more: roles of NPRs in plant immunity / K. M. Pajerowska-Mukhtar, D. K. Emerine, M. S. Mukhtar // *Trends Plant Sci.* – 2013. – V. 18, №7. – P. 402–411.
206. Pandey S.P. The role of WRKY transcription factors in plant immunity / S. P. Pandey, I. E. Somssich // *Plant Physiol.* – 2009. – V. 150, №4. – P. 1648–1655.

207. Park S.-W. Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance / S.-W. Park, E. Kaimoyo, D. Kumar, S. Mosher, D. F. Klessig // *Science*. – 2007. – V. 318, №5847. – P. 113–116.
208. Patel S. Autophagy in the control of programmed cell death / S. Patel, J. Caplan, S. P. Dinesh-Kumar // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2006. – V. 9, №4. – P. 391–396.
209. Petre B. How do filamentous pathogens deliver effector proteins into plant cells? / B. Petre, S. Kamoun // *PLoS Biol.* – 2014. – V. 12, №2. – P. e1001801.
210. Pieterse C.M.J. Hormonal modulation of plant immunity / C. M. J. Pieterse, D. Van der Does, C. Zamioudis, A. Leon-Reyes, S. C. M. Van Wees // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* – 2012. – V. 28. – P. 489–521.
211. de Pinto M.C. Changes in the antioxidant systems as part of the signaling pathway responsible for the programmed cell death activated by nitric oxide and reactive oxygen species in tobacco Bright-Yellow 2 cells / M. C. de Pinto, F. Tommasi, L. De Gara // *Plant Physiol.* – 2002. – V. 130, №2. – P. 698–708.
212. Pozo O. del MAPKKKalpha is a positive regulator of cell death associated with both plant immunity and disease / O. del Pozo, K. F. Pedley, G. B. Martin // *EMBO J.* – 2004. – V. 23, №15. – P. 3072–3082.
213. Pratt L.A. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili / L. A. Pratt, R. Kolter // *Mol. Microbiol.* – 1998. – V. 30, №2. – P. 285–293.
214. Pratt W.B. Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery / W. B. Pratt, D. O. Toft // *Exp. Biol. Med.* Maywood NJ – 2003. – V. 228, №2. – P. 111–133.
215. Rafiqi M. Internalization of flax rust avirulence proteins into flax and tobacco cells can occur in the absence of the pathogen / M. Rafiqi, P. H. P. Gan, M. Ravensdale, G. J. Lawrence, J. G. Ellis, D. A. Jones, A. R. Hardham, P. N. Dodds // *Plant Cell* – 2010. – V. 22, №6. – P. 2017–2032.

216. Rajamuthiah R. Effector triggered immunity / R. Rajamuthiah, E. Mylonakis // *Virulence* – 2014. – V. 5, №7. – P. 697–702.
217. Rancé I. The incompatible interaction between *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* race 0 and tobacco is suppressed in transgenic plants expressing antisense lipoxygenase sequences / I. Rancé, J. Fournier, M. T. Esquerré-Tugayé // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1998. – V. 95, №11. – P. 6554–6559.
218. Ren D. A fungal-responsive MAPK cascade regulates phytoalexin biosynthesis in Arabidopsis / D. Ren, Y. Liu, K.-Y. Yang, L. Han, G. Mao, J. Glazebrook, S. Zhang // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2008. – V. 105, №14. – P. 5638–5643.
219. Rice K.C. Death's toolbox: examining the molecular components of bacterial programmed cell death / K. C. Rice, K. W. Bayles // *Mol. Microbiol.* – 2003. – V. 50, №3. – P. 729–738.
220. Rikhvanov E.G. Nuclear–mitochondrial cross-talk during heat shock in Arabidopsis cell culture / E. G. Rikhvanov, K. Z. Gamburg, N. N. Varakina, T. M. Rusaleva, I. V. Fedoseeva, E. L. Tauson, I. V. Stupnikova, A. V. Stepanov, G. B. Borovskii, V. K. Voinikov // *Plant J.* – 2007. – V. 52, № 4 – P. 763–778.
221. Rinaudi L.V. An integrated view of biofilm formation in rhizobia / L. V. Rinaudi, W. Giordano // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2010. – V. 304, №1. – P. 1–11.
222. Romanenko A.S. Potato cell plasma membrane receptors to ring rot pathogen extracellular polysaccharides / A. S. Romanenko, L. A. Lomovatskaya, T. N. Shafikova, G. B. Borovskii, N. V. Krivolapova // *J. Phytopathol.* – 2003. – V. 151, №1. – P. 1–6.
223. Saijo Y. ER quality control of immune receptors and regulators in plants: ER quality control of plant immune receptors / Y. Saijo // *Cell. Microbiol.* – 2010. – V. 12, №6. – P. 716–724.

