

КАЗАНСКИЙ ИНСТИТУТ БИОХИМИИ И БИОФИЗИКИ,
ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«КАЗАНСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

В. Ю. Горшков

Бактериозы растений:

молекулярные основы формирования
растительно-микробных патосистем

Издательство Сергея Бузукина
Казань, 2017

УДК 581.2
ББК 44.7
Г70

Печатается по решению Ученого совета КИББ ФИЦ КазНЦ РАН

Рецензенты:

доктор биологических наук Ф. В. Минибаева (Казанский институт биохимии и биофизики, Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук»)

доктор биологических наук Г. В. Новикова (Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева Российской академии наук)



Издание подготовлено при финансовой поддержке
Российского научного фонда по проекту № 15-14-10022

Горшков В. Ю.

Г70 Бактериозы растений: молекулярные основы формирования растительно-микробных патосистем. — Казань: Изд-во Сергея Бузукина, 2017. — 304 с.

ISBN 978-5-905514-36-4

В монографии рассмотрены молекулярно-генетические и физиолого-биохимические аспекты взаимодействия растений и фитопатогенных бактерий при формировании патологических систем. Охарактеризованы основные детерминанты вирулентности фитопатогенных бактерий и факторы устойчивости растений к биотическим стрессорам. Описаны основные принципы регуляции продукции факторов вирулентности и механизмы индукции фитомунных ответов. Систематизированы критерии количественной и качественной устойчивости, а также индуцируемой восприимчивости растений к фитопаразитам. Освещены проблемы бактериозов сельскохозяйственных культур на территории Российской Федерации.

Книга предназначена для широкого круга исследователей, преподавателей, аспирантов и студентов, занимающихся фитопатологией, биологией растений, микробиологией и молекулярной биологией.

УДК 581.2
ББК 44.7

ISBN 978-5-905514-36-4

© Горшков В. Ю., 2017
© Казанский институт биохимии и биофизики,
Федеральный исследовательский центр «Казанский
научный центр Российской академии наук», 2017
© Издательство Сергея Бузукина, 2017

В. Ю. Горшков

Бактериозы растений:

молекулярные основы формирования
растительно-микробных патосистем

Список сокращений

- АБК — абсцизовая кислота
АГЛ — ацил-гомосеринлактон
АП — аскорбатпероксидаза
АФА — активные формы азота
АФК — активные формы кислорода
ГП — глутатионпероксидаза
ЖК — жасмоновая кислота
КАТ — каталаза
КЗПК — кальций-зависимые протеинкиназы
МАМП — микроорганизм-ассоциированный молекулярный паттерн
МАП-киназы — митоген-активируемые протеинкиназы
ПАМП — патоген-ассоциированный молекулярный паттерн
ПИУ — ПАМП-индуцируемая устойчивость
ПКС — программируемая клеточная смерть
РГЧ — реакция гиперчувствительности
РКС — растительная клеточная стенка
СК — салициловая кислота
СОД — супероксиддисмутаза
СПУ — системная приобретенная устойчивость
СС1Т — система секреции первого типа
СС2Т — система секреции второго типа
СС3Т — система секреции третьего типа
СС4Т — система секреции четвертого типа
СС5Т — система секреции пятого типа
СС6Т — система секреции шестого типа
СС7Т — система секреции седьмого типа
ЭЗВ — эффектор-зависимая восприимчивость
ЭИУ — эффектор-индуцируемая устойчивость
ЭПС — экзополисахариды

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	7
Глава 1. Основные понятия фитопатологии	10
Глава 2. Проблема бактериозов растений в России	16
Глава 3. Факторы вирулентности фитопатогенных бактерий.....	29
3.1. Ферменты, разрушающие компоненты растительных клеточных стенок	29
3.2. Системы секреции бактерий.....	43
3.3. Фитотоксины	55
3.4. Сидерофоры	59
3.5. Жгутики и пили: подвижность микроорганизмов.....	65
3.6. Бактериальные экзополисахариды	75
3.7. Агробактериальная система естественного трансгенеза растений	85
3.8. «Цитодифференцировка» фитопатогенных бактерий.....	91
Глава 4. Регуляция продукции факторов вирулентности	110
4.1. Регуляторная система «чувства кворума» (quorum sensing).....	110
4.2. Сенсоры метаболитов растения-хозяина.....	124
4.3. Двухкомпонентные регуляторные системы	128
4.4. Вторичные посредники (вторичные мессенджеры).....	133
Глава 5. Основные факторы фитоиммунитета	137
5.1. Растительная клеточная стенка	137
5.2. Вторичные метаболиты.....	148
5.3. Активные формы кислорода и программируемая клеточная смерть	155
5.4. PR-белки	161
5.5. Репрессоры «чувства кворума» (кворум квенчинг, quorum quenching).....	167
Глава 6. Регуляция индуцируемого фитоиммунитета	175
6.1. Количественная (горизонтальная, ПАМП-индуцируемая) устойчивость	175
6.2. Качественная (вертикальная, эффектор-индуцируемая) устойчивость.....	192
6.3. Фитогормоны в регуляции иммунного ответа	210
Глава 7. Восприимчивые ответы растений как критерий развития патосистем.....	236
7.1. Движения замыкающих клеток устьиц	239
7.2. Изменение свойств растительной клеточной стенки	241
7.3. Модуляция водного транспорта	248
7.4. Перераспределение фотоассимилятов	254
7.5. Программируемая клеточная смерть	258
7.6. Модуляция баланса некоторых металлов	261
7.7. Неопластический рост: симптомы гипертрофии и гиперплазии	263
7.8. Регуляторы растений, опосредующие индукцию восприимчивых ответов	267
7.9. Факторы вирулентности бактерий, индуцирующие восприимчивые ответы растений-хозяев.....	282
7.10. Возможные последствия индукции восприимчивых ответов	291
Заключение	299

ВВЕДЕНИЕ

Жизнь многоклеточных организмов протекает в тесной кооперации с микробным миром. Растения не являются исключением и также активно взаимодействуют с представителями микрофлоры, среди которых встречаются и мутуалисты (приносящие пользу хозяину), и паразиты (вызывающие патологии у макроорганизма). В действительности, границы между мутуализмом и паразитизмом достаточно размыты. Недаром Антон де Бари, чьи исследования растительно-микробных систем можно считать пионерскими, ввел понятие *симбиоз* («длительное сосуществование разнородных организмов»), которое объединяет все типы взаимоотношений макро- и микроорганизмов независимо от стратегии и исхода их взаимодействия. Тем не менее де Бари все же разделял мутуалистические (выгодные обоим партнерам) и антагонистические (полезные для одного организма, но вредные для другого) симбиозы. Однако сейчас становится очевидным, что, как и в известной поговорке «От любви до ненависти — один шаг», от мутуализма до паразитизма тоже совсем небольшая «дистанция». Стратегии колонизации растений мутуалистами и паразитами, как и физиологические ответы растений на две эти группы микроорганизмов, имеют много общего. Существуют даже такие микроорганизмы, у которых одновременно проявляются явные черты и мутуалистов (например, эндофитная азотфиксация), и паразитов (индукция формирования патологий). Кроме того, некоторые паразиты при определенных условиях могут приносить пользу растению-хозяину, например, увеличивая его устойчивость к агрессивным патогенам, а также к стрессорам абиотической природы. В связи с этим был даже введен термин *conditionally beneficial pathogens* («условно выгодные патогены»), который отражает экологическую значимость паразитических организмов для их хозяев.

Сегодня еще трудно однозначно судить о том, что «заставляет» одни микроорганизмы мирно сосуществовать с растениями, а другие — переходить к агрессивным действиям и вызывать заболевание. Чтобы попытаться ответить на этот вопрос, необходимо рассмотреть проблему симбиоза комплексно, проводя сравнительный анализ молекулярных, физиологических, генетических и экологических аспектов разных типов взаимодействия макро- и микроорганизмов. Предлагаемая читателю книга не ставит перед собой столь глобальной задачи, а имеет

цель рассказать о формировании и функционировании растительно-микробных систем паразит-хозяин (патологических систем) с упором на процессы взаимодействия растений с фитопатогенными бактериями. Предпосылкой для написания этой монографии послужило отсутствие трудов, обобщающих информацию о механизмах развития бактериозов растений. При этом вопросы взаимодействия растений с мутуалистической микрофлорой, а также с фитопатогенными грибами освещены достаточно полно и разносторонне, в том числе в ряде ярких отечественных монографий. Большой интерес к микробам-мутуалистам и фитопатогенным грибам объясняется тем, что первые небезосновательно считаются «помощниками» растений в разных аспектах их жизни, а вторые рассматриваются как основная причина порчи сельскохозяйственной продукции. Фитопатогенные бактерии при этом долго оставались в тени. Однако сейчас научный интерес к ним стремительно растет. Это связано, во-первых, с тем, что бактериозы, называемые болезнями XXI века, по масштабам ущерба начинают вытеснять заболевания, вызываемые грибами. Во-вторых, осознание того, что фитопатогены (в том числе фитопатогенные бактерии) часто оказываются полезными для растений и могут детерминировать их развитие как на организменном, так и на популяционном уровнях, являясь, таким образом, неотъемлемой и необходимой составляющей экосистем, сделало патологические системы объектами не только прикладных, но и фундаментальных исследований.

Несмотря на большую значимость исследований бактериозов растений, в нашей стране специалистов в этой области — единицы; при этом очевиден недостаток образовательных программ для их подготовки. Хочется надеяться, что эта книга внесет вклад в восполнение этого пробела и «заразит» читателей историей о взаимоотношениях растений и фитопатогенных бактерий.

Задумывалась эта монография таким образом, чтобы быть полезной как «новичкам», в том числе студентам, так и специалистам-фитопатологам. С одной стороны, в книгу включены «учебные материалы», которые позволят познакомиться с основными терминами, используемыми в фитопатологии, узнать о разнообразии и механизмах регуляции продукции факторов вирулентности фитопатогенных бактерий, разобраться в молекулярных основах фитоиммунитета. При изложении этих материалов была сделана попытка не просто описать механизмы того или иного процесса, но и отразить их красоту и замысловатость, а также объяснить логику молекулярных событий, происходящих при формировании патосистем. С другой стороны, в книге приведена самая свежая информация по проблеме бактериозов растений, освещены новые, ранее подробно не обсуждавшиеся в научной литературе направления («цитодифференцировка» фитопатогенных бактерий при формировании патосистем, восприимчивые ответы растений на фитопаразиты), а также подняты дискуссионные вопросы. Надеюсь, что эта «сторона» книги будет интересна специалистам и послужит стимулом для возникновения новых идей об устройстве растительно-микробных патосистем. Буду искренне признателен всем, кто сочтет возможным поделиться своими впечатлениями об этой монографии и высказать критические замечания и предложения для ее улучшения.

Выход в свет этой книги не состоялся бы без помощи коллег, которые приняли участие в систематизировании материалов, научном и техническом редактировании, подготовке рисунков и т. д. Всем помогавшим: Петровой Ольге Евгеньевне, Губаеву Риму Фаридовичу, Горшковой Татьяне Анатольевне, Мокшиной Наталье Евгеньевне, Микшиной Полине Владимировне, Даминовой Амине Галеевне, Ковтунову Евгению Анатольевичу, Исламову Бахтияру Рамилевичу, Парфировой Ольге Игоревне, Гапа Любови Михайловне, Гоголевой Наталье Евгеньевне, Воробьеву Владимиру Николаевичу — выражаю искреннюю благодарность. Глубоко признателен своему руководителю — Гоголеву Юрию Викторовичу, научившему меня «подслушивать растительно-микробные разговоры», и своей семье, в первую очередь родителям — Горшковым Юрию Александровичу и Татьяне Анатольевне, за терпение и поддержку.

В монографию включены результаты исследований, выполненных в Казанском институте биохимии и биофизики КазНЦ РАН при финансовой поддержке Российского научного фонда, грантов Президента Российской Федерации и Российского фонда фундаментальных исследований.

Глава 1

ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ ФИТОПАТОЛОГИИ

Прежде чем приступить к изложению молекулярных механизмов формирования патосистем при взаимодействии растений и фитопатогенных бактерий, необходимо определиться с некоторыми терминами и понятиями фитопатологии — науки о заболеваниях растений. Заболевания у растений могут возникать в результате действия стрессовых факторов абиотической природы (неоптимальная температура, влажность, избыточное засоление и т. д.), а также вследствие взаимодействия с *фитопатогенными* микроорганизмами (биотические стрессовые факторы).

Патогенность (фитопатогенность) — это таксономический признак, обозначающий генетически закрепленную способность микроорганизма вызывать определенное заболевание у организма хозяина. Патогенность — это качественный (а не количественный) признак, отражающий генетический потенциал организмов, который определяет их способность вызывать патологический процесс. То, насколько этот потенциал реализуется в конкретной ситуации, отражают количественные критерии патогенности — *вирулентность* и *агрессивность* (Agrios, 2005).

Вирулентность микроорганизма (степень проявления патогенного потенциала) определяется несколькими критериями: *инвазивностью*, *инфекционностью*, *токсигенностью* и *персистенцией*. **Инвазивность** характеризует способность патогена к проникновению внутрь организма хозяина. **Инфекционность** — это свойство паразитического микроорганизма, позволяющее ему вызывать *инфекционный процесс* у хозяина и преодолевать неспецифичные защитные ответы макроорганизма. **Токсигенность** определяет способность патогена синтезировать вещества, обладающие токсическим действием на организм хозяина. **Персистенция** — это процесс длительного выживания паразита в организме хозяина, которое обеспечивается «индифферентностью» («нечувствительностью») микроорганизма к иммунным реакциям макроорганизма (Супотницкий, 2000; Поздеев, 2010). Для того чтобы соответствовать критериям вирулентности, фитопатогенные микроорганизмы продуцируют специальные метаболиты (ферменты, разрушающие полимеры хозяина, токсины, факторы адгезии и многие другие), которые называются *факторами вирулентности* (см. главу 3). Штаммы фитопатогенных микроорганизмов, которые не отвечают критериям вирулентности, называют *авирулентными*.

Агрессивность микроорганизма определяется тремя критериями: 1) минимальной инфекционной нагрузкой, необходимой для развития инфекционного процесса; 2) продолжительностью латентной (бессимптомной) стадии инфекции

и 3) скоростью размножения патогена в организме хозяина (Pariaud et al., 2009; Lannou, 2012).

При колонизации макроорганизма патогенные микроорганизмы индуцируют у хозяина развитие **инфекционного процесса** (инфекцию) — комплекса реакций, протекающих в организме хозяина, вследствие внедрения и размножения в нем патогенных микроорганизмов, и направленных на восстановление гомеостаза (Поздеев, 2010). В зависимости от возбудителя заболевания, а также широкого набора внешних факторов могут развиваться разные типы инфекционного процесса. В эпидемиологии инфекции разделяют на *манифестные* и *бессимптомные*. **Манифестные** инфекции могут протекать *типично, атипично, хронически*. **Типичная** инфекция сопряжена с развитием характерных патологических процессов, которые обычно вызывает определенный патоген. При **атипичной** инфекции ее возбудитель, размножаясь в организме хозяина, вызывает нетипичные симптомы заболевания. При **хронической** инфекции патологии обычно выражены слабо (значительно в меньшей степени, чем при типичной). Такая инфекция, как правило, связана с персистенцией бактерий в организме хозяина и зачастую бывает сопряжена с рецидивами, приводящими к развитию типичной инфекции.

Среди **бессимптомных** инфекций различают *абортивную, латентную и дремлющую* инфекции. Развитие **абортивной** инфекции подразумевает быструю элиминацию (гибель) патогена при попадании в организм потенциального хозяина из-за эффективной работы защитных систем макроорганизма. Обычно абортивные инфекции являются следствием генетической несовместимости патогена и хозяина. При **латентных** инфекциях (которые еще называют *инаппарантными*) патоген способен размножаться внутри хозяина, не вызывая при этом симптомов заболевания. При таких инфекциях патоген может также переноситься на здоровые растения и вызывать у них развитие разных типов инфекции. **Дремлющие** инфекции развиваются как продолжение типичных инфекций, в том случае если между макро- и микроорганизмом устанавливается «баланс», который позволяет обоим «партнерам» выживать в составе системы паразит-хозяин (Деверолл, 1979).

При развитии любого типа инфекции, кроме абортивного, патоген и хозяин считаются **совместимыми**, то есть способными к длительному взаимодействию; взаимодействие совместимых патогена и хозяина тоже называют совместимым. Поскольку развитие абортивной инфекции подразумевает быструю элиминацию патогена, тип взаимодействия макро- и микроорганизма в рамках такой инфекции считается несовместимым, а патоген и хозяин при этом называются **несовместимыми** (Чесноков, 2007).

Развитие разных типов инфекций при инвазии патогенного микроорганизма может отражать **восприимчивость, устойчивость** или **толерантность** растения к патогену. На восприимчивых растениях вследствие активного размножения патогена развиваются выраженные патологии (манифестные инфекции). В устойчивых растениях клетки патогенного организма либо элиминируются, либо оказываются неспособными к размножению (абортивная инфекция). Толерантные растения не препятствуют размножению патогенов, однако при этом у хозяина

не происходит развития патологий и продуктивность растений не снижается (латентные и дремлющие инфекции) (Анучин с соавт., 1986).