224. Sakamoto T. The tomato RLK superfamily: phylogeny and functional predictions about the role of the LRRII-RLK subfamily in antiviral defense / T. Sakamoto, M. Deguchi, O. J. B. Brustolini, A. A. Santos, F. F. Silva, E. P. B. Fontes // *BMC Plant Biol.* – 2012. – V. 12. – P. 229.
225. Sanmartín M. Caspases. Regulating death since the origin of life / M. Sanmartín, L. Jaroszewski, N. V. Raikhel, E. Rojo // *Plant Physiol.* – 2005. – V. 137, №3. – P. 841–847.
226. Savidor A. *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* Vatr1 and Vatr2 transcriptional regulators are required for virulence in tomato / A. Savidor, L. Chalupowicz, D. Teper, K.-H. Gartemann, R. Eichenlaub, S. Manulis-Sasson, I. Barash, G. Sessa // *Mol. Plant. Microbe Interact.* – 2014. – V. 27, №10. – P. 1035–1047.
227. Savidor A. The *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*-tomato interactome reveals the perception of pathogen by the host and suggests mechanisms of infection / A. Savidor, D. Teper, K.-H. Gartemann, R. Eichenlaub, L. Chalupowicz, S. Manulis-Sasson, I. Barash, H. Tews, K. Mayer, R. J. Giannone, R. L. Hettich, G. Sessa // *J. Proteome Res.* – 2012. – V. 11, №2. – P. 736–750.
228. Schembri M.A. FimH-mediated autoaggregation of *Escherichia coli* / M. A. Schembri, G. Christiansen, P. Klemm // *Mol. Microbiol.* – 2001. – V. 41, №6. – P. 1419–1430.
229. Schott A. Arabidopsis Stromal-derived Factor2 (SDF2) is a crucial target of the unfolded protein response in the endoplasmic reticulum / A. Schott, S. Ravaud, S. Keller, J. Radzimanowski, C. Viotti, S. Hillmer, I. Sinning, S. Strahl // *J. Biol. Chem.* – 2010. – V. 285, №23. – P. 18113–18121.
230. Schulze B. Rapid heteromerization and phosphorylation of ligand-activated plant transmembrane receptors and their associated kinase BAK1 / B. Schulze, T. Mentzel, A. K. Jehle, K. Mueller, S. Beeler, T. Boller, G. Felix, D. Chinchilla // *J. Biol. Chem.* – 2010. – V. 285, №13. – P. 9444–9451.

231. Setti B. Virulence strategies of phytopathogenic bacteria and their role in plant disease pathogenesis / B. Setti, M. Bencheikh, J. E. Henni // Afr. J. Microbiol. Res. – 2014. – V. 8, №30. – P. 2809–2815.
232. Shafikova T.N. Extracellular polysaccharides of potato ring rot pathogen / T. N. Shafikova, E. V. Rymareva, V. N. Kopytchuk, E. Y. Epova, A. S. Romanenko // J. Stress Physiol. Biochem. – 2006. – V. 2, №1. – P. 1–10.
233. Shan L. Bacterial effectors target the common signaling partner BAK1 to disrupt multiple MAMP receptor-signaling complexes and impede plant immunity / L. Shan, P. He, J. Li, A. Heese, S. C. Peck, T. Nürnberger, G. B. Martin, J. Sheen // Cell Host Microbe – 2008. – V. 4, №1. – P. 17–27.
234. Shaw S.L. Nod factor inhibition of reactive oxygen efflux in a host legume / S. L. Shaw, S. R. Long // Plant Physiol. – 2003. – V. 132, №4. – P. 2196–2204.
235. Shirasu K. The HSP90-SGT1 chaperone complex for NLR immune sensors / K. Shirasu // Annu. Rev. Plant Biol. – 2009. – V. 60.. – P. 139–164.
236. Shiu S.H. Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases / S. H. Shiu, A. B. Bleecker // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2001. – V. 98, №19. – P. 10763–10768.
237. Simons B.H. Enhanced expression and activation of the alternative oxidase during infection of Arabidopsis with *Pseudomonas syringae* pv *tomato* / B. H. Simons, F. F. Millenaar, L. Mulder, L. C. Van Loon, H. Lambers // Plant Physiol. – 1999. – V. 120, №2. – P. 529–538.
238. Slaughter A. Descendants of primed Arabidopsis plants exhibit resistance to biotic stress / A. Slaughter, X. Daniel, V. Flors, E. Luna, B. Hohn, B. Mauch-Mani // Plant Physiol. – 2012. – V. 158, №2. – P. 835–843.
239. Spoel S.H. NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol / S. H. Spoel, A. Koornneef, S. M. C. Claessens, J. P. Korzelius, J. A. Van Pelt, M. J. Mueller, A. J. Buchala, J.-P. Métraux, R. Brown, K. Kazan, L. C. Van

- Loon, X. Dong, C. M. J. Pieterse // *Plant Cell*. – 2003. – V. 15, №3. – P. 760–770.
240. Staal J. Tracing the ancient origins of plant innate immunity / J. Staal, C. Dixelius // *Trends Plant Sci*. – 2007. – V. 12, №8. – P. 334–342.
241. Stakman E. Relation between puccinia graminis and plants highly resistant to its attack / E. Stakman // *J Agric Res*. – 1915. – V. 4.. – P. 193–200.
242. Stergiopoulos I. Fungal effector proteins / I. Stergiopoulos, P. J. G. M. de Wit // *Annu. Rev. Phytopathol*. – 2009. – V. 47, №1. – P. 233–263.
243. Strider D. Bacterial canker of tomato caused by *Corynebacterium michiganense*, a literature review and bibliography. / D. Strider // *N. C. Agric Exp Stn. Tech Bul*. – 1969. – V. 193. – P. 110.
244. Stuart L.M. Effector-triggered versus pattern-triggered immunity: how animals sense pathogens / L. M. Stuart, N. Paquette, L. Boyer // *Nat. Rev. Immunol*. – 2013. – V. 13, №3. – P. 199–206.
245. Swidzinski J.A. A custom microarray analysis of gene expression during programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* / J. A. Swidzinski, L. J. Sweetlove, C. J. Leaver // *Plant J. Cell Mol. Biol*. – 2002. – V. 30, №4. – P. 431–446.
246. Swindell W.R. Transcriptional profiling of *Arabidopsis* heat shock proteins and transcription factors reveals extensive overlap between heat and non-heat stress response pathways / W. R. Swindell, M. Huebner, A. P. Weber // *BMC Genomics*. – 2007. – V. 8, №1. – P. 125.
247. Szatmári Á. Pattern triggered immunity (PTI) in tobacco: isolation of activated genes suggests role of the phenylpropanoid pathway in inhibition of bacterial pathogens / Á. Szatmári, Á. Zvara, Á. M. Móricz, E. Besenyei, E. Szabó, P. G. Ott, L. G. Puskás, Z. Bozsó // *PLoS ONE*. – 2014. – V. 9, №8. – P. e102869.
248. Thao N.P. RAR1 and HSP90 form a complex with Rac/Rop GTPase and function in innate-immune responses in rice / N. P. Thao, L. Chen, A.