Для колонизации растений-хозяев фитопатогены могут использовать разные стратегии «поведения», которые, в частности, определяются типом трофности (питания) паразита. По типу трофности паразитические организмы условно разделяют на *биотрофов*, *некротрофов* и *гемибиотрофов*. **Биотрофные** патогены извлекают питательные вещества из живых клеток хозяина и поэтому не приводят к их быстрой гибели. **Некротрофные** патогены, наоборот, убивают клетки хозяина с помощью токсинов и экстраклеточных ферментов и используют в качестве ростового субстрата метаболиты, высвобождающиеся из мертвых клеток макроорганизма. К **гемибиотрофам** относят «переходную» группу патогенов, которые на первых стадиях взаимодействия с хозяином ведут себя как биотрофы, а на поздних — как некротрофы (Багирова с соавт., 2012). В действительности, различия между этими группами патогенов достаточно условные: биотрофы могут вызывать гибель растительных клеток, а некротрофы могут бессимптомно взаимодействовать с хозяином. Разделение на биотрофов, некротрофов и гемибиотрофов определяется продолжительностью некротрофной и биотрофной стадий взаимодействия патогенов с хозяевами.

При взаимодействии патогена и хозяина происходит их интеграция, которая выражается в формировании **патологической системы**. В терминах инфекционной патологии «патологическая система» — это функциональная совокупность реакций отдельных клеток, тканей, органов, систем или организма в целом, возникающая в результате воздействия на организм патогенного фактора (биотического или абиотического), характеризующаяся длительной самоподдерживающейся активностью и депрессией саногенетических механизмов, имеющая в своей основе нарушение информационного процесса и ведущая (в случае длительного существования и прогрессирования) к углублению нарушения равновесия большого организма с окружающей средой (Фролов и др., 1999). Однако это общее определение патологической системы не учитывает некоторых особенностей, характерных для патосистем, состоящих более чем из одного организма (систем паразит-хозяин), в том числе и растительно-микробных. Во-первых, возможность формирования растительно-микробной патосистемы является результатом длительной коэволюции ее элементов (патогена и хозяина), приведшей к их **генетической совместимости**, то есть потенциальной способности взаимодействовать друг с другом (см. ниже). Во-вторых, важную роль во взаимодействии микробов и растений играет их **физиологическая совместимость**, которая необходима для интеграции элементов патосистемы в единую структуру (см. ниже). В-третьих, оба компонента растительно-микробной патосистемы в силу самого своего объединения приобретают новые свойства: растение в составе патосистемы — это уже «другое» растение, а микроорганизмы — «другие» микроорганизмы. Таким образом, с точки зрения фитопатологии растительно-микробные патосистемы должны пониматься как интегрированные системы, в рамках которых происходит развитие двух организмов — растения и патогена — как единого целого. Растительно-

микробные патосистемы представляют собой устойчивые комплексы, формирующиеся в ходе коэволюции и коадаптации растения-хозяина и паразита, и являются важными компонентами экосистем, определяющими их баланс.

Растительно-микробные патосистемы обычно достаточно стабильны, что определяется двумя основными причинами. Во-первых, с эволюционной точки зрения длительное существование «сверхагрессивных» популяций паразитов маловероятно, поскольку быстрая гибель хозяина лишает их экологической ниши. Следовательно, у паразитов гены «сверхагрессивности» либо исчезают, либо вырабатываются механизмы для строгой регуляции их экспрессии. Во-вторых, в соответствии с законами естественного отбора, чрезмерно чувствительные к паразитам хозяева гибнут, не успевая дать потомства. Следовательно, из популяции хозяев исчезают гены летальной чувствительности к паразиту. Благодаря этому в рамках патосистем паразит и хозяин обычно длительно сосуществуют друг с другом (Чикин, 2001).

Генетическая совместимость патогена и хозяина определяется наличием/отсутствием у обоих организмов большого набора определенных генов, продукты которых определяют возможность формирования патологической системы (Ellingboe, 1982; Ghatak, Ansar, 2017). Этими генами, во-первых, являются бактериальные гены, кодирующие факторы вирулентности, которые необходимы для взаимодействия с хозяином. К ним относятся ферменты, разрушающие полимеры растительных клеточных стенок, фитотоксины, эффекторные белки секреторной системы третьего типа, обычно выполняющие сигнальную функцию, экстраклеточные полисахариды и т. д. (см. главу 3). Во-вторых, к этим генам принадлежат растительные гены, кодирующие защитные белки: дефензины, тионины, ферменты биосинтеза фитоалексинов и «защитных полимеров», таких как каллоза и лигнин, и др. (см. главу 5). В-третьих, на совместимость патогена и хозяина влияют гены, кодирующие компоненты бактериальных и растительных сигнальных каскадов, участвующих в распознавании партнера и координирующих ответные реакции (см. главы 4, 6). В-четвертых, генетическая совместимость/несовместимость патогена и хозяина определяется генами устойчивости растений (R) и авирулентности микроорганизмов (Avr). В случае когда продукты R- и Avr-генов не взаимодействуют друг с другом, патоген способен развиваться в тканях хозяина (совместимое взаимодействие); в противном случае происходит активация защитных систем хозяина и элиминация патогена (несовместимое взаимодействие) (см. главу 6.2).

Физиологическая совместимость определяет «готовность» патогена и хозяина к взаимодействию, то есть способность организмов к реализации имеющегося у них генетического потенциала для формирования интегрированной патологической системы, а также сценарий взаимоотношений макро- и микроорганизма (Panstruga, 2003; Rinaldi et al., 2007). Известно, что особенности взаимодействия растений и патогенов определяются не только их генетическими характеристиками, но и исходным физиологическим состоянием макро- и микроорганизма (до взаимодействия), а также множеством факторов окружающей среды. Это

можно проиллюстрировать на целом ряде примеров. Во-первых, степень устойчивости/восприимчивости растений к патогену может различаться на разных стадиях онтогенеза (на которых растение имеет разный физиологический статус). Во-вторых, очень часто развитие тех или иных патологий может быть приурочено к определенным погодным условиям, которые влияют на особенности физиологии обоих организмов. В-третьих, инфицирование растений авирулентным штаммом микроорганизма может индуцировать такие физиологические реакции у хозяина, которые делают его устойчивым к потенциально вирулентному патогену. В-четвертых, растения, инфицированные вирулентным патогеном, могут становиться более восприимчивыми и к слабовирулентным паразитам или даже к непатогенным организмам. Таким образом, формирование и развитие патологической системы определяется физиологическим статусом организмов и особенностями его последовательного координированного изменения в рамках процесса взаимодействия паразита и хозяина. У растений физиологические преобразования, необходимые для формирования патологической системы, объединены под названием индуцированной (приобретенной) восприимчивости или восприимчивого ответа (см. главу 7).

Литература:

- Анучин, Н. П., Атрохин, В. Т., & Виноградов, В. Н. (1986). Лесная энциклопедия. Том II. Москва. Изд-во Советская энциклопедия.
- Багирова, С. Ф., Джавахия, В. Г., Дьяков, Ю. Т., Озерецковская, О. Л., Проворов, Н. А., Тихонович, И. А., & Щербакова, Л. А. (2012). Фундаментальная фитопатология. Москва. Изд-во Красанд.
- Деверолл, Б. Д. (1979). Защитные механизмы растений. Москва. Изд-во Колос.
- Поздеев, О. К. (2010). Медицинская микробиология. Москва. Изд-во ГЭОТАР-Медиа.
- Супотницкий, М. В. (2000). Микроорганизмы, токсины и эпидемии. Москва. Изд-во Вузовская книга.
- Фролов, В. А. (1999). Патологическая физиология. Москва. Изд-во Экономика.
- Чесноков, Ю. В. (2007). Устойчивость растений к патогенам (обзор иностранной литературы). *Сельскохозяйственная биология*, (1), 16–35.
- Чикин, Ю. А. (2001). Общая фитопатология. Томск. Изд-во Томского государственного университета.
- Agrios, G. N. (2005). Plant Pathology. 5th eds. Department of Plant Pathology. University of Florida. United States of America.
- Ellingboe, A. H. (1982). Host resistance and host-parasite interactions: a perspective. In: *Phytopathogenic Prokaryotes*, ed. MS Mount, GH Lacey, New York: Academic.
- Ghatak, A., & Ansar, M. (Eds.). (2017). The phytopathogen: evolution and adaptation. Apple Academic Press, USA.

Lannou, C. (2012). Variation and selection of quantitative traits in plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 50, 319–338.

Panstruga, R. (2003). Establishing compatibility between plants and obligate biotrophic pathogens. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(4), 320–326.

Pariaud, B., Ravigné, V., Halkett, F., Goyeau, H., Carlier, J., & Lannou, C. (2009). Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens. *Plant Pathology*, 58(3), 409–424.

Rinaldi, C., Kohler, A., Frey, P., Duchaussoy, F., Ningre, N., Couloux, A., ... & Duplessis, S. (2007). Transcript profiling of poplar leaves upon infection with compatible and incompatible strains of the foliar rust *Melampsora larici-populina*. *Plant Physiology*, 144(1), 347–366.

Глава 2

ПРОБЛЕМА БАКТЕРИОЗОВ РАСТЕНИЙ В РОССИИ

Фитопатогенные бактерии могут вызывать развитие серьезных патологий у культурных растений и приводить к значительным потерям урожая. В России проблему бактериозов растений, как и во многих других странах мира, долгое время недооценивали. Основными причинами порчи сельскохозяйственной продукции считали фитопатогенные грибы, а бактериям при этом уделяли значительно меньшее внимание. Однако в последние годы, в том числе в ряде регионов Российской Федерации, заболевания, вызываемые фитопатогенными бактериями, вышли на уровень эпифитотий (эпидемий) (Говоров с соавт., 2015; Санин, 2016) (табл. 2.1). Вследствие повсеместного распространения и значительного экономического ущерба бактериозы растений сейчас даже стали называть болезнями XXI века (Котляров, 2008; Дякунчак с соавт., 2017; Лазарев с соавт., 2017).

На первом месте по поражаемости фитопатогенными бактериями находятся картофель и овощные культуры (Санин, 2016). Среди бактериозов картофеля наибольший ущерб наносят кольцевая гниль (возбудители — представители рода *Clavibacter*) (рис. 2.1), а также мягкая (или мокрая) гниль и черная ножка (рис. 2.2), вызываемые фитопатогенными бактериями родов *Dickeya* и *Pectobacterium* (Карлов с соавт., 2010, 2011; Toth et al., 2011; Лазарев, 2013; Ерохова, Дренова, 2014; Игнатов с соавт., 2014). Около четверти производимых на территории Российской Федерации клубней картофеля (а для некоторых регионов более половины) поражены *Clavibacter michiganensis* (Игнатов с соавт., 2014). Мягкие гнили, которые за несколько дней могут превратить клубни картофеля в бесформенную массу, и черная ножка уносят, в зависимости от погодных условий, до 70% урожая картофеля (Пилипова, Шалдяева, 2016). В начале второй декады 2000-х годов в Московской области были также отмечены случаи развития бурой гнили картофеля, вызываемой карантинным для Российской Федерации фитопатогеном *Ralstonia solanacearum* (рис. 2.3). В Индии это заболевание приводит к потере до 80% урожая картофеля (Игнатов с соавт., 2015; Национальный доклад о карантинном фитосанитарном состоянии территории Российской Федерации в 2016 году).

Широкое распространение в России получил сосудистый бактериоз капусты, вызываемый некоторыми фитопатогенными ксантомонадами (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *X. arboricola*) (рис. 2.4). Это заболевание, характерное для всех основных зон выращивания этой культуры, приводит к порче 10–80% урожая капусты, в первую очередь при хранении (Харламов, Игнатов, 2001). Большой вред (40–70% урожая) наносит фитопатоген *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, вызывающий черную бактериальную пятнистость томата и некоторых других культур (Корнев с соавт., 2010) (рис. 2.5). Помимо ксантомонад, томаты интенсивно поражаются бактериями *Clavibacter michiganensis* (бактериальный рак) (рис. 2.6) и *Pseudomonas corrugata* (сердцевинный некроз) (рис. 2.7).

В 2013–2014 годах в ряде тепличных хозяйств нашей страны происходило поражение огурца представителями рода *Agrobacterium* (реклассифицирован в род *Radiobacter*), которые вызывают патологическое разрастание растительных тканей: опухоли, галлы, «наросты», «бородатые корни» (Колесова, 2014) (рис. 2.8). У инфицированных агробактериями растений подавляется ростовая активность и устойчивость к стрессовым факторам, что в конечном итоге часто приводит к гибели растения. Агробактерии также активно поражают плодовые деревья и виноград. Ежегодные потери винограда при этом составляют до 10% (Бурдинская, Арестова, 2010).

Больших масштабов достигает ущерб, наносимый *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* и *Erwinia amylovora*, которые вызывают бактериозы (опухоль и ожоги соответственно) плодовых деревьев (вишни, яблони, сливы) (рис. 2.9). Такие заболевания были выявлены во многих регионах Российской Федерации; при этом количество пораженных деревьев составляло 20–50%, а в некоторых случаях достигало 90% (Шнейдер, 2009).

В последние годы в Российской Федерации отмечается вспышка бактериозов зерновых культур. В начале 2000-х годов возбудителей базального бактериоза (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae* и *P. syringae* pv. *atofaciens*) (рис. 2.10) и бактериальной корневой гнили (*Pseudomonas marginalis*) зерновых детектировали в семенном материале менее чем в 1% случаев; сейчас они выявляются в 10% случаев (Пасичник с соавт., 2014; Игнатов с соавт., 2015). Основной ущерб эти патогены наносят озимым культурам при низких температурах. В Центрально-Черноземном и Северо-Кавказском регионах зерновые культуры сильно поражаются черным бактериозом, вызываемым *Xanthomonas translucens* (рис. 2.11). Потери урожая при вспышке черного бактериоза могут достигать 60% (Матвеева с соавт., 2006). В 2010–2014 годах отмечено появление нового для России возбудителя заболеваний злаковых (рис, овес, кукуруза, пшеница) и других культур — *Pantoea ananatis*. Бактерии этого вида вызывают пятнистость на листьях, увядание и ожоги зерновых, а также лука, томата и дыни (Coutinho, Venter, 2009) (рис. 2.12).

Ситуацию с бактериозами сельскохозяйственных культур в Российской Федерации сейчас считают приближающейся к катастрофической (Санин, 2016). В последние 10 лет на территории России происходит как учащение случаев поражения растений «традиционными» для региона фитопатогенными бактериями, так и появление «новых» возбудителей фитобактериозов. В первую очередь это касается южных районов России, где особенно широкое распространение получили бактериозы картофеля (*Dickeya dianthicola* и *D. solani*), риса (*Pantoea ananatis*), плодовых (*Erwinia amylovora*) и овощных культур (*Agrobacterium rhizogenes*) (Игнатов с соавт., 2015; Магомедов с соавт., 2015). Большой ущерб фитопатогенные бактерии наносят и в областях Центральной России и Сибири, вызывая различные патологии у целого ряда сельскохозяйственных культур (картофель, томат, кукуруза, рапс, подсолнечник, соя и др.) (Котляров с соавт., 2006; Лазарев, Борисова, 2010). Сложившаяся ситуация во многом связана с тем, что на сегодняшний день не существует научно обоснованной комплексной стратегии борьбы с распространением фитопатогенов и с развитием бактериозов растений (Санин, 2016).

Решение проблемы бактериозов растений в Российской Федерации подразумевает использование комплексного подхода. Во-первых, требуется оптимизация агротехнологических мероприятий. Большая часть сельскохозяйственной продукции инфицируется фитопатогенными бактериями при уборке, сортировке и хранении урожая (Дементьева, 1988). В связи с этим необходима разработка подходов, которые позволят снизить случаи контаминации растительного материала паразитами при этих процедурах. Несоблюдение правил севооборота и технологий возделывания культурных растений тоже может вызвать вспышку бактериозов. Применение завышенных доз минеральных удобрений часто является причиной развития заболеваний растений, а использование пестицидов, в дополнение к негативному влиянию на окружающую среду и организм человека, может приводить к появлению трудноконтролируемых штаммов патогенов, устойчивых к средствам защиты растений (Захаренко, 2015; Санин, 2016).

Безусловную важность для контроля заболеваний растений имеет эффективная диагностика фитопатогенов в агрофитоценозах. В связи с этим существует необходимость расширения сети сертифицированных диагностических подразделений и оптимизации методов выявления фитопатогенных бактерий, которая позволит увеличить достоверность и надежность диагностики, а также оперативность и регулярность ее проведения. Особую важность диагностические мероприятия имеют в предпосевной период для грамотного распределения посевных площадей в зависимости от состава микрофлоры, а также в послепосевной период, чтобы не допускать закладку контаминированной патогеном продукции на длительное хранение.

Необходимо также создание и постоянное обновление коллекций штаммов фитопатогенных организмов и их комплексная характеристика в рамках специализированных лабораторий и экспериментальных полевых площадей. Это позволит получать информацию о механизмах вирулентности патогенов, развития вызываемого ими патологического процесса и сформирует основу для разработки способов контроля их вредоносности. Для этого, в частности, перспективным представляется создание и испытание химических, и в особенности биологических, препаратов, которые смогут сдерживать патогенный потенциал микроорганизмов. Безусловную актуальность имеет и направленная селекция с целью создания устойчивых или толерантных к фитопатогенным бактериям сортов растений. Вышеперечисленные мероприятия требуют наличия высококвалифицированных кадров, для подготовки которых необходимы специализированные образовательные программы; недостаток таких программ остро ощущается в настоящее время.