- Nakashima, S. Hara, K. Umemura, A. Takahashi, K. Shirasu, T. Kawasaki, K. Shimamoto // *Plant Cell*. – 2007. – V. 19, №12. – P. 4035–4045.
249. Thompson A.R. Autophagic recycling: lessons from yeast help define the process in plants / A. R. Thompson, R. D. Vierstra // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2005. – V. 8, №2. – P. 165–173.
250. Tonsor S.J. Heat shock protein 101 effects in *A. thaliana*: genetic variation, fitness and pleiotropy in controlled temperature conditions / S. J. Tonsor, C. Scott, I. Boumaza, T. R. Liss, J. L. Brodsky, E. Vierling // *Mol. Ecol.* – 2008. – V. 17, №6. – P. 1614–1626.
251. Torre F. de la The tomato calcium sensor Cbl10 and its interacting protein kinase Cipk6 define a signaling pathway in plant immunity / F. de la Torre, E. Gutiérrez-Beltrán, Y. Pareja-Jaime, S. Chakravarthy, G. B. Martin, O. del Pozo // *Plant Cell*. – 2013. – V. 25, №7. – P. 2748–2764.
252. Torres M.A. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development / M. A. Torres, J. L. Dangl // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2005. – V. 8, №4. – P. 397–403.
253. Torres M.A. Arabidopsis gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response / M. A. Torres, J. L. Dangl, J. D. G. Jones // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2002. – V. 99, №1. – P. 517–522.
254. Torres M.A. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens / M. A. Torres, J. D. G. Jones, J. L. Dangl // *Plant Physiol.* – 2006. – V. 141, №2. – P. 373–378.
255. Tosi T. Structural basis of eukaryotic cell targeting by type III secretion system (T3SS) effectors / T. Tosi, A. Pflug, K. F. Discola, D. Neves, A. Dessen // *Res. Microbiol.* – 2013. – V. 164, №6. – P. 605–619.
256. Tseng T.-T. Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology / T.-T. Tseng, B. M. Tyler, J. C. Setubal // *BMC Microbiol.* – 2009. – V. 9. – P. S2.

257. Tsuda K. Interplay between MAMP-triggered and SA-mediated defense responses / K. Tsuda, M. Sato, J. Glazebrook, J. D. Cohen, F. Katagiri // *Plant J. Cell Mol. Biol.* – 2008. – V. 53, №5. – P. 763–775.
258. Vakifahmetoglu H. Death through a tragedy: mitotic catastrophe / H. Vakifahmetoglu, M. Olsson, B. Zhivotovsky // *Cell Death Differ.* – 2008. – V. 15, №7. – P. 1153–1162.
259. Vallad G.E. Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture / G. E. Vallad, R. M. Goodman // *Crop Sci.* – 2004. – V. 44, №6. – P. 1920.
260. Vance R.E. Patterns of pathogenesis: discrimination of pathogenic and nonpathogenic microbes by the innate immune system / R. E. Vance, R. R. Isberg, D. A. Portnoy // *Cell Host Microbe.* – 2009. – V. 6, №1. – P. 10–21.
261. Vandenabeele P. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion / P. Vandenabeele, L. Galluzzi, T. Vanden Berghe, G. Kroemer // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2010. – V. 11, №10. – P. 700–714.
262. Vercammen D. Type II metacaspases Atmc4 and Atmc9 of *Arabidopsis thaliana* cleave substrates after arginine and lysine / D. Vercammen, B. van de Cotte, G. De Jaeger, D. Eeckhout, P. Casteels, K. Vandepoele, I. Vandenberghe, J. Van Beeumen, D. Inzé, F. Van Breusegem // *J. Biol. Chem.* – 2004. – V. 279, №44. – P. 45329–45336.
263. Vidaver A.K. The plant pathogenic corynebacteria / A. K. Vidaver // *Annu. Rev. Microbiol.* – 1982. – V. 36. – P. 495–517.
264. Vierling E. The roles of heat shock proteins in plants / E. Vierling // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* – 1991. – V. 42, №1. – P. 579–620.
265. Vlot A.C. Systemic acquired resistance: the elusive signal(s) / A. C. Vlot, D. F. Klessig, S.-W. Park // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2008. – V. 11, №4. – P. 436–442.
266. Vrancken K. Pathogenicity and infection strategies of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* in Rosaceae: State of the art / K. Vrancken, M.

- Holtappels, H. Schoofs, T. Deckers, R. Valcke // *Microbiology*. – 2013. – V. 159, №5. – P. 823–832.
267. Wang Y. Genome-wide identification of heat shock proteins (Hsps) and Hsp interactors in rice: Hsp70s as a case study / Y. Wang, S. Lin, Q. Song, K. Li, H. Tao, J. Huang, X. Chen, S. Que, H. He // *BMC Genomics*. – 2014. – V. 15. – P. 344.
268. Wang Y. Cross-talk of nitric oxide and reactive oxygen species in plant programmed cell death / Y. Wang, G. J. Loake, C. Chu // *Front. Plant Sci.* – 2013. – V. 4.
269. Ward H. On the relations between host and parasite in the bromes and their brown rust, *Puccinia dispersa* (Erikss.) / H. Ward // *Ann Bot.* – 1902. – V. 16. – P. 233–316.
270. Watanabe N. Recent advance in the study of caspase-like proteases and Bax inhibitor-1 in plants: their possible roles as regulator of programmed cell death / N. Watanabe, E. Lam // *Mol. Plant Pathol.* – 2004. – V. 5, №1. – P. 65–70.
271. Wei W. A novel WRKY transcriptional factor from *Thlaspi caerulescens* negatively regulates the osmotic stress tolerance of transgenic tobacco / W. Wei, Y. Zhang, L. Han, Z. Guan, T. Chai // *Plant Cell Rep.* – 2008. – V. 27, №4. – P. 795–803.
272. Westra A.A.G. Isolation and characterization of extracellular polysaccharide of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* / A.A.G. Westra, S.A. Slack // *Phytopathology* – 1992. – V. 82. – P. 1193–1199.
273. Al-Whaibi M.H. Plant heat-shock proteins: A mini review / M. H. Al-Whaibi // *J. King Saud Univ. - Sci.* – 2011. – V. 23, №2. – P. 139–150.
274. Wilton M. The type III effector HopF2Pto targets Arabidopsis RIN4 protein to promote *Pseudomonas syringae* virulence / M. Wilton, R. Subramaniam, J. Elmore, C. Felsensteiner, G. Coaker, D. Desveaux // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2010. – V. 107, №5. – P. 2349–2354.

275. Wirthmueller L. Nuclear accumulation of the Arabidopsis immune receptor RPS4 is necessary for triggering EDS1-dependent defense / L. Wirthmueller, Y. Zhang, J. D. G. Jones, J. E. Parker // *Curr. Biol.* – 2007. – V. 17, №23. – P. 2023–2029.
276. Xu H. Role of calcium in signal transduction during the hypersensitive response caused by basidiospore-derived infection of the cowpea rust fungus / H. Xu, M. C. Heath // *Plant Cell Online.* – 1998. – V. 10, №4. – P. 585–597.
277. Xu P. Cucumber mosaic virus D satellite RNA-induced programmed cell death in tomato / P. Xu, M. J. Roossinck // *Plant Cell.* – 2000. – V. 12, №7. – P. 1079–1092.
278. Xu Z.-S. Heat shock protein 90 in plants: molecular mechanisms and roles in stress responses / Z.-S. Xu, Z.-Y. Li, Y. Chen, M. Chen, L.-C. Li, Y.-Z. Ma // *Int. J. Mol. Sci.* – 2012. – V. 13, №12. – P. 15706–15723.
279. Yao N. The mitochondrion--an organelle commonly involved in programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* / N. Yao, B. J. Eisfelder, J. Marvin, J. T. Greenberg // *Plant J. Cell Mol. Biol.* – 2004. – V. 40, №4. – P. 596–610.
280. Yao N. Apoptotic cell death is a common response to pathogen attack in oats / N. Yao, S. Imai, Y. Tada, H. Nakayashiki, Y. Tosa, P. Park, S. Mayama // *Mol. Plant-Microbe Interact.* – 2002. – V. 15, №10. – P. 1000–1007.
281. Yi H. Dual role of hydrogen peroxide in *Arabidopsis* guard cells in response to sulfur dioxide / H. Yi, X. Liu, M. Yi, G. Chen // *Adv. Toxicol.* – 2014. – V. 2014. – P. e407368.
282. Yin S. Subcellular localization of calcium in the incompatible and compatible interactions of wheat and *Puccinia striiformis f. sp. tritici* / S. Yin, C. Wang, M. Jiao, F. Li, Q. Han, L. Huang, H. Zhang, Z. Kang // *Protoplasma.* – 2014.