Существует также потребность в продумывании, испытании и постепенном внедрении альтернативных, более «новаторских», подходов для поддержания «здоровья» культурных растений. Среди таких подходов перспективным представляется создание эффективных для получения урожая «надорганизменных систем». По сути, любой высший организм представляет собой своего рода «надорганизменную систему», в состав которой входит большое количество представителей микрофлоры, в том числе патогенной. Несмотря на это, в большинстве случаев развития патологий у макроорганизмов, населенных патогенными бактериями, не проис-

ходит. Для всех (или почти всех) исследуемых на сегодняшний день растительно-микробных патосистем описан такой сценарий взаимодействия паразита и хозяина, при котором, несмотря на активное размножение патогена *in planta*, выраженные симптомы заболевания не развиваются и продуктивность растений не снижается. Для дикорастущих видов растений развитие заболевания при колонизации патогеном является вообще редким исключением из правил. Это означает, что у любого агрессивного патогена и его растения-хозяина существуют такие программы взаимодействия, которые позволяют обоим партнерам совместно проходить стадии жизненного цикла, не нанося значительного ущерба друг другу. Выяснение того, как регулируются такие программы и что является причиной перехода патогенов к агрессивному «поведению», является важной научной задачей, решение которой, во-первых, позволит приблизиться к пониманию того, как устроены и как функционируют естественные «надорганизменные» системы, и, во-вторых, сформирует теоретические предпосылки для разработки способов контроля бактериозов растений не за счет уничтожения патогенного организма, а посредством контролируемого сдерживания его патогенного потенциала и снижения вредоносности.

Традиционные «жесткие» подходы к фитопатогенам, связанные с применением бактерицидных препаратов и внедрением в растительные геномы генов устойчивости, продукты которых убивают микроорганизм в случае его проникновения в растение, имеют важный недостаток. Перечисленные приемы оказывают селективное давление на популяцию микроорганизмов, что со временем приводит к появлению новых высокоагрессивных генетических разновидностей патогенов, наносящих значительный ущерб сельскому хозяйству. В основе альтернативного, более «деликатного» подхода, связанного с экзогенным контролем состояния «надорганизменной» системы, лежит не губительное воздействие на микроорганизм, а направленное подавление развития патологий, то есть ограничение патогена в рамках латентных инфекций. Следовательно, такой способ предотвращения развития патологий не должен приводить к селекции новых вредоносных штаммов, поскольку не подразумевает формирования преграды для бессимптомного взаимодействия организмов в рамках интегрированной «надорганизменной системы». По всей видимости, именно по такому принципу в процессе эволюции и развивались естественные растительно-микробные патосистемы, что привело к мирному сожительству макро- и микроорганизмов.

Основным препятствием для скорого внедрения такого подхода в сельскохозяйственную практику является недостаток фундаментальных знаний о молекулярных механизмах развития бактериозов растений, и в особенности о параметрах, определяющих конкретный сценарий взаимодействия организмов (патологический или бессимптомный). Уже само присутствие патогена (даже в отсутствие симптомов заболевания) на сегодняшний день объективно считается большим риском, поскольку в любой момент латентная инфекция может перейти в острую фазу и привести к серьезным последствиям. Выяснение того, каким образом можно надежно и эффективно препятствовать такому переходу, станет ценной предпосылкой для модернизации способов предотвращения ущерба, наносимого фитопатогенными бактериями.

Таблица 2.1. Бактериозы растений, распространенные на территории Российской Федерации.

Бактериозы	Возбудители	Растения-хозяева	Распространение в Российской Федерации
Черная ножка и мягкая гниль картофеля	<i>Pectobacterium carotovorum</i> , <i>P. atrosepticum</i> , <i>Dickeya solani</i> , <i>D. dianthicola</i>	Пасленовые, топинамбур, морковь, декоративные культуры	Центрально-европейская часть Российской Федерации, юг Западной Сибири
Бактериальный рак	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	Пасленовые	Центрально-европейская часть Российской Федерации, юг Западной и Восточной Сибири, Дальнего Востока
Кольцевая гниль картофеля	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	Картофель	Повсеместно в зонах выращивания картофеля
Черная бактериальная пятнистость	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Пасленовые	Повсеместно в зонах выращивания культур
Сердцевинный некроз стеблей томата	<i>Pseudomonas corrugata</i>	Томат	Ленинградская, Кемеровская, Саратовская, Волгоградская, Московская, Вологодская области, Татарстан
Бактериальный ожог пшеницы, базальный ожог ячменя	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	Зерновые	Повсеместно в зонах выращивания зерновых
Бактериальная корневая гниль	<i>Pseudomonas marginalis</i>	Зерновые	Центрально-европейская часть Российской Федерации
Бактериальная пятнистость листьев, гниль стеблей и плодов	<i>Pantoea ananatis</i>	Злаковые, овощные культуры	Центрально-европейская часть Российской Федерации
Бактериальный ожог плодовых	<i>Erwinia amylovora</i>	Плодовые деревья (яблоня, вишня, слива и др.)	Центрально-европейская часть Российской Федерации, юг Западной Сибири
Бактериальный рак косточковых	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>morsprunorum</i>	Плодовые деревья (яблоня, вишня, слива и др.)	Повсеместно в зонах выращивания культур
Бактериальная пятнистость	<i>Xanthomonas arboricola</i>	Розоцветные, злаковые, крестоцветные, ореховые	Повсеместно в зонах выращивания культур
Корневой рак плодовых	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Плодовые, технические, декоративные культуры	Повсеместно в зонах выращивания культур
Черный бактериоз	<i>Xanthomonas translucens</i>	Злаковые	Повсеместно в зонах выращивания культур

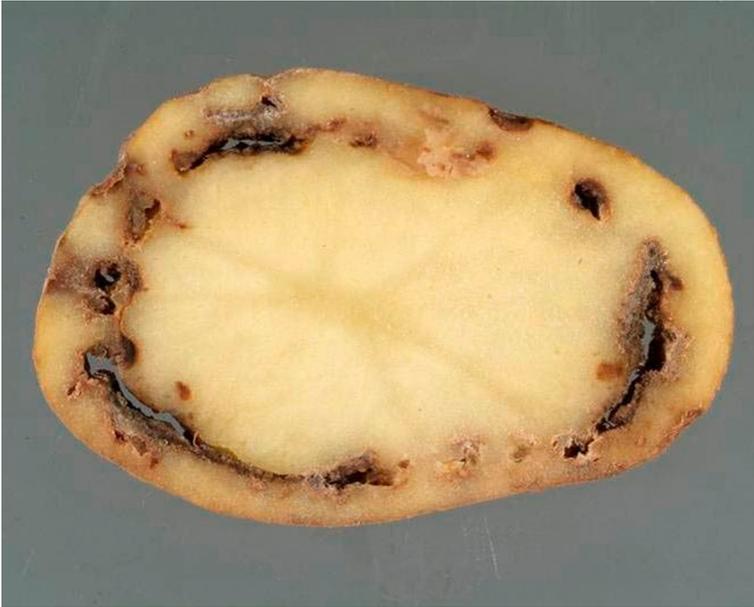


Рис. 2.1. Кольцевая гниль картофеля, вызываемая *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (<http://www.agroatlas.ru>).



Рис. 2.2. Мягкая гниль и черная ножка картофеля, вызываемые представителями родов *Pectobacterium* и *Dickeya* (<http://www.agroatlas.ru>; <https://www.manitobacooperator.ca/news-opinion/news/use-only-local-seed-potatoes-to-slow-dickeya-other-pathogens>).



Рис. 2.3. Бурая гниль картофеля, вызываемая *Ralstonia solanacearum* (http://www.agroatlas.ru/ru/content/diseases/Solani/Solani_Ralstonia_solanacearum/index.html).



Рис. 2.4. Сосудистый бактериоз капусты, вызываемый *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (<http://floweryvale.ru/diseases-and-pests/cabbage-disease.html>; http://mtvernon.wsu.edu/path_team/DiseaseGallery/black-rot-5.htm).



Рис. 2.5. Черная бактериальная пятнистость томата, вызываемая *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (<http://www.tomatosite.ru/chernayabakpyat.html>; http://www.agrodiagnostica.ru/docsandinstructions/articles/articles_9.html).



Рис. 2.6. Бактериальный рак томатов, вызываемый *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (<https://gd.eppo.int/taxon/CORBMI/photos>; http://plantpath.ifas.ufl.edu/u-scout/ Tomato/Pages/Bacterial_canker.html#5).



Рис. 2.7. Сердцевинный некроз томата, вызываемый *Pseudomonas corrugata* (http://www.agrodiagnostica.ru/docsandinstructions/articles/articles_9.html).

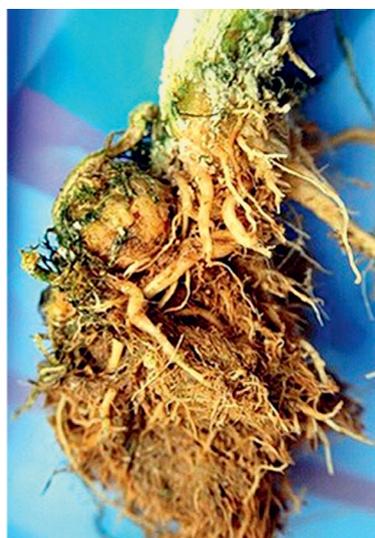


Рис. 2.8. Опухоли виноградной лозы (слева) и огурца (справа), вызываемые *Agrobacterium* sp. (<http://www.agroatlas.ru>; <http://rusteplika.ru>).



Рис. 2.9. Бактериальный ожог плодовых, вызываемый *Erwinia amylovora* (<http://www.bio.bsu.by>; <http://www.asprus.ru>).



Рис. 2.10. Базальный бактериоз кукурузы (слева) и пшеницы (справа), вызываемый *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* и *P. syringae* pv. *atrofaciens* (<https://cropwatch.unl.edu/2017/crop-diseases-confirmed-plant-pest-lab-june-15-27>; <http://www.zerno-ua.com/journals/2011/fevral-2011-god/bakterialnye-bolezni-pshenicy>).



Рис. 2.11. Черный бактериоз пшеницы, вызываемый *Xanthomonas translucens* (<http://wheat.lsu.edu/pestpics.shtml>).



Рис. 2.12. Заболевания кукурузы (слева) и лука (справа), вызываемые *Pantoea ananatis* (<http://kchr.pl/art/49/pantoea-ananatis-plamistosc-lisci-kukurydzy-ang-leaf-spot-disease>; http://msue.anr.msu.edu/news/newly_identified_bacterial_disease_on_onions).

Литература:

- Бурдинская, В. Ф., & Арестова, Н. О. (2010). Бактериозы виноградной лозы. *Защита и карантин растений*, 6, 49–52.
- Говоров, Д. Н., Живых, А. В., Новоселов, Е. С., & Голиков, А. Г. (2015). Мониторинг бактериальных и вирусных болезней сельскохозяйственных культур. *Защита и карантин растений*, 7, 35–38.
- Дементьева, М. И. (1988). Болезни плодов, овощей и картофеля при хранении. Москва. Изд-во Рипол Классик.
- Дякунчак, С. А., Королева, С. В., & Юрченко, С. А. (2017). Создание линий капусты белокочанной, устойчивых к сосудистому бактериозу. *Рисоводство*, 2, 60–64.
- Ерохова, М. Д., & Дренова, Н. В. (2014). Черная ножка — опасное заболевание картофеля. *Защита и карантин растений*, 7, 28–30.
- Захаренко, В. А. (2015). Биотехнологии и защита растений. *Защита и карантин растений*, 11, 3–6.
- Игнатов, А. Н., Карлов, А. Н., Джалилов, Ф. С., Карандашов, А., Князькина, М., Корнев, К., & Пехтерева, Э. (2014). Распространение в России черной ножки картофеля, вызываемой бактериями р. *Dickeya*. *Защита и карантин растений*, 11, 41–43.
- Игнатов, А. Н., Егорова, М. С., & Ходыкина, М. В. (2015). Распространение бактериальных и фитоплазменных болезней растений в России. *Защита и карантин растений*, 5, 6–9.
- Карлов, А. Н., Зотов, В. С., Пехтерева, Э. Ш., Матвеева, Е. В., Джалилов, Ф. С. У., Фесенко, И. А., & Карлов, Г. И. (2010). *Dickeya dianthicola* — новый для России бактериальный патоген картофеля. *Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии*, 3, 134–141.
- Карлов, А. Н., Игнатов, А. Н., Карлов, Г. И., Пехтерева, Э. Ш., Матвеева, Е. В., Шаад, Н., & Варицев, Ю. А. (2011). Диагностика бактериального патогена картофеля *Dickeya dianthicola*. *Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии*, 3, 38–48.
- Колесова, Д. А. (2014). Корневой рак *Agrobacterium tumefaciens* (Smith and Townsend) Conn. и косматый корень *A. rhizogenes* (Riker et al.) плодовых деревьев в Центральном Нечерноземье России. *Защита картофеля*, 2, 61–63.
- Корнев, К. П., Матвеева, Е. В., Пехтерева, Э. Ш., Политыко, В. А., Игнатов, А. Н., & Пунина, Н. В. (2010). Черная бактериальная пятнистость томатов в России. *Защита и карантин растений*, 5, 48–49.
- Котляров, В. В., Дьяченко, А. А., & Котляров, Д. В. (2006). Влияние бактериозов на качество зерна озимой пшеницы. *Защита и карантин растений*, 12, 25–26.
- Котляров, В. В. (2008). Бактериальные болезни культурных растений. Краснодар, Изд-во Кубанского ГАУ.
- Лазарев, А. М., & Борисова, И. П. (2010). Бактериальные болезни картофеля: диагностика и меры борьбы. *Сельскохозяйственные вести*, 4, 22–24.

Лазарев, А. М. (2013). Новый возбудитель бактериоза картофеля атакует российские поля. *Защита и карантин растений*, 6, 11–15.

Лазарев, А. М., Мысник, Е. Н., Игнатов, А. Н. (2017). Ареал и зона вредоносности сердцевинного некроза томата. *Вестник защиты растений*, 2(92), 59–61.

Магомедов, У. Ш., Миронова М. К., Яковлева, В. А. (2015). Анализ фитосанитарного риска и категоризация вредных организмов. *Карантин растений. Наука и практика*, 2(12), 8–16.

Матвеева, Е. В., Политыко, В. А., & Игнатов, А. Н. (2006). Черный бактериоз зерновых культур: фенотипическая и молекулярная характеристика российских штаммов *Xanthomonas translucens*. *Агро XXI*, 10–12, 27–30.

Национальный доклад о карантинном фитосанитарном состоянии территории РФ в 2016 г. *Карантин и защита растений*, 2(20), 2–11.

Пасичник, Л. А., Савенко, Е. А., Буценко, Л. Н., Патыка, В. Ф., & Калининченко, А. В. (2014). *Pseudomonas syringae* в агрофитоценозе пшеницы. *Наука и Мир*, 1(4), 52–56.

Пилипова, Ю. В., & Шалдяева, Е. М. (2016). Обоснование концептуальной схемы управления фитосанитарным состоянием агроэкосистем картофеля. *Вестник НГАУ*, 4(41), 19–25.

Санин, С. С. (2016). Проблемы фитосанитарии России на современном этапе. *Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии*, 6, 45–55.

Харламов Д., Игнатов, А. (2001). Наследование устойчивости к сосудистому бактериозу и листовой пятнистости у самонесовместимых линий брокколи. *Сельскохозяйственная биология*, 5, 50–55.

Шнейдер, Е. Ю. (2009). Анализ фитосанитарного риска возбудителя бактериального ожога плодовых *Erwinia amylovora* (Burrill) (Winslow et al.) для территории Российской Федерации. ФГУ ВНИИКР.

Coutinho, T. A., & Venter, S. N. (2009). *Pantoea ananatis*: an unconventional plant pathogen. *Molecular Plant Pathology*, 10(3), 325–335.

Toth, I. K., Van Der Wolf, J. M., Sadder, G., Lojkowska, E., Hélias, V., Pirhonen, M., & Elphinstone, J. G. (2011). *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe. *Plant Pathology*, 60(3), 385–399.

ФАКТОРЫ ВИРУЛЕНТНОСТИ ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ

3.1. Ферменты, разрушающие компоненты растительных клеточных стенок

Пожалуй, ключевая особенность стратегии взаимодействия фитопатогенов с растениями, по сравнению с тактикой, применяемой патогенами, колонизирующими животный организм, связана с наличием у растительных клеток дополнительного, очень мощного и динамичного клеточного компартмента — растительной клеточной стенки (РКС). Эта особенность заключается в применении большого арсенала секретируемых за пределы бактериальной клетки ферментов, разрушающих различные полимеры РКС, в первую очередь полисахариды. Благодаря этому микроорганизмы, во-первых, способны «разрыхлять» РКС для перемещения внутри растительных тканей и, во-вторых, получать питательный субстрат в виде низкомолекулярных углеводов, которые «скрыты» в составе массивных полисахаридных цепей.

Большое разнообразие у фитопатогенов ферментов, разрушающих компоненты РКС, связано с колоссальной гетерогенностью полисахаридов, которая определяется следующими основными причинами (Горшкова, 2007). Во-первых, существует около десятка разнообразных «базовых конструкций» полисахаридов РКС — характерных остовов, различающихся набором моносахаридов и/или характером их связей между собой (Горшкова с соавт., 2013). Например, β -1,4-связанные остатки глюкозы — это «строительная» основа целлюлозы и ксилоглюкана, а β -1,4-связанные остатки ксилозы формируют остовы ксиланов (Fry, 1988; Carpita, Gibeaut, 1993; Brett, Waldron, 1996). Во-вторых, к остовам могут быть присоединены боковые цепи, варьирующие по составу, длине, наличию включений из «нехарактерных» моносахаридов; различаться может и характер распределения боковых цепей по остову молекулы. В-третьих, две молекулы одного и того же типа полисахарида могут различаться по наличию и расположению модифицирующих групп, среди которых наиболее распространены метоксильные и ацетильные; эти группы могут существенно изменять доступность полимера для действия ферментов, а также сами служить мишенью для определенных ферментов (пектинметилэстеразы). В-четвертых, нематричный характер синтеза сложных полисахаридов приводит к их микрогетерогенности и неидентичности молекул одного и того же типа полисахарида, которые могут различаться в некоторых пределах по количественным параметрам, например, таким как молекулярная масса, длина цепей, число замещений остова или модифицирующих групп на макромолекулу (Бочков с соавт., 1980). Каждый фермент, в свою очередь, имеет достаточно узкую специфичность; поэтому для разрушения даже

одного типа полимеров может потребоваться несколько, а то и десятки разных ферментов.

Бактериальные ферменты, разрушающие полисахариды РКС, относятся к нескольким классам: гликозил-гидролазы, полисахарид-лиазы, углевод-эстеразы (Jayani et al., 2005; Наумов, 2011; Saritha et al., 2016). Первые два типа ферментов могут обладать либо экзо-, либо эндоактивностью. В случае экзоактивности ферменты способны отщеплять от цепи полисахарида только концевые единичные моносахариды (иногда дисахариды), эндоферменты разрушают гликозидные связи на расстоянии не менее двух моносахаридных остатков от концов молекулы полимера. Экзоферменты, относящиеся к гликозил-гидролазам, могут отщеплять моносахарид как с восстанавливающего конца (такие ферменты наиболее распространены и называются гликозидазами), так и с невосстанавливающего конца (экзогликаназы). Подробная информация о различных классах ферментов, активных в отношении полисахаридов, представлена в базе данных CAZy (Carbohydrate-Active enZYmes Database, www.cazy.org).

Гликозил-гидролазы разрушают гликозидную связь путем присоединения молекул воды (Henrissat, Davies, 1997), а полисахарид-лиазы — негидролитическим путем, без участия молекул воды, за счет реакции β -элиминирования; характерной чертой такого расщепления служит образование ненасыщенного остатка уроновой кислоты с невосстанавливающего конца получившегося фрагмента полимера (Moran et al., 1968; Linhardt et al., 1987) (рис. 3.1.1).

Углевод-эстеразы осуществляют деэстерификацию полисахаридов (отщепление метоксильных и ацетильных групп) (рис. 3.1.1). Хотя эстеразы не являются деполимеразами полисахаридов, эти ферменты вносят значительный вклад в расщепление этих полимеров. Доступность полисахаридов для бактериальных деполимераз (гидролазы и лиазы) часто зависит от степени метилирования/ацетилирования полисахаридов РКС (Tardy et al., 1997; Pawar et al., 2013). При этом значение имеет не только общая степень метоксилирования или ацетилирования, но и характер расположения модифицирующих групп на углеводных остатках молекулы, который может быть беспорядочным или блочным (Горшкова, 2007). Отщепление модифицирующих групп под действием эстераз может как способствовать увеличению эффективности работы деполимераз, так и, наоборот, препятствовать гидролизу полисахарида. Так, например, ферментативное удаление ацетильных групп повышает эффективность гидролиза лигноцеллюлозной биомассы β -ксилозидазами, β -маннозидазами и β -глюкозидазами (Pawar et al., 2013), а деацетилирование пектинов, наоборот, может предотвращать разрушение этих полисахаридов некоторыми пектиназами (Gou et al., 2012). В то же время эффективность отщепления модифицирующих групп эстеразами может повышаться благодаря действию деполимераз. Это, в частности, было продемонстрировано на примере пектинацетилэстеразы *Erwinia chrysanthemi* (*Dickeya dadantii*), «предпочитающей» в качестве субстрата деполимеризованные и деметилированные фрагменты пектинов (Shevchik, Hugouvieux-Cotte-Pattat, 2003).

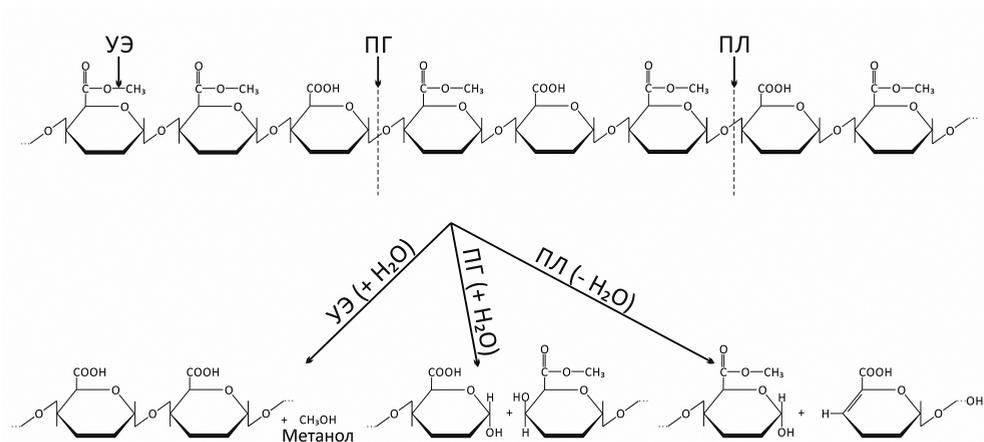


Рис. 3.1.1. Схема разрушения гомогалактуронана тремя типами ферментов: углевод-эстеразой (УЭ), полигалактуроназой (ПГ), пектинлиазой (ПЛ) (по: Agrios, 2005). Углевод-эстераза и полигалактуроназа катализируют гидролитическое расщепление (+H₂O) связей, тогда как пектинлиаза — негидролитическое (-H₂O) посредством реакции транс-элиминирования. Стрелка указывает сайт, в котором происходит расщепление гликозидной или эфирной связи.

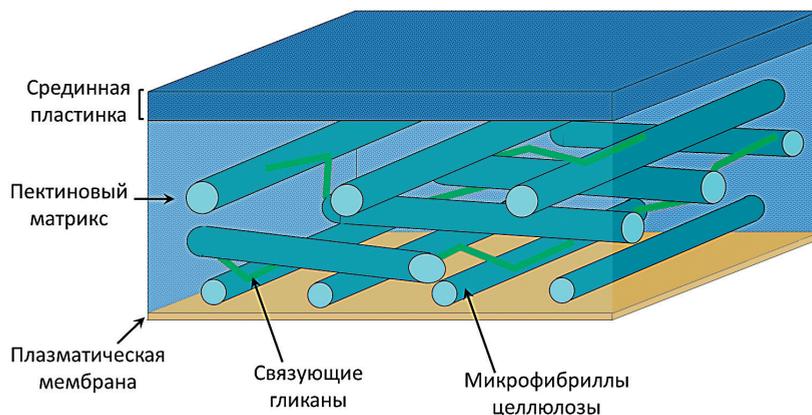


Рис. 3.1.2. Пространственная организация полисахаридов в растительной клеточной стенке.

Полисахариды РКС принято разделять на три основных типа: целлюлоза, связующие гликаны, иногда называемые гемицеллюлозами, и пектиновые вещества (рис. 3.1.2). Каждый тип полисахаридов разрушается определенной группой ферментов.

Бактериальные ферменты, разрушающие целлюлозу

Целлюлоза является доминирующим по содержанию компонентом в РКС. С одной стороны, этот полимер достаточно простой: он состоит из одного типа мономеров (остатки глюкозы), соединенных одним типом связи (β -1,4). С другой стороны, из-за высокой степени полимеризации и особой надмолекулярной структуры целлюлозы этот полимер трудно назвать простым. Степень его полимеризации часто превышает 10 тысяч мономеров (Hon, Shiraishi, 1991), т. е. молекулярная масса может составлять примерно 2 млн дальтон. Биосинтез целлюлозы осуществляется мультиферментными целлюлозосинтазными комплексами (Pear et al., 1996; Kimura et al., 1999; Saxena, Brown, 2000, 2005; Somerville et al., 2004), расположенными на плазмалемме, благодаря чему исключается этап секреции этого гигантского полисахарида (почти все остальные полисахариды клеточной стенки синтезируются в аппарате Гольджи и секретируются с помощью отшнуровывающихся от него везикул). За пределами плазмалеммы несколько десятков цепей β -1,4-глюкана, удлиняющихся при участии соответствующего числа субъединиц целлюлозосинтазы, объединяются между собой в микрофибриллу. При формировании микрофибриллы могут возникать кристаллические участки (O'Sullivan, 1997), в которых молекулы целлюлозы упакованы столь плотно, что даже сравнительно небольшие молекулы, например, такие как вода, не могут в них проникнуть. Такая организация целлюлозы крайне затрудняет ферментативный гидролиз этого полисахарида (Arantes, Saddler, 2010).

Несмотря на то, что отдельные цепи β -1,4-связанной глюкозы могут разрушаться довольно большой группой ферментов, разрушение микрофибрилл целлюлозы — это удел «избранных» ферментов, которые называются целлюлазами и состоят фактически из нескольких типов гидролаз, работающих согласованно (Sadhu, Maiti, 2013; Fariq, 2016). Целлюлазы включают в себя четыре типа ферментов, действующих совместно: 1) эндо- β -1,4-глюканазы, неупорядоченно гидролизующие в целлюлозе β -1,4-связи, приводя к образованию целлоолигосахаридов, глюкозы и целлотриозы (трисахарид из трех остатков глюкозы); 2) экзо- β -1,4-глюканазы — целлобиогидролазы, отщепляющие целлобиозу (дисахарид из двух остатков глюкозы) или глюкозу с невозстанавливающимися концами целлоолигосахаридов; 3) экзо- β -1,4-глюкозидазы, отщепляющие единичные глюкозные остатки с восстанавливающимися концами полисахаридных цепей, и 4) целлобиазы, расщепляющие дисахарид на две молекулы β -D-глюкозы (Левина с соавт., 2016). Считается, что в обеспечении доступности молекул целлюлозы для гидролитических ферментов существенную роль играют экспансины — белки, которые сами не обладают ферментативной активностью, но имеют специальный углеводсвязывающий домен и способны нарушать водородные связи между молекулами целлюлозы (McQueen-Masson, Cosgrove, 1995; Cosgrove, 2000). Показано, что экспансины бактерий увеличивают эффективность ферментативного гидролиза целлюлозы (Kerff et al., 2008).

Бактериальные ферменты, разрушающие связующие гликаны

Микрофибриллы целлюлозы в рамках сложной надмолекулярной структуры РКС «сшиваются» между собой при помощи связующих гликанов (Carpita, Gibeaut, 1993; Горшкова, 2007). Сшивка при этом происходит благодаря образованию водородных связей между микрофибриллами целлюлозы и связующими гликанами (рис. 3.1.2). Этот «альянс» динамичен, и его «крепость» четко регулируется соответствующими ферментами исходя из потребности клетки. Так, в ходе роста растяжением происходит модификация связующих гликанов (их гидролиз, трансгликозилирование), в результате чего водородные связи между ними и микрофибриллами целлюлозы ослабевают и создаются условия для расхождения микрофибрилл целлюлозы. Такой эффект может достигаться и при участии экспансинов. Подобный способ разрыхления РКС используют и фитопатогены, синтезируя гидролитические ферменты, разрушающие связующие гликаны, а также продуцируя экспансин-подобные белки. По всей вероятности, это позволяет формировать в РКС поры для эффективного перемещения бактериальных клеток по этому клеточному компартменту. Еще один способ обеспечения расхождения микрофибрилл целлюлозы в растительных тканях связан с трансгликозилированием связующих гликанов, осуществляемым с помощью растительных ферментов ксилоглюканэндотрансгликозилаз (ХЕТ/ХТН); однако такие ферменты и гены, которые могли бы их кодировать, у фитопатогенных бактерий не описаны.

Связующие гликаны представлены несколькими группами полимеров. Доминирующим связующим гликаном первичных РКС двудольных растений является ксилоглюкан — разветвленный гетерополимер, остов которого состоит из остатков глюкозы, а боковые цепи нескольких типов включают, главным образом, остатки ксилозы, а также могут содержать остатки галактозы, фукозы и арабинозы (O'Neill, York, 2003). Среди гемицеллюлоз первичной клеточной стенки злаков представлены глюкан со смешанным типом связей и глюкуроноарабиноксилан, остов которого состоит из остатков ксилозы, а боковые цепи включают остатки арабинозы и/или глюкуроновой кислоты (Darvill et al., 1980; Carpita, 1996). Ксиланы служат также ключевыми связующими гликанами утолщенных вторичных РКС (Ebringerova, Heinze, 2000). Кроме этого, среди гемицеллюлоз описаны маннозо-содержащие полисахариды — маннаны, остов которых построен из остатков маннозы, а также глюкоманнаны и галактоглюкоманнаны, остов которых содержит чередующиеся остатки маннозы и глюкозы (Stephen, 1983). Эти полисахариды — характерный компонент клеточных стенок пасленовых и голосеменных.

Описана большая группа растительных ферментов, участвующих в модификации различных типов связующих гликанов (www.cazy.org). Ферментами, разрушающими эти полисахариды, «вооружены» и фитопатогенные бактерии. У ксантомонад (*Xanthomonas campestris*) охарактеризована ксилоглюкан-специфичная эндоглюканаза (de Araújo et al., 2013; Feng et al., 2014). Кроме того, в геномах многих фитопатогенных бактерий есть гены, аннотированные как кодирующие эндо- β -1,4-глюканазы, которые, вероятно, могут разрушать ксилоглюкан; однако экспериментального подтверждения этого пока получено не было.

Разрушение ксиланов может происходить посредством разных экзо- и эндоферментов (Beg et al., 2001; Collins et al., 2005; Walia et al., 2017). Эндо- β -1,4-ксилаза и экзо- β -ксилозидаза расщепляют остовы ксиланов, а боковые цепи могут отщепляться при участии экзоферментов β -ксилозидаз и α -арабинофуранозидаз. Эти ферменты широко описаны на примере ксилолитических грибов (Driss et al., 2012), но на примере фитопатогенных бактерий экспериментально охарактеризовано лишь два фермента: β -глюкозидаза/ксилозидаза *Erwinia chrysanthemi* (*Dickeya dadantii*) и ксиланаза *Xanthomonas oryzae* (Vroemen et al., 1995; Rajeshwari et al., 2005). Тем не менее в геномах многих фитопатогенных бактерий есть гены, схожие с генами, кодирующими ферменты деградации ксиланов.

Глюкан со смешанным типом связей гидролизуют β -1,3;1,4-глюканазы, больше известные как лихеназы (Barras, Stone, 1969), поскольку одним из описанных субстратов для этих ферментов является лишайнин (β -1,3;1,4-глюкан, содержащийся в лишайниках). Бактериальные лихеназы способны разрушать β -1,3;1,4-глюканы, которые составляют основную массу клеточной стенки эндосперма семян злаковых (Planas, 2000). Интересно, что лихеназы, продуцируемые растениями и микроорганизмами (грибами и бактериями), кардинально различаются аминокислотными последовательностями и трехмерной структурой (даже относятся к разным семействам гликозил-гидролаз), что можно расценивать как пример конвергентной эволюции ферментов в отношении одного и того же субстрата (Planas, 2000).

Бактериальные ферменты, разрушающие пектиновые вещества

Наиболее исследованными факторами вирулентности фитопатогенных бактерий являются ферменты, разрушающие пектиновые полисахариды (Pérombelon, 2002; Toth et al., 2003; Jayani et al., 2005; Álvarez et al., 2010; Chalupowicz et al., 2017). Пектины в РКС выполняют функцию матрикса, в который погружен целлюлозный каркас (McCann, Roberts, 1991; Carpita, Gibeau, 1993), а также являются основным компонентом срединной пластинки, обеспечивающей «склеивание» соседних растительных клеток (Caffall, Mohnen, 2009). Часто наблюдаемые симптомы мацерации растительных тканей при патогенезе как раз сопряжены с разрушением пектинов срединной пластинки, что приводит к «отклеиванию» клеток друг от друга и образованию из структурированной ткани бесформенной массы. Разрушение компонентов именно срединной пластинки происходит, по-видимому, вследствие того, что большинство фитопатогенов не проникает внутрь протопласта растений (в частности, из-за сложности расщепления целлюлозы), а живет в апопласте и распространяется по растению, разрушая срединную пластинку. Ферменты, расщепляющие пектиновые полисахариды, описаны практически для всех фитопатогенных бактерий; однако их разнообразие и уровень продукции могут значительно различаться в зависимости от видовой принадлежности патогена, и в первую очередь от типа его трофности. Биотрофные патогены, «мягко» воздействующие на растительный организм, продуцируют значительно меньше деполимераз пектиновых веществ по сравнению с некротрофами, применяющими тактику «грубой силы» (Agrios, 2005).

Пектиновые полисахариды, всегда имеющие в составе остатки α -1,4-связанной галактуроновой кислоты, подразделяют на три основных типа: гомогалактуронан (полигалактуроновая кислота), рамногалактуронан I и рамногалактуронан II (Ridley et al., 2001; Caffall, Mohnen, 2009; Оводов, 2009). Гомогалактуронан составляет основную массу (до 90%) пектиновых полисахаридов. Этот линейный гомополимер состоит из остатков галактуроновой кислоты. Варибельность его структуры обеспечивается различной степенью полимеризации и особенностями метилирования/ацетилирования. Именно этот пектиновый полисахарид является основной мишенью для большинства фитопатогенов (Barras et al., 1994). Его разрушение осуществляется эндо- и экзоферментами, относящимися к гликозил-гидролазам (полигалактуроноза), лиазам (пектат/пектинлиаза) и эстеразам (пектинметил/пектинацетилэстеразы) (Jayani et al., 2005). Разные ферменты могут проявлять специфичность к тому или иному варианту гомогалактуронана. Так, например, пектинлиазы расщепляют только метилированный гомогалактуронан, в то время как для активности пектатлиаз степень метилирования полимера не имеет значения (Bonnin et al., 2009). Рамногалактуронан I, несмотря на его низкое по сравнению с полигалактуроновой кислотой содержание, также активно разрушается некоторыми фитопатогенными бактериями при колонизации растений. Рамногалактуронан I — это разветвленный гетерополимер, остов которого состоит из чередующихся остатков рамнозы и галактуроновой кислоты (Lau et al., 1985). Боковые цепи этого полимера, присоединяющиеся к остаткам рамнозы, представлены, главным образом, остатками галактозы или арабинозы и могут состоять как из единичных моносахаридных остатков, так и быть достаточно протяженными (до нескольких десятков мономеров) (Ridley et al., 2001; Caffall, Mohnen, 2009; Яро, 2011). Варибельность структуры этого полимера связана с разной степенью его полимеризации, а также типом, характером распределения по остову и протяженностью боковых цепей (Яро, 2011; Микшина с соавт., 2015).

Ферменты, расщепляющие остов рамногалактуронана I (гидролазы и лиазы), и гены, их кодирующие, описаны только на примере некротрофных фитопатогенных бактерий; у биотрофов эти ферменты (и соответствующие им гены) не обнаружены. Этот факт можно объяснить различиями в упомянутых выше стратегиях «мягкой и грубой силы», применяемых биотрофами и некротрофами соответственно. Так, некротрофы нацелены на максимально возможное использование питательного субстрата, заключенного в полимеры РКС, и поэтому спектр разрушаемых ими полисахаридов (а как следствие, и спектр ферментов) шире, чем у биотрофов. Поскольку рамногалактуронан I может выполнять важную структурную функцию в РКС, то его разрушение при патогенезе может интенсифицировать процесс мацерации тканей и распространение патогена, чего и «добиваются» некротрофы при колонизации растений. Кроме того, некротрофные пектобактерии (*Pectobacterium atrosepticum*) используют фрагменты этого полимера в качестве экстраклеточного матрикса при колонизации сосудов ксилемы, где микроорганизмы формируют особые «многоклеточные» структуры — бактериальные эмболы (Gorshkov et al., 2014, 2016).

Расщепление боковых цепей рамногалактуронана I, по всей вероятности, также происходит в ходе инфекции. У фитопатогенных микроорганизмов есть ряд ферментов, аннотированных как галактаназы, галактозидазы, арабиназы, арабинозидазы, которые предположительно способны расщеплять гликозидные связи в боковых цепях этого полимера (Silva et al., 2016). Интересно, что «отключение» гена, кодирующего галактаназу (предположительно разрушающую боковые цепи рамногалактуронана I), в большей степени сказывалось на вирулентности *Pectobacterium atrosepticum*, чем мутация по гену фермента, расщепляющего остов этого полимера (рамногалактуронилгидролаза) (Ковтунов с соавт., 2018). Это свидетельствует о том, что модификация боковых цепей рамногалактуронана I важна для интенсивного развития гнилостных процессов в растениях.

Рамногалактуронан II по разнообразию мономеров (12 разных) и типов связей между ними представляет собой самый сложный из известных в живых организмах полисахаридов. Хотя он состоит всего из 60 моносахаридных остатков, количество разнообразных типов связей между ними составляет 20 (Darvill et al., 1978). Структура рамногалактуронана II исключительно консервативна и, несмотря на ее сложность, практически не различается у разных видов растений и в различных тканях (Matsunaga et al., 2004). Ферменты, разрушающие этот полимер, для фитопатогенных бактерий пока не описаны.

Для использования в качестве питательного субстрата продукты распада сложных углеводов должны транспортироваться в цитоплазму бактерий. Этот процесс осуществляется в несколько этапов. После деполимеризации сложных углеводов ферментами, секретируемыми бактериями, образованные олигосахариды доставляются в периплазматическое пространство с помощью специальных переносчиков. Мутантные бактерии, дефектные по генам таких переносчиков, не способны использовать в качестве питательного субстрата фрагменты полигалактуронана со степенью полимеризации более трех моносахаридных остатков (Blot et al., 2002). В периплазме олигосахариды расщепляются периплазматическими ферментами (в основном экзоферментами) до ди- и тримеров. Затем эти низкомолекулярные олигосахариды переносятся в цитоплазму и окисляются в процессе дыхания (Salmond, 1994; Lory, 1998; Corbett et al., 2005; Davidsson et al., 2013).

Помимо деполимераз полисахаридов и углеводов-эстераз, к бактериальным ферментам, разрушающим компоненты РКС, также относят протеазы. Поскольку эти ферменты доставляются из бактериальных клеток в апопласт, очевидно, что их мишенями являются белки РКС. Хотя экстраклеточные протеазы (или кодирующие их гены) обнаружены практически у всех известных фитопатогенных бактерий, мишени этих ферментов выявлены лишь для нескольких представителей. У *Erwinia carotovora* (*Pectobacterium carotovorum*) секретируемые протеазы разрушают гликопротеины — лектины, которые, по всей видимости, выполняют сигнальную функцию при активации защитного ответа (Marits et al., 1999). Протеазы *Xanthomonas campestris* разрушают гидроксипролин-богатые белки и в том числе экстенсины (Dow et al., 1998). Последние являются структурными компонентами РКС и, благодаря наличию в составе большого количества ароматических

аминокислот, способны формировать связи с лигнином и полисахаридами РКС (Cooper et al., 1987). Благодаря этому экстенсины обеспечивают сшивку разных полимеров, что приводит к увеличению барьерных свойств РКС. В свою очередь, протеазы, секретируемые бактериями и разрушающие экстенсины, позволяют предотвратить патоген-индуцируемое укрепление РКС. Лектины и гидроксипролин-богатые белки могут участвовать в агглютинации клеток микроорганизмов (склеивание, иммобилизация и последующий лизис) (Никитина с соавт., 2001), поэтому разрушение этих белков бактериальными протеазами может способствовать интенсивному размножению патогенов *in planta* и развитию инфекции.

Таким образом, разрушение полимеров РКС является одним из основополагающих аспектов жизни фитопатогенных бактерий внутри растений, который позволяет микроорганизмам как получать ростовой субстрат, так и эффективно распространяться по апопласту. Для этого фитопатогенные бактерии в ходе эволюции приобрели гены, кодирующие большое разнообразие ферментов, модифицирующих РКС.

Литература:

- Бочков, А. Ф., Афанасьев, В. А., Заиков, Г. Е. (1980). Углеводы. Москва. Изд-во Наука.
- Горшкова, Т. А. (2007). Растительная клеточная стенка как динамичная система. Москва. Изд-во Наука.
- Горшкова, Т. А., Козлова, Л. В., & Микшина, П. В. (2013). Пространственная структура полисахаридов растительных клеточных стенок и ее функциональная значимость (обзор). *Биохимия*, 78(7), 1068–1088.
- Ковтунов, Е. А., Горшков, В. Ю., Гоголева, Н. Е., Петрова, О. Е., Осипова, Е. В., Нуриахметова, Ч. Б., Гоголев, Ю. В. (2018). Ферменты деградации рамногалактуронана I как факторы вирулентности фитопатогенной бактерии *Pectobacterium atrosepticum*. *Сельскохозяйственная биология*, в печати.
- Левина, Е. А., Атыкян, Н. А., Ревин, В. В. (2016). Влияние источников углеродного и азотного питания на биосинтез целлюлаз грибами *Lentinus tigrinus* ВКМ F-3616 D и *Trichoderma viride* ВКМ F-1131. *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация*, 1, 85–93.
- Микшина, П. В., Петрова, А. А., Горшкова, Т. А. (2015). Функциональное разнообразие рамногалактуронанов I. *Известия академии наук. Серия химическая*, 5, 1014–1014.
- Наумов, Д. Г. (2011). Иерархическая классификация гликозил-гидролаз. *Биохимия*, 76(6), 764–781.
- Никитина, В. Е., Пономарева, Е. Г., Аленькина, С. А., Коннова, С. А. (2001). Участие бактериальных лектинов клеточной поверхности в агрегации азоспирилл. *Микробиология*, 70(4), 471.

Оводов, Ю. С. (2009). Современные представления о пектиновых веществах. *Биоорганическая химия*, 35(3), 293–310.

Agrios, G. N. (2005). *Plant Pathology*. 5th eds. Department of Plant Pathology. University of Florida. United States of America.

Álvarez, B., Biosca, E. G., & López, M. M. (2010). On the life of *Ralstonia solanacearum*, a destructive bacterial plant pathogen. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 1, 267–279.

Arantes, V., & Saddler, J. N. (2010). Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnology for Biofuels*, 3(1), 4.

Barras, D. R., & Stone, B. A. (1969). β -1,3-glucan hydrolases from *Euglena gracilis*: II. Purification and properties of the β -1,3-glucan exo-hydrolase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — Enzymology*, 191(2), 342–353.

Barras, F., van Gijsegem, F., & Chatterjee, A. K. (1994). Extracellular enzymes and pathogenesis of soft-rot *Erwinia*. *Annual Review of Phytopathology*, 32(1), 201–234.

Beg, Q., Kapoor, M., Mahajan, L., & Hoondal, G. S. (2001). Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(3–4), 326–338.

Blot, N., Berrier, C., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Ghazi, A., & Condemine, G. (2002). The oligogalacturonate-specific porin KdgM of *Erwinia chrysanthemi* belongs to a new porin family. *Journal of Biological Chemistry*, 277(10), 7936–7944.

Bonnin, E., Ralet, M. C., Thibault, J. F., & Schols, H. A. (2009). Enzymes for the valorisation of fruit-and vegetable-based co-products. *Handbook of Waste Management and Co-product Recovery in Food Processing*, 2, 257–285.

Brett, C. T., & Waldron, K. W. (1996). Physiology and biochemistry of plant cell walls (Vol. 2). *Topics in Plant Functional Biology*. Chapman and Hall, London.

Caffall, K. H., & Mohnen, D. (2009). The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 344(14), 1879–1900.

Carpita, N. C. (1996). Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. *Annual Review of Plant Biology*, 47(1), 445–476.

Carpita, N. C., & Gibeaut, D. M. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal*, 3(1), 1–30.

Chalupowicz, L., Barash, I., Reuven, M., Dror, O., Sharabani, G., Gartemann, K. H., ... & Manulis-Sasson, S. (2017). Differential contribution of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* virulence factors to systemic and local infection in tomato. *Molecular Plant Pathology*, 18(3), 336–346.

Collins, T., Gerday, C., & Feller, G. (2005). Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(1), 3–23.

Cooper, J. B., Chen, J. A., & Varner, J. E. (1987). Hydroxyproline-rich glycoproteins of plant cell walls. *Trends in Biochemical Sciences*, 12, 24–27.

Corbett, M., Virtue, S., Bell, K., Birch, P., Burr, T., Hyman, L., ... & Salmond, G. (2005). Identification of a new quorum-sensing-controlled virulence factor in *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* secreted via the type II targeting pathway. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18(4), 334–342.

Cosgrove, D. J. (2000). New genes and new biological roles for expansins. *Current Opinion in Plant Biology*, 3(1), 73–78.

Darvill, A. G., McNeil, M., & Albersheim, P. (1978). Structure of plant cell walls VIII. A new pectic polysaccharide. *Plant Physiology*, 62(3), 418–422.

Darvill, J. E., McNeil, M., Darvill, A. G., & Albersheim, P. (1980). Structure of plant cell walls: XI. Glucuronoarabinoxylan, a second hemicellulose in the primary cell wall of suspension-cultivated sycamore cells. *Plant Physiology*, 66(6), 1135.

Davidsson, P. R., Kariola, T., Niemi, O., & Palva, E. T. (2013). Pathogenicity of and plant immunity to soft rot pectobacteria. *Frontiers in Plant Science*, 4, 191.

de Araújo, E. A., Tomazini, A., Kadowaki, M. A. S., Murakami, M. T., & Polikarpov, I. (2013). Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a new xyloglucanase from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 69(6), 676–678.

Dow, J. M., Davies, H. A., & Daniels, M. J. (1998). A metalloprotease from *Xanthomonas campestris* that specifically degrades proline/hydroxyproline-rich glycoproteins of the plant extracellular matrix. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11(11), 1085–1093.

Driss, D., Bhiri, F., & Chaabouni, S. E. (2012). Cloning and constitutive expression of His-tagged xylanase GH 11 from *Penicillium occitanis* Pol6 in *Pichia pastoris* X33: purification and characterization. *Protein Expression and Purification*, 83(1), 8–14.

Ebringerova, A., & Heinze, T. (2000). Xylan and xylan derivatives — biopolymers with valuable properties, 1. Naturally occurring xylylans structures, isolation procedures and properties. *Macromolecular Rapid Communications*, 21(9), 542–556.

Fariq, A. (2016). Microbial cellulases: production and applications. *Journal of Biotechnology Science Research*, 3(1), 280696.

Feng, T., Yan, K. P., Mikkelsen, M. D., Meyer, A. S., Schols, H. A., Westereng, B., & Mikkelsen, J. D. (2014). Characterisation of a novel endo-xyloglucanase (XcXGHA) from *Xanthomonas* that accommodates a xylosyl-substituted glucose at subsite. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(23), 9667–9679.

Fry, S. C. (1988). *The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis*. John Wiley & Sons, New York, USA.

Gorshkov, V., Daminova, A., Ageeva, M., Petrova, O., Gogoleva, N., Tarasova, N., & Gogolev, Y. (2014). Dissociation of a population of *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 in tobacco plants: formation of bacterial emboli and dormant cells. *Protoplasma*, 251(3), 499–510.

Gorshkov, V. Y., Daminova, A. G., Mikshina, P. V., Petrova, O. E., Ageeva, M. V., Salnikov, V. V., ... & Gogolev, Y. V. (2016). Pathogen-induced conditioning of the primary xylem vessels — a prerequisite for the formation of bacterial emboli by *Pectobacterium atrosepticum*. *Plant Biology*, 18(4), 609–617.

Gou, J. Y., Miller, L. M., Hou, G., Yu, X. H., Chen, X. Y., & Liu, C. J. (2012). Acetyltransferase-mediated deacetylation of pectin impairs cell elongation, pollen germination, and plant reproduction. *The Plant Cell*, 24(1), 50–65.

Henrissat, B., & Davies, G. (1997). Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Current Opinion in Structural Biology*, 7(5), 637–644.

Hon, D. N. S., & Shiraishi, N. (2000). Wood and cellulosic chemistry, revised, and expanded. M. Dekker, New York, USA.

Jayani, R. S., Saxena, S., & Gupta, R. (2005). Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Process Biochemistry*, 40(9), 2931–2944.

Kerff, F., Amoroso, A., Herman, R., Sauvage, E., Petrella, S., Filée, P., ... & Cosgrove, D. J. (2008). Crystal structure and activity of *Bacillus subtilis* YoaJ (EXLX1), a bacterial expansin that promotes root colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(44), 16876–16881.

Kimura, S., Laosinchai, W., Itoh, T., Cui, X., Linder, C. R., & Brown, R. M. (1999). Immunogold labeling of rosette terminal cellulose-synthesizing complexes in the vascular plant *Vigna angularis*. *The Plant Cell*, 11(11), 2075–2085.

Lau, J. M., McNeil, M., Darvill, A. G., & Albersheim, P. (1985). Structure of the backbone of rhamnogalacturonan I, a pectic polysaccharide in the primary cell walls of plants. *Carbohydrate Research*, 137, 111–125.

Linhardt, R. J., Galliher, P. M., & Cooney, C. L. (1987). Polysaccharide lyases. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 12(2), 135–176.

Lory, S. (1998). Secretion of proteins and assembly of bacterial surface organelles: shared pathways of extracellular protein targeting. *Current Opinion in Microbiology*, 1(1), 27–35.

Marits, R., Kõiv, V., Laasik, E., & Mäe, A. (1999). Isolation of an extracellular protease gene of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* strain SCC3193 by transposon mutagenesis and the role of protease in phytopathogenicity. *Microbiology*, 145(8), 1959–1966.

Matsunaga, T., Ishii, T., Matsumoto, S., Higuchi, M., Darvill, A., Albersheim, P., & O'Neill, M. A. (2004). Occurrence of the primary cell wall polysaccharide rhamnogalacturonan II in pteridophytes, lycophytes, and bryophytes. Implications for the evolution of vascular plants. *Plant Physiology*, 134(1), 339–351.

McCann, M. C., & Roberts, K. (1991). Architecture of the primary cell wall. In: *The Cytoskeletal Basis of Plant Growth and Form*. C.W. Lloyd (ed.), Academic Press, Inc., New York, 109–129.

McNeil, M., Darvill, A. G., & Albersheim, P. (1980). Structure of plant cell walls. *Plant Physiology*, 66(6), 1128–1134.

McQueen-Mason, S. J., & Cosgrove, D. J. (1995). Expansin mode of action on cell walls (analysis of wall hydrolysis, stress relaxation, and binding). *Plant Physiology*, 107(1), 87–100.

Moran, F., Nasuno, S., & Starr, M. P. (1968). Extracellular and intracellular polygalacturonic acid trans-eliminases of *Erwinia carotovora*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 123(2), 298–306.

- O'Neill, M. A., & York, W. S. (2003). The composition and structure of plant primary cell walls. In: *The Plant Cell Wall*, J.K.C. Rose (ed.), Boca Raton, FL: CRC Press, 1–54.
- O'Sullivan, A. C. (1997). Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose*, 4(3), 173–207.
- Pawar, P. M. A., Koutaniemi, S., Tenkanen, M., & Mellerowicz, E. J. (2013). Acetylation of woody lignocellulose: significance and regulation. *Frontiers in Plant Science*, 4, 118.
- Pear, J. R., Kawagoe, Y., Schreckengost, W. E., Delmer, D. P., & Stalker, D. M. (1996). Higher plants contain homologs of the bacterial *celA* genes encoding the catalytic subunit of cellulose synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(22), 12637–12642.
- Pérombelon, M. C. M. (2002). Potato diseases caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis. *Plant Pathology*, 51(1), 1–12.
- Planas, A. (2000). Bacterial 1,3-1,4- β -glucanases: structure, function and protein engineering. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1543(2), 361–382.
- Rajeshwari, R., Jha, G., & Sonti, R. V. (2005). Role of an *in planta*-expressed xylanase of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in promoting virulence on rice. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18(8), 830–837.
- Ridley, B. L., O'Neill, M. A., & Mohnen, D. (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, 57(6), 929–967.
- Sadhu, S., & Maiti, T. K. (2013). Cellulase production by bacteria: a review. *British Microbiology Research Journal*, 3(3), 235–258.
- Salmond, G. P. (1994). Secretion of extracellular virulence factors by plant pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 32(1), 181–200.
- Saritha, M., Arora, A., Choudhary, J., Rani, V., Singh, S., Sharma, A., ... & Nain, L. (2016). The role and applications of xyloglucan hydrolase in biomass degradation/bioconversion. In: *Microbial Enzymes in Bioconversions of Biomass*. Springer International Publishing, 231–248.
- Saxena, I. M., & Brown Jr., R. M. (2000). Cellulose synthases and related enzymes. *Current Opinion in Plant Biology*, 3(6), 523–531.
- Saxena, I. M., & Brown Jr., R. M. (2005). Cellulose biosynthesis: current views and evolving concepts. *Annals of Botany*, 96(1), 9–21.
- Shevchik, V. E., & Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. (2003). PaeX, a second pectin acetyltransferase of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Journal of Bacteriology*, 185(10), 3091–3100.
- Silva, I. R., Jers, C., Meyer, A. S., & Mikkelsen, J. D. (2016). Rhamnogalacturonan I modifying enzymes: an update. *New Biotechnology*, 33(1), 41–54.
- Somerville, C., Bauer, S., Brininstool, G., Facette, M., Hamann, T., Milne, J., ... & Vorwerk, S. (2004). Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science*, 306(5705), 2206–2211.
- Stephen, A. M. (1983). Other plant polysaccharides. *The polysaccharides*, 2, 97–193.

Tardy, F., Nasser, W., Robert-Baudouy, J., & Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. (1997). Comparative analysis of the five major *Erwinia chrysanthemi* pectate lyases: enzyme characteristics and potential inhibitors. *Journal of Bacteriology*, 179(8), 2503–2511.

Toth, I. K., Bell, K. S., Holeva, M. C., & Birch, P. R. (2003). Soft rot erwiniae: from genes to genomes. *Molecular Plant Pathology*, 4(1), 17–30.

Vroemen, S., Heldens, J., Boyd, C., Henrissat, B., & Keen, N. T. (1995). Cloning and characterization of the *bgxA* gene from *Erwinia chrysanthemi* D1 which encodes a β -glucosidase/xylosidase enzyme. *Molecular and General Genetics*, 246(4), 465–477.

Walia, A., Guleria, S., Mehta, P., Chauhan, A., & Parkash, J. (2017). Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching: a review. *Biotech*, 7(1), 11.

Yapo, B. M. (2011). Rhamnogalacturonan-I: a structurally puzzling and functionally versatile polysaccharide from plant cell walls and mucilages. *Polymer Reviews*, 51(4), 391–413.

3.2. Системы секреции бактерий

Для успешного взаимодействия с растениями фитопатогенным микроорганизмам недостаточно просто синтезировать факторы вирулентности; их необходимо также транспортировать за пределы бактериальной клетки и доставить в нужные компартменты организма хозяина. Для этого у микроорганизмов в арсенале есть целый ряд секреторных систем, которые осуществляют перенос разнообразных субстратов (белков, низкомолекулярных соединений, ДНК), выполняющих разные функции: «внеклеточное пищеварение», адгезию и формирование бактериальных биопленок, перенос ДНК. Кроме того, некоторые секреторируемые белки фитопатогенных бактерий обладают сигнальной активностью в отношении клеток растения, что позволяет паразиту направленно координировать физиологические процессы хозяина (Chang et al., 2014).

Бактериальные системы секреции классифицируют на основании их структурной организации, функций и субстратной специфичности, то есть по спектру транспортируемых субстратов. В настоящее время у грамотрицательных бактерий описано восемь (Sec, Tat и с первой по шестую), а у грамположительных — три (Sec, Tat и седьмая) секреторные системы, две из которых (Sec, Tat) являются общими для этих двух групп микроорганизмов. При этом у отдельно взятого патогена не обязательно должны присутствовать все системы секреции: их набор у определенного таксона диктуется образом жизни и стратегией «поведения» микроорганизма (Tseng et al., 2009). Схемы секреторных систем бактерий приведены на рисунке 3.2.1 А, Б.

Tat- и Sec-системы транслокации белков

Наиболее эволюционно древними системами секреции, обнаруженными у всех трех доменов жизни (археи, бактерии, эукариоты), считаются Tat- и Sec-системы транспорта белков, которые характерны как для грамположительных, так и для грамотрицательных бактерий. У грамотрицательных бактерий, имеющих, в отличие от грамположительных микроорганизмов, две мембраны — цитоплазматическую (внутреннюю) и наружную, — эти системы не осуществляют транспортировку белков за пределы клетки, а только переносят их через цитоплазматическую мембрану в периплазматическое пространство. Большинство этих белков остается в периплазматическом пространстве или в цитоплазматической мембране, но многие из них в дальнейшем с помощью других секреторных систем из периплазмы транспортируются в окружающую среду, в том числе в организм хозяина. Некоторые системы секреции (вторая, пятая) не могут «захватывать» переносимые ими в окружающую среду белки из цитоплазмы и используют в качестве субстрата только те белки, которые находятся в периплазматическом пространстве. Таким образом, Tat- и Sec-зависимая транслокация в ряде случаев представляет собой первый этап секреции белков за пределы клетки (Green, Mecsas, 2016).

Sec-система осуществляет доставку в периплазму многих белков, в том числе адгезинов и ферментов, разрушающих полимеры растительной клеточной

стенки. Эта система состоит из трех компонентов: 1) канала, встроенного в мембрану и называемого SecYEG-транслоказой; канал представляет собой многокомпонентный комплекс, который может иметь особенности строения и состава в зависимости от таксономической принадлежности микроорганизма; 2) шаперона SecB, который распознает транспортируемые белки и препятствует их фолдингу; 3) моторного белка SecA, который «выталкивает» субстрат через канал (рис. 3.2.1 Б). Через Sec-систему могут транспортироваться только полипептидные цепи с несформированными вторичными, третичными и четвертичными структурами. При этом перенос белков может осуществляться по двум основным принципам. В одном случае процессы биосинтеза и транспортировки белка сопряжены. При этом N-концевой участок синтезируемого на рибосоме белка распознается специальным нуклеопротеидным комплексом SRP (signal recognition particle), который вместе с «докингковым» белком FtsY (docking protein FtsY) доставляет формирующуюся полипептидную цепь к каналу SecYEG. В результате этого целевой белок уже в процессе биосинтеза либо встраивается в мембрану, либо «выбрасывается» за ее пределы. Во втором случае процессы биосинтеза и транспорта белка разобщены. При этом после биосинтеза транспортируемый белок распознается по N-концевой Sec-последовательности шапероном SecB, что препятствует формированию вторичных, третичных и четвертичных структур; в результате к транспортной системе доставляется несвернутый белок, что является необходимым условием для его переноса через Sec-систему (Beckwith, 2013).

Tat-(twin arginine translocation)-система получила такое название, поскольку для переноса через эту систему транспортируемые белки должны иметь два остатка аргинина на N-концах. В отличие от Sec-системы, Tat-система способна переносить пространственно организованные белки со вторичной, третичной и четвертичной структурой. Эта система состоит из трех компонентов: TatA, TatB и TatC, которые формируют транслокационный комплекс. При переносе N-концевой участок белка с двумя остатками аргинина распознается TatB и TatC и переносится через канал TatA (Natale et al., 2008).

Система секреции первого типа

Понятие «система секреции первого типа» (ССТ) объединяет целую группу систем для переноса из цитоплазмы в окружающую среду разнообразных по структурным и функциональным характеристикам субстратов, среди которых можно выделить и важные факторы вирулентности фитопатогенов, такие как металлопротеазы, глюканазы, адгезины, гемофоры. ССТ характерны только для грамотрицательных бактерий. Причем у отдельно взятого микроорганизма может быть сразу несколько ССТ, и каждая определенная ССТ, как правило, переносит только один из типов субстратов (либо металлопротеазы, либо глюканазы, либо адгезины, либо гемофоры). Чем определяется субстратная специфичность ССТ, остается пока невыясненным (Tseng et al., 2009).

Объединяет разные ССТ их структурная организация. Компоненты ССТ, пронизывающие и цитоплазматическую, и наружную мембраны, а также периплазм-

матическое пространство, включают: 1) ABC-(ATP-binding cassette)-транспортер, находящийся в цитоплазматической мембране; 2) белок внешней мембраны OMF (outer membrane factor); 3) периплазматический белок MFP (membrane fusion protein), связывающий ABC-транспортер и OMF (рис. 3.2.1 А). В процессе секреции белков через СС1Т ABC-транспортер распознает «нужный» белок по его С-концевому сигнальному пептиду и после связывания с этим белком гидролизует АТФ, высвобождая, таким образом, энергию, необходимую для «проталкивания» целевого белка через периплазму по предполагаемому каналу, формируемому MFP. Затем через белок внешней мембраны OMF, который формирует пору, субстрат выходит из клетки. СС1Т-зависимый процесс секреции осуществляется только в том случае, если целевой белок не претерпевает процессов фолдинга (Thomas et al., 2014).

Система секреции второго типа

Система секреции второго типа (СС2Т) применительно к фитопатогенным бактериям рассматривается обычно как переносчик экстраклеточных ферментов, разрушающих растительную клеточную стенку. В действительности же эта система присуща не только фитопатогенам, но и патогенам животных, а также сапрофитным бактериям, и список переносимых ею субстратов очень обширный (Green, Meccas, 2016).

СС2Т есть только у грамотрицательных бактерий. Эта система может переносить субстраты в окружающую среду только из периплазмы, но не из цитоплазмы. Таким образом, все СС2Т-зависимые белки на первом этапе секреции переносятся с помощью Sec- и Tat-систем из цитоплазмы в периплазму, для чего содержат сигнальную последовательность для Tat- или Sec-зависимой транслокации. Транспортируемые через СС2Т белки в периплазме подвергаются фолдингу. Чаще через СС2Т транспортируются ферменты (гликозил-гидролазы, гликозиллиазы, эстеразы, липазы, протеазы, фосфатазы); однако, в том числе у фитопатогенов, описаны и неферментные СС2Т-зависимые белки, определяющие вирулентность микроорганизмов (например, Svx и Nip) (Coulthurst et al., 2008). СС2Т на сегодняшний день описана для практически всех известных фитопатогенных бактерий, и на ряде из них (*Ralstonia solanacearum*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Xanthomonas campestris*, *Dickeya dadantii*, *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae*) продемонстрирована определяющая роль этой системы в детерминировании вирулентности (Cianciotto, 2005). Одним из основных следствий «отключения» СС2Т (при направленном мутагенезе) у фитопатогенов является неспособность СС2Т-мутантных микроорганизмов разрушать полимеры растительной клеточной стенки (Ray et al., 2000).

СС2Т одновременно можно назвать неспецифичной и высокоспецифичной. Ее неспецифичность связана со способностью транспортировать большое многообразие (несколько десятков) белков, различающихся по структуре и функциям. А специфичность этой системы заключается в том, что ее функционирование в гетерологичных, в том числе близкородственных, организмах невозможно. Другими

словами, если «пересадить» СС2Т от одного микроорганизма (*E. carotovora*) второму (*E. chrysanthemi*), то «пересаженная» система не сможет транспортировать СС2Т-зависимые белки реципиента, несмотря на то, что сходство компонентов секреторных аппаратов этих организмов превышает 90% (Nunn, Lory, 1993; Strom et al., 1993).

СС2Т является сложным комплексом, состоящим из большого количества разных белков (до 15), которые можно условно отнести к четырем структурам: внешнемембранный комплекс (outer membrane complex), платформа внутренней мембраны (inner membrane platform), секреторная АТФаза (secretion ATPase) и псевдопиль (рис. 3.2.1 Б). Внешнемембранный комплекс состоит из белка секретина и представляет собой канал, через который СС2Т-зависимые белки переносятся из периплазмы за пределы клетки. Платформа внутренней мембраны располагается в цитоплазматической мембране и через периплазму соприкасается с секретинами. Эта платформа координирует экспорт секретлируемых белков, взаимодействуя с АТФазой, псевдопилями и секретинами. Секреторная АТФаза локализована в цитоплазме и, контактируя с платформой внутренней мембраны, снабжает СС2Т энергией. Псевдопили предположительно осуществляют «проталкивание» секретлируемого белка через внешнемембранный комплекс (Korotkov et al., 2012).

Система секреции третьего типа

Одной из основных особенностей системы секреции третьего типа (СС3Т) является ее особое устройство, которое позволяет транспортировать субстраты из цитоплазмы бактериальных клеток не только во внеклеточную среду, но и непосредственно внутрь клеток растения-хозяина. Транспортный канал (пиль) этой системы пронизывает не только внутреннюю и наружную мембраны бактериальной клетки, но и клеточную стенку, и плазмалемму клетки растения-хозяина. СС3Т есть только у грамтрицательных бактерий, живущих в теле высших организмов (растения, животные); для сапрофитных бактерий эта система не характерна (Tseng et al., 2009).

Субстратами СС3Т у фитопатогенов являются две группы белков: эффекторы и харпины. В аминокислотных последовательностях этих белков есть N-концевой сигнальный пептид, необходимый для их СС3Т-зависимой секреции. Эти белки транспортируются в виде полипептидных цепей без вторичной, третичной и четвертичной структуры, и ряд из них секретруется вместе со специфическими шаперонами, которые обеспечивают правильную упаковку белка уже в теле хозяина (Green, Meccas, 2016).

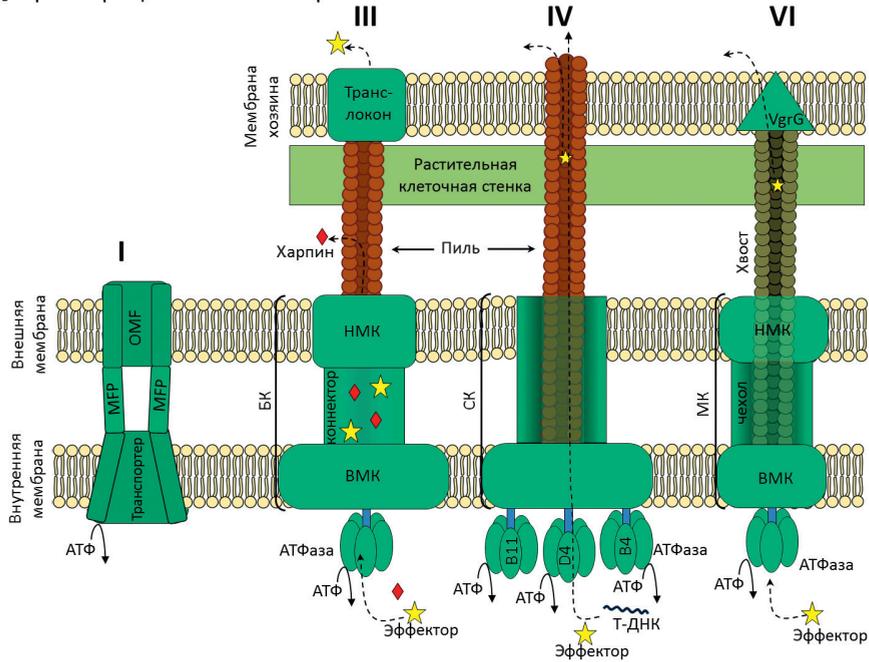
Роль эффекторов и харпинов, а также всей СС3Т в целом во взаимодействии бактерий и растений дуалистична. С одной стороны, транспортируемые с помощью этой системы белки, обладающие сигнальными свойствами в отношении клеток растений, могут подавлять защитные системы и/или изменять физиологию хозяина в нужном для патогена направлении, что благоприятствует развитию

инфекции. С другой стороны, ССЗТ-транспортируемые белки могут распознаваться в растительных клетках как сигнал опасности, индуцирующий очень мощный защитный ответ — реакцию гиперчувствительности, и таким образом препятствовать инфекционному процессу. В связи с этим гены, кодирующие компоненты ССЗТ, а также эффекторы и харпины, у фитопатогенов получили название *hrp* (hypersensitive response and pathogenicity), поскольку мутации в этих генах обычно приводят к неспособности патогена как вызывать заболевание, так и индуцировать реакцию гиперчувствительности (Chang et al., 2014).

Отличием эффекторов от харпинов является то, что первые доставляются в цитоплазму клеток хозяина, а вторые транспортируются в апопласт. Осново-полагающая роль в модуляции физиологических процессов хозяина обычно отводится эффекторам (информация о механизмах действия эффекторов приведена в главе 6.2). При этом харпины (которые также называют хелперными белками) рассматриваются как вспомогательные для действия эффекторов белки. Их вспомогательную роль связывают с формированием пор в плазмалемме хозяина, а также облегчением прохождения пилы через растительную клеточную стенку, поскольку некоторые харпины имеют пектатлиазный домен. Однако то, что харпины самостоятельно способны как индуцировать, так и блокировать реакцию гиперчувствительности хозяина, по всей видимости, свидетельствует об их независимом от эффекторов действии. Возможно, харпины способны взаимодействовать с рецепторами хозяина, находящимися на мембране, но это, как и другие предположения о механизмах действия харпинов, нуждается в экспериментальном подтверждении (Choi et al., 2013).

Среди фитопатогенных бактерий ССЗТ в наибольшей степени охарактеризована у биотрофов, таких, например, как *Xanthomonas campestris* и *Pseudomonas syringae*, и считается, что она является ключевым орудием именно биотрофов, которые взаимодействуют с хозяином по принципу «хитрость», а не «сила». В то же время ССЗТ описана и у некротрофов (например, *Pectobacterium atrosepticum*, *Dickeya dadantii*). Основное различие ССЗТ некротрофов и биотрофов заключается в количестве выявленных ССЗТ-транспортируемых белков: у биотрофов — это десятки, а у некротрофов — единицы. Тем не менее роль ССЗТ в вирулентности экспериментально доказана для обеих этих групп растительных патогенов. Однако остается по-прежнему не совсем понятным, каким образом эта система для деликатного воздействия на регуляторные системы растения помогает колонизировать хозяина некротрофным фитопатогеном, которые продуцируют множество ферментов, разрушающих ткани хозяина, и токсинов, убивающих клетки растений. Вероятно, что ССЗТ необходима некротрофам на начальной стадии колонизации растения-хозяина, пока плотность бактериальной популяции не увеличится до уровня, обеспечивающего достаточное производство ферментов и токсинов (Büttner, He, 2009; Büttner, 2012).

А Грамотрицательные бактерии



Б Грамотрицательные бактерии

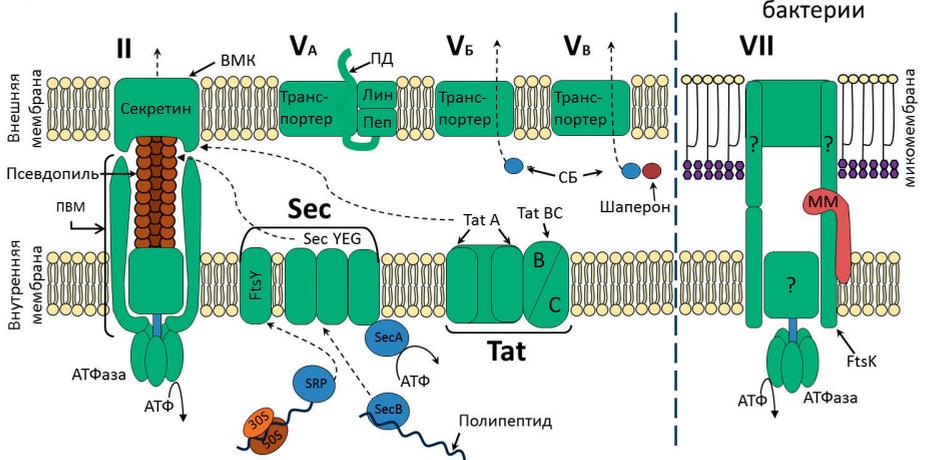


Рис. 3.2.1. Секреторные системы бактерий. На рисунке А приведены схемы секреторных систем (CC1Т, CC3Т, CC4Т, CC6Т), характерных для грамотрицательных бактерий и не зависящих от Sec- и Tat-путей транслокации белков в периплазму. На рисунке Б приведены схемы Sec- и/или Tat-зависимых систем грамотрицательных бактерий (CC2Т, CC5Т (А), CC5Т (Б), CC5Т (В)), а также CC7Т — характерной для грамположительных бактерий.

A: I — система секреции первого типа: ABC-транспортер, периплазматический белок (MFP), белок внешней мембраны (OMF). **III** — система секреции третьего типа: пиль, базальный комплекс (БК), включающий в себя комплекс внутренней мембраны (ВМК), комплекс наружной мембраны (НМК) и коннектор; ромбами обозначены харпины, звездочками — эффекторные белки. **IV** — система секреции четвертого типа: пиль, секреторный канал (СК), АТФаза, кодируемые генами *vir* (B11, D4, B4); волнистой линией обозначена Т-ДНК, звездочками — эффекторные белки. **VI** — система секреции шестого типа: хвост (tail), мембранный комплекс (МК), включающий в себя комплекс внутренней мембраны (ВМК), комплекс наружной мембраны (НМК) и чехол; белок VgrG выполняет роль «иглы»; звездочками обозначены эффекторные белки.

B: Sec-система транслокации белков в периплазму: белки, формирующие канал (SecYEG), АТФаза (SecA), шаперон (SecB), комплекс, распознающий синтезируемые белки (SRP), «докинговый» белок (FtsY). **Tat**-система транслокации белков в периплазму: белок, формирующий канал (TatA), белки, распознающие субстрат (TatB, TatC). **II** — система секреции второго типа: платформа внутренней мембраны (ПВМ), псевдопиль, внешнемембранный комплекс (ВМК), состоящий из белка секретина, АТФаза. **V_A**, **V_B**, **V_В** — различные варианты системы секреции пятого типа. **V_A** — аутотранспортная система секреции: единственный белок, имеющий четыре домена: транспортный, линкерный (Лин), пептидазный (Пеп), пассажирский (ПД). **V_B** — двупартнерская система секреции: белок-транспортер и секретируемый белок (СБ). **V_В** — шаперон-зависимая система секреции: транспортер, секретируемый белок (СБ) и шаперон. **VII** — система секреции седьмого типа: неописанные каналы внутренней и внешней мембраны (обозначены вопросительным знаком), АТФаза, белки, содержащие FtsK-домен, мембранозаякоренный микозин (ММ). Пунктирными линиями указано направление движения субстрата. Дополнительные пояснения к рисунку — в тексте.

Устройство ССЗТ имеет много общего со строением жгутикового аппарата, что указывает на филогенетическую близость этих двух систем. ССЗТ разных микроорганизмов состоят из примерно 20–30 белков, которые являются компонентами следующих основных структур: 1) базального комплекса или базального тела, 2) пиля (канала) и 3) транслокона (рис. 3.2.1 А). Базальный комплекс пронизывает внутреннюю и наружную мембраны и внешне напоминает муфту, которая состоит из нескольких колец и центрального стержня. Базальный комплекс участвует в захвате белков из цитоплазмы и их перемещении в пиль. Пиль, состоящий из белка пилина, представляет собой полый канал, выступающий из базального тела за пределы клетки, по которому транспортируются секретируемые белки. Нуклеотидные последовательности генов пилинов очень вариабельны не только у разных родов и видов, но даже подвидов, а сходство этих белков определяется их доменной организацией (Weber, Koeбnik, 2006). У пилинов выделяют С-концевой домен для полимеризации и N-концевой сигнальный домен, необходимый для секреции данного белка через пиль. Таким образом, пилин сам секретируется через ССЗТ и полимеризуется на вершине пиля. Транслокон, находящийся на конце пиля, необходим для контакта с мембраной клетки хозяина и формирования в ней поры, через которую в цитоплазму доставляются эффекторные белки (Green, Meccas, 2016).

Система секреции четвертого типа

Система секреции четвертого типа (СС4Т) является уникальной среди всех систем секреции граммотрицательных бактерий из-за способности, помимо белков, транспортировать ДНК, а также комплексы ДНК-белок, белок-белок. Считается, что СС4Т появилась в результате модификации бактериальной конъюгативной системы в процессе эволюции. В то же время устройство СС4Т имеет много общего со структурой СС2Т (Sarris et al., 2012).

СС4Т может транспортировать субстраты как в окружающую среду, так и непосредственно в клетку хозяина, что подразумевает прохождение секреторного канала этой системы через три мембраны. Хотя гены, кодирующие компоненты СС4Т, выявлены у многих фитопатогенных бактерий, функциональное назначение этой системы понятно только для представителей рода *Agrobacterium*. Эти бактерии транспортируют участок ДНК (Т-DNA, transfer DNA), расположенный либо на Ti-(tumor-inducing)-плазмиде, либо на Ri-(root-inducing)-плазмиде, в клетку растения-хозяина. В дальнейшем этот фрагмент ДНК интегрируется в геном растительной клетки, что является необходимым условием развития патологий (опухолей или гипертрофии корней). Более подробно процесс трансформации Т-ДНК (перенос и встраивание в геном хозяина) и развития заболеваний, вызываемых агробактериями, описан в главе 3.7.

СС4Т агробактерий, названная VirB/D, состоит из 12 белков VirB1 — VirB11 и VirD4, которые можно классифицировать в три основные структуры: 1) АТФаза VirD4, осуществляющая захват субстрата СС4Т; 2) секреторный канал, состоящий из трансмембранных белков (VirB1, 3; VirB6-10) и АТФаз (VirB4, 11); 3) пиль (VirB2, 5) (рис. 3.2.1 А). Транспорт субстратов по СС4Т происходит следующим образом: АТФаза VirD4 распознает субстрат и с затратой энергии направляет его в секреторный канал, по которому он проходит благодаря энергии, вырабатываемой АТФазами VirB11, VirB4. Затем субстрат направляется к пилю, по которому выходит наружу или попадает в клетку хозяина (Chandran Darbari, Waksman, 2015).

Для фитопатогенов, помимо агробактерий, процесс переноса ДНК в клетку растения-хозяина не продемонстрирован; следовательно, роль СС4Т в патогенезе остается не выясненной. На примере патогенов животных, а также агробактерий показано, что через СС4Т могут транспортироваться белки. В связи с этим, вероятно, у фитопатогенов должны существовать СС4Т-зависимые эффекторные белки, которые, однако, до настоящего времени не описаны.

Система секреции пятого типа

Системы секреции пятого типа (СС5Т) отличает характер их расположения в клетке: они локализованы во внешней мембране, но в отличие от СС2Т, не закорены в цитоплазматической мембране (рис. 3.2.1 Б). В связи с этим транспортируемые с помощью СС5Т субстраты должны доставляться в периплазму с помощью Sec-системы и поэтому содержат N-концевую сигнальную последовательность для Sec-зависимой транслокации. Кроме того, СС5Т отличает спектр секреторируемых субстратов: это факторы адгезии (а в случае патогенов животных

еще и гемолизины). Экспериментально показано, что СС5Т является фактором вирулентности фитопатогенных бактерий, и мутанты по генам СС5Т не способны прикрепляться к растению-хозяину (Rojas et al., 2002). СС5Т разделяют на три разных подтипа в зависимости от количества белков, входящих в их состав: 1) аутотранспортная система секреции (autotransporter secretion system); 2) двухпартнерская система секреции (two-partner secretion system); 3) шаперон-зависимая система секреции (chaperone-usher secretion system) (Green, Mecsas, 2016).

Аутотранспортная система получила такое название, поскольку единственный белок, входящий в ее состав, фактически транспортирует сам себя. Белки такого типа содержат три или четыре функциональных домена: 1) транслокаторный домен, формирующий канал в наружной мембране; 2) линкерный домен, который связывает транслокаторный и пассажирский домены; 3) пассажирский домен, транспортируемый за пределы клетки; 4) протеазный домен, который позволяет отрезать пассажирский домен, прошедший через канал во внешней мембране (рис. 3.2.1 Б). Наличие четвертого (протеазного) домена не обязательно: при его наличии часть белка высвобождается в окружающую среду, а при его отсутствии — остается закоренной в мембране. В состав двухпартнерской системы входят два белка: один формирует канал, а второй через него секретируется. Эта система секреции, обнаруженная у многих фитопатогенов, предназначена для транспорта адгезинов, имеющих большую молекулярную массу (Guérin et al., 2017). Шаперон-зависимая система секреции включает в себя три типа белков: 1) белок, формирующий канал; 2) секретируемый белок; 3) шаперон (белок usher), обеспечивающий фолдинг секретируемого белка (Leo et al., 2012) (рис. 3.2.1 Б).

Система секреции шестого типа

Система секреции шестого типа (СС6Т) была обнаружена позднее описанных выше секреторных систем грамотрицательных бактерий и поэтому является наименее исследованной. Считается, что эта система была приобретена бактериями от вирусов, поскольку кристаллическая структура СС6Т сходна с хвостами бактериофагов. Изначально СС6Т рассматривалась как инструмент, необходимый для межвидовой конкуренции бактерий в сообществах, поскольку ее субстратами являются эффекторный белки, которые, транспортируясь из клетки одного вида в клетку другого вида, могут вызвать гибель реципиента. Однако на примере фитопатогенных бактерий было продемонстрировано (хотя и не во всех описанных случаях) снижение вирулентности мутантов, дефектных по компонентам этой системы, по сравнению с родительским штаммом дикого типа. Это свидетельствует о роли этой системы во взаимодействии микроорганизмов с растениями-хозяевами. Предполагают, что СС6Т-транспортируемые белки выполняют функции, схожие с СС3Т-зависимыми эффекторами, то есть обладают сигнальной активностью в отношении растительных клеток; однако это предположение пока не получило должного экспериментального подтверждения (Chang et al., 2014).

СС6Т включает мембранный комплекс, внутри которого располагается белковый чехол, по которому проходит хвост с внутренним каналом (рис. 3.2.1 А).

На конце этого хвоста располагается белок VgrG, который предположительно «прокалывает» наружную мембрану, а также мембрану клетки реципиента СС7Т-транспортируемого субстрата. Субстраты, секретируемые через эту систему, обладают цитотоксическим эффектом, однако механизм их действия пока не исследован (Silverman et al., 2012).

Система секреции седьмого типа

Система секреции седьмого типа (СС7Т) характерна только для грамположительных микроорганизмов семейств *Mycobacteriaceae*, *Corynebacteriaceae* и *Nocardiaceae*, у которых наружная поверхность клеточной стенки представлена плотной гидрофобной микомембраной, затрудняющей прохождение секретируемых белков (рис. 3.2.1 Б). Через СС7Т транспортируются низкомолекулярные белки семейств WXG100 и PE/PPE (Ates et al., 2016). Хотя на примере патогенов животных продемонстрирована роль этой системы в детерминировании вирулентности, функции транспортируемых через нее белков остаются неисследованными. У фитопатогенов СС7Т не описана; однако у ряда паразитов растений (*Streptomyces scabies* и *Rhodococcus fascians*) были найдены локусы, предположительно кодирующие компоненты СС7Т (Chang et al., 2014).

СС7Т состоит из трех основных компонентов: 1) комплекса внутренней мембраны, который включает канал-формирующий белок, АТФазу и белки, содержащие FtsK/SpoIIIЕ-домен; 2) мембранозаякоренного микозина; 3) канала наружной мембраны. Комплекс внутренней мембраны участвует в инициации сборки СС7Т и распознавании субстрата. Микозин, располагающийся в периплазме и содержащий протеазный домен, необходим для процессинга секретируемых белков. Трансмембранный белок формирует пору, через которую белки секретируются за пределы клетки (Green, Meccas, 2016).

Таким образом, фитопатогенные бактерии располагают большим разнообразием секреторных систем, которые различаются структурной организацией и способами транспортировки субстратов. Через эти системы в апопласт или непосредственно в клетки хозяина доставляется огромное количество факторов вирулентности, которые обеспечивают возможность эффективной колонизации растений фитопатогенами.

Литература:

- Ates, L. S., Houben, E. N., & Bitter, W. (2016). Type VII secretion: a highly versatile secretion system. *Microbiology Spectrum*, 4(1).
- Beckwith, J. (2013). The Sec-dependent pathway. *Research in Microbiology*, 164(6), 497–504.
- Büttner, D. (2012). Protein export according to schedule: architecture, assembly, and regulation of type III secretion systems from plant-and animal-pathogenic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(2), 262–310.

- Büttner, D., & He, S. Y. (2009). Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria. *Plant Physiology*, *150*(4), 1656–1664.
- Chandran Darbari, V., & Waksman, G. (2015). Structural biology of bacterial type IV secretion systems. *Annual Review of Biochemistry*, *84*, 603–629.
- Chang, J. H., Desveaux, D., & Creason, A. L. (2014). The ABCs and 123s of bacterial secretion systems in plant pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology*, *52*, 317–345.
- Choi, M. S., Kim, W., Lee, C., & Oh, C. S. (2013). Harpins, multifunctional proteins secreted by gram-negative plant-pathogenic bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *26*(10), 1115–1122.
- Cianciotto, N. P. (2005). Type II secretion: a protein secretion system for all seasons. *Trends in Microbiology*, *13*(12), 581–588.
- Coulthurst, S. J., Lilley, K. S., Hedley, P. E., Liu, H., Toth, I. K., & Salmond, G. P. (2008). DsbA plays a critical and multifaceted role in the production of secreted virulence factors by the phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(35), 23739–23753.
- Green, E. R., & Mecsas, J. (2016). Bacterial secretion systems — an overview. *Microbiology Spectrum*, *4*(1).
- Guérin, J., Bigot, S., Schneider, R., Buchanan, S. K., & Jacob-Dubuisson, F. (2017). Two-partner secretion: combining efficiency and simplicity in the secretion of large proteins for bacteria-host and bacteria-bacteria interactions. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *7*, 148.
- Korotkov, K. V., Sandkvist, M., & Hol, W. G. (2012). The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism. *Nature Reviews. Microbiology*, *10*(5), 336.
- Leo, J. C., Grin, I., & Linke, D. (2012). Type V secretion: mechanism(s) of autotransport through the bacterial outer membrane. *Philosophical Transactions of Royal Society: B Biological Sciences*, *367*(1592), 1088–1101.
- Natale, P., Brüser, T., & Driessen, A. J. (2008). Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane — distinct translocases and mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — Biomembranes*, *1778*(9), 1735–1756.
- Nunn, D. N., & Lory, S. (1993). Cleavage, methylation, and localization of the *Pseudomonas aeruginosa* export proteins XcpT, -U, -V, and -W. *Journal of Bacteriology*, *175*(14), 4375–4382.
- Ray, S. K., Rajeshwari, R., & Sonti, R. V. (2000). Mutants of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* deficient in general secretory pathway are virulence deficient and unable to secrete xylanase. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *13*(4), 394–401.
- Rojas, C. M., Ham, J. H., Deng, W. L., Doyle, J. J., & Collmer, A. (2002). HecA, a member of a class of adhesins produced by diverse pathogenic bacteria, contributes to the attachment, aggregation, epidermal cell killing, and virulence phenotypes of *Erwinia chrysanthemi* EC16 on *Nicotiana glauca* seedlings. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(20), 13142–13147.

Sarris, P. F., Trantas, E. A., Skandalis, N., Tampakaki, A. P., Kapanidou, M., Kokkinidis, M., & Panopoulos, N. J. (2012). Phytobacterial type VI secretion system-gene distribution, phylogeny, structure and biological functions. In: *Plant Pathology*. InTech, 53–84.

Silverman, J. M., Brunet, Y. R., Cascales, E., & Mougous, J. D. (2012). Structure and regulation of the type VI secretion system. *Annual Review of Microbiology*, 66, 453–472.

Strom, M. S., Nunn, D. N., & Lory, S. (1993). A single bifunctional enzyme, PilD, catalyzes cleavage and N-methylation of proteins belonging to the type IV pilin family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(6), 2404–2408.

Thomas, S., Holland, I. B., & Schmitt, L. (2014). The type 1 secretion pathway — the hemolysin system and beyond. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — Molecular Cell Research*, 1843(8), 1629–1641.

Tseng, T. T., Tyler, B. M., & Setubal, J. C. (2009). Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. *BMC Microbiology*, 9(1), S2.

Weber, E., & Koebnik, R. (2006). Positive selection of the Hrp pilin HrpE of the plant pathogen *Xanthomonas*. *Journal of Bacteriology*, 188(4), 1405–1410.

3.3. Фитотоксины

Фитотоксины — это факторы вирулентности фитопатогенов, представляющие собой низкомолекулярные соединения, которые транспортируются в клетки растений и вызывают различные ответы, способствующие эффективной колонизации хозяина. Обычно к фитотоксинам относят продуцируемые фитопатогенами соединения, которые в относительно низких концентрациях убивают клетки растений. Тем не менее группа фитотоксинов включает и такие метаболиты, действие которых направлено не на умерщвление клеток хозяина, а на репрессию его защитных ответов (Duke, Dayan, 2011).

Большинство описанных на сегодняшний день фитотоксинов продуцируется фитопатогенными грибами (Mobius, Hertweck, 2009). Однако фитопатогенные бактерии тоже производят фитотоксины (рис. 3.3.1). Наиболее изученными среди них являются фитотоксины, синтезируемые фитопатогенными псевдомонадами и стрептомицетами (Bender et al., 1999; Bignell et al., 2014). У ряда других фитопатогенных бактерий, а именно у пектобактерий (Panda et al., 2016), ксантомонад (Li et al., 2007) и дикей (Zhou et al., 2016), были обнаружены потенциальные фитотоксины, то есть соединения (или фракции), обладающие токсическими свойствами, но химическая структура и механизм действия которых пока остаются загадкой. Кроме того, у перечисленных микроорганизмов были выявлены гены, кодирующие ферменты биосинтеза предполагаемых фитотоксичных соединений.

Интересно, что среди фитопатогенных бактерий наибольшее число фитотоксинов, в том числе убивающих клетки растений, было обнаружено у псевдомонад (*Pseudomonas syringae*) — биотрофных патогенов, которые «деликатно» взаимодействуют с хозяином, питаясь содержимым живых клеток (Bender et al., 1999). Этому противоречию пока объяснения найдено не было. Среди фитотоксинов псевдомонад, летальных для клеток растений, можно выделить три группы соединений в зависимости от механизмов их действия. Первую группу составляют сирингомицин, сиринготоксин и сирингостатин, которые формируют поры в мембранах, что приводит к утечке ионов и последующей гибели клеток хозяина (Bender et al., 1999). Ко второй группе относится тагетитоксин, который ингибирует РНК-полимеразу хлоропластов, что в итоге влечет за собой гибель фотосинтезирующих клеток и появление хлорозов на растениях (Vassilyev et al., 2005). Третья группа включает табтоксин, манготоксин и фазеолотоксин, относящиеся к так называемым антиметаболитным токсинам, которые нарушают протекание различных ассимиляционных процессов. Эти три токсина ингибируют реакции растений, связанные с ассимиляцией неорганического азота (биосинтез орнитина, цитруллина, глутамина), в результате чего происходит накопление аммония в токсичных для растительной клетки концентрациях. Это, во-первых, может приводить к гибели растения, во-вторых, обеспечить патогена азотом, доступность которого во многом определяет развитие микроорганизма в теле хозяина (Agreola et al., 2011).

Летальные для растительных клеток токсины продуцируют и фитопатогенные некротрофные стрептомицеты (*Streptomyces scabies*), вызывающие паршу клуб-

ней картофеля. Хидантоцидин и бластоцидин С, синтезируемые этой бактерией, нарушают процессы биосинтеза пуринов и трансляции, приводя таким образом к гибели клеток хозяина (Duke, Dayan, 2011). *S. scabies* производит и более «мягко» действующий фитотоксин — такстомин А. Этот токсин, не вызывая напрямую гибели клеток, ингибирует работу целлюлозосинтазного комплекса, что снижает барьерные свойства растительных клеточных стенок, благоприятствуя продвижению гиф в теле растения (Goyer et al., 1998; Logia et al., 2003).

К фитотоксинам, не вызывающим гибель растительных клеток, относятся соединения, влияющие на работу устьичного аппарата растений. Патоген-индуцируемое закрывание устьиц — это один из базовых иммунных ответов растения, который создает преграду на пути бактерий из окружающей среды в тело хозяина (Melotto et al., 2008). У псевдомонад было обнаружено два фитотоксина, блокирующих «устьичный иммунитет»: сиринголин А и коронатин (Melotto et al., 2017). Сиринголин А способен препятствовать патоген-индуцируемому закрыванию устьиц, которое регулируется в растении фитогормоном биотического стресса салициловой кислотой. Сиринголин А, в свою очередь, репрессируя салицилат-зависимые ответы, позволяет поддерживать устьица в открытом состоянии даже в присутствии патогена (Schellenberg et al., 2010).

Механизм действия коронатина несколько отличается от принципа работы сиринголина А. Коронатин уже после патоген-индуцируемого закрывания устьиц способствует их повторному открыванию (reopening), вызывая гиперполяризацию мембран замыкающих клеток вследствие ингибирования протонных помп (Melotto et al., 2017). Замыкающие клетки устьиц далеко не единственная мишень коронатина. Этот фитотоксин является функциональным аналогом жасмоновой кислоты (один из фитогормонов биотического стресса), благодаря чему он активирует в растениях жасмонат-зависимые ответы, к которым псевдомонады толерантны. Жасмонат-зависимые ответы, в свою очередь, являются антагонистами губительных для псевдомонад салицилат-зависимых реакций. По всей видимости, коронатин является удобным и в какой-то степени универсальным инструментом фитопатогенных бактерий. В пользу этого свидетельствует то, что гены ферментов биосинтеза этого фитотоксина, приобретенные микроорганизмами в результате горизонтального переноса, характерны не только для псевдомонад, но и для фитопатогенных пектобактерий (Panda et al., 2016) и стрептомицетов (Bignell et al., 2014).

Таким образом, в рамках своей наступательной тактики фитопатогенные бактерии могут использовать два основных типа фитотоксинов. Один из них вызывает быструю гибель клеток хозяина, что, по-видимому, обеспечивает патогена питательным субстратом, высвобождающимся из мертвых клеток. Другой тип фитотоксинов, не убивая клеток растения, обеспечивает кондиционирование внутренней среды хозяина, формируя из нее благоприятную экологическую нишу для патогена.

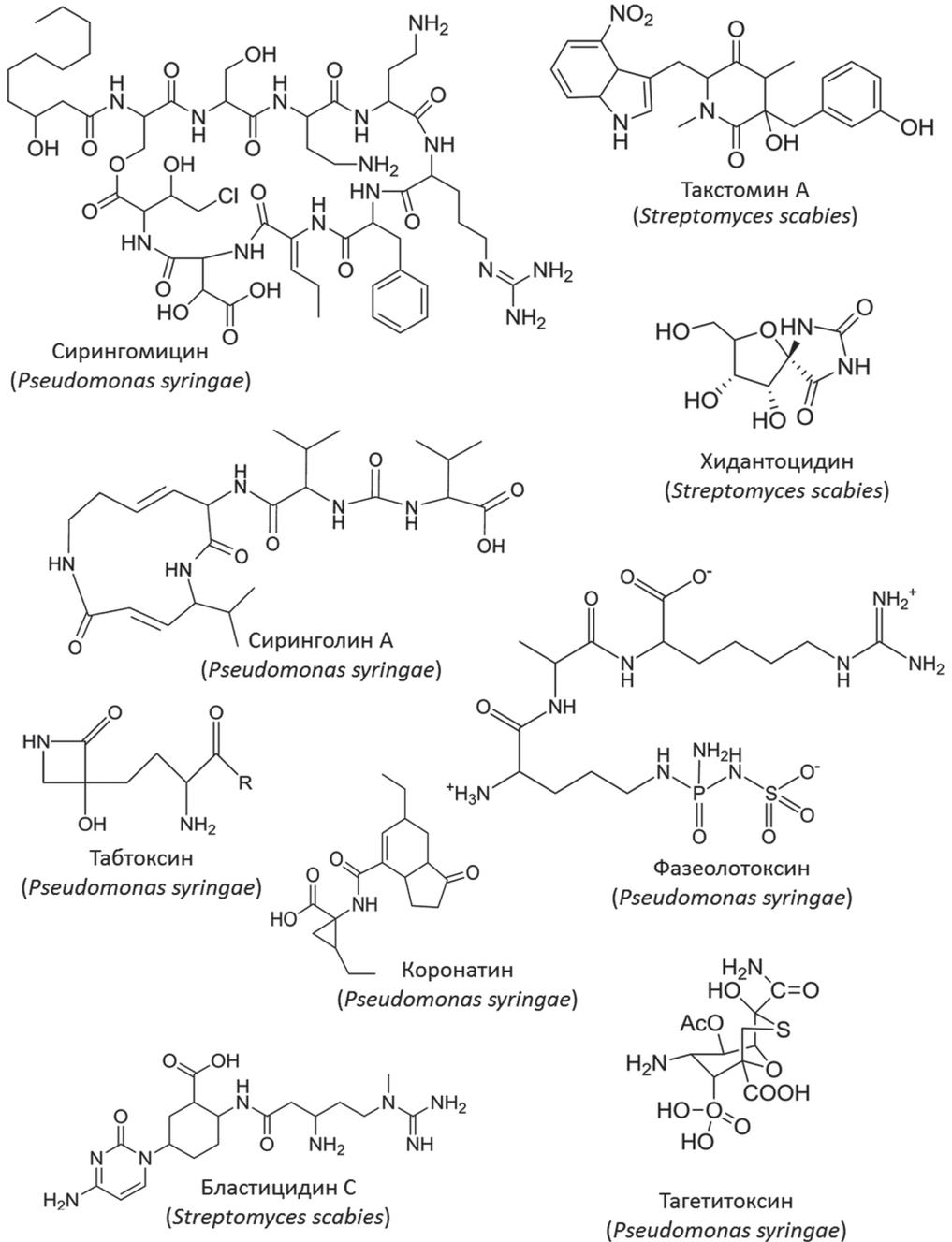


Рис. 3.3.1. Продуцируемые фитопатогенными бактериями фитотоксины с установленной структурой.

Литература:

Arrebola, E., Cazorla, F. M., Perez-García, A., & Vicente, A. D. (2011). Chemical and metabolic aspects of antimetabolite toxins produced by *Pseudomonas syringae* pathovars. *Toxins*, 3(9), 1089–1110.

Bender, C. L., Alarcón-Chaidez, F., & Gross, D. C. (1999). *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(2), 266–292.

Bignell, D. R. D., Fyans, J. K., & Cheng, Z. (2014). Phytotoxins produced by plant pathogenic *Streptomyces* species. *Journal of Applied Microbiology*, 116(2), 223–235.

Duke, S. O., & Dayan, F. E. (2011). Modes of action of microbially-produced phytotoxins. *Toxins*, 3(8), 1038–1064.

Goyer, C., Vachon, J., & Beaulieu, C. (1998). Pathogenicity of *Streptomyces scabies* mutants altered in thaxtomin A production. *Phytopathology*, 88(5), 442–445.

Li, M., Xu, L., Sun, Z., & Li, Y. (2007). Isolation and characterization of a phytotoxin from *Xanthomonas campestris* pv. *retroflexus*. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 15(5), 639–642.

Loria, R., Coombs, J., Yoshida, M., Kers, J., & Bukhalid, R. (2003). A paucity of bacterial root diseases: *Streptomyces* succeeds where others fail. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 62(2), 65–72.

Melotto, M., Underwood, W., & He, S. Y. (2008). Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 46, 101–122.

Melotto, M., Zhang, L., Oblessuc, P. R., & He, S. Y. (2017). Stomatal defense a decade later. *Plant Physiology*, 174(2), 561–571.

Mobius, N., & Hertweck, C. (2009). Fungal phytotoxins as mediators of virulence. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(4), 390–398.

Panda, P., Vanga, B. R., Lu, A., Fiers, M., Fineran, P. C., Butler, R., ... & Pitman, A. R. (2016). *Pectobacterium atrosepticum* and *Pectobacterium carotovorum* harbor distinct, independently acquired integrative and conjugative elements encoding coronafacic acid that enhance virulence on potato stems. *Frontiers in Microbiology*, 7, 397.

Schellenberg, B., Ramel, C., & Dudler, R. (2010). *Pseudomonas syringae* virulence factor syringolin A counteracts stomatal immunity by proteasome inhibition. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23(10), 1287–1293.

Vassilyev, D. G., Svetlov, V., Vassilyeva, M. N., Perederina, A., Igarashi, N., Matsugaki, N., ... & Artsimovitch, I. (2005). Structural basis for transcription inhibition by tagetitoxin. *Nature Structural & Molecular Biology*, 12(12), 1086–1093.

Zhou, J. N., Zhang, H. B., Lv, M. F., Chen, Y. F., Liao, L. S., Cheng, Y. Y., ... & Jiang, Z. D. (2016). SlyA regulates phytotoxin production and virulence in *Dickeya zeae* EC1. *Molecular Plant Pathology*, 17(9), 1398–1408.

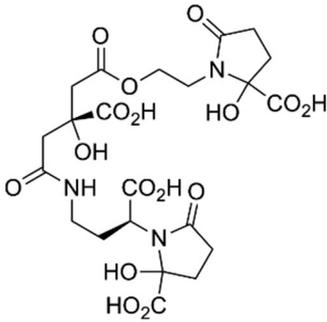
3.4. Сидерофоры

Сидерофоры — это низкомолекулярные соединения, используемые микроорганизмами для захвата железа из окружающей среды. Эти соединения транспортируются из клеток и, благодаря высокой аффинности к железу, связывают его, после чего доставляются обратно в клетку (Lopez, Buyer, 1991). Синтез сидерофоров является критерием вирулентности многих фитопатогенных бактерий, поскольку железо необходимо микроорганизмам для продукции детерминант патогенности (Lemanceau et al., 2009).

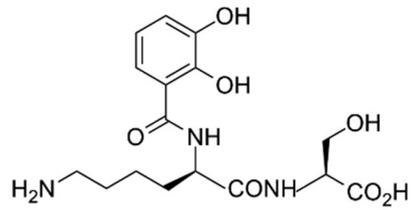
Сидерофоры представляют собой разнородную группу веществ (рис. 3.4.1), значительно различающихся по химической структуре. Их разделяют на четыре основных типа