283. Yoda H. Polyamine oxidase is one of the key elements for oxidative burst to induce programmed cell death in tobacco cultured cells / H. Yoda, Y. Hiroi, H. Sano // *Plant Physiol.* – 2006. – V. 142, №1. – P. 193–206.
284. Yoshimori T. Autophagy: a regulated bulk degradation process inside cells / T. Yoshimori // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2004. – V. 313, №2. – P. 453–458.
285. Yoshioka H. *Nicotiana benthamiana* gp91phox homologs NbrbohA and NbrbohB participate in H₂O₂ accumulation and resistance to *Phytophthora infestans* / H. Yoshioka, N. Numata, K. Nakajima, S. Katou, K. Kawakita, O. Rowland, J. D. G. Jones, N. Doke // *Plant Cell Online.* – 2003. – V. 15, №3. – P. 706–718.
286. Yun Z. Comparative proteomic and metabolomic profiling of citrus fruit with enhancement of disease resistance by postharvest heat treatment / Z. Yun, H. Gao, P. Liu, S. Liu, T. Luo, S. Jin, Q. Xu, J. Xu, Y. Cheng, X. Deng // *BMC Plant Biol.* – 2013. – V. 13, №1. – P. 44.
287. Zago E. Nitric oxide- and hydrogen peroxide-responsive gene regulation during cell death induction in tobacco / E. Zago, S. Morsa, J. F. Dat, P. Alard, A. Ferrarini, D. Inzé, M. Delledonne, F. Van Breusegem // *Plant Physiol.* – 2006. – V. 141, №2. – P. 404–411.
288. Załuga J. Comparative genome analysis of pathogenic and non-pathogenic *Clavibacter* strains reveals adaptations to their lifestyle / J. Załuga, P. Stragier, S. Baeyen, A. Haegeman, J. V. Vaerenbergh, M. Maes, P. D. Vos // *BMC Genomics.* – 2014. – V. 15, №1. – P. 392.
289. Zeng L. A tomato LysM receptor-like kinase promotes immunity and its kinase activity is inhibited by AvrPtoB / L. Zeng, A. C. Velásquez, K. R. Munkvold, J. Zhang, G. B. Martin // *Plant J. Cell Mol. Biol.* – 2012. – V. 69, №1. – P. 92–103.
290. Zhang J. A *Pseudomonas syringae* effector inactivates MAPKs to suppress PAMP-induced immunity in plants / J. Zhang, F. Shao, Y. Li, H. Cui, L.

- Chen, H. Li, Y. Zou, C. Long, L. Lan, J. Chai, S. Chen, X. Tang, J.-M. Zhou // *Cell Host Microbe*. – 2007. – V. 1, №3. – P. 175–185.
291. Zhang J. Plant immunity triggered by microbial molecular signatures / J. Zhang, J.-M. Zhou // *Mol. Plant* – 2010. – V. 3, №5. – P. 783–793.
292. Zitvogel L. Decoding cell death signals in inflammation and immunity / L. Zitvogel, O. Kepp, G. Kroemer // *Cell*. – 2010. – V. 140, №6. – P. 798–804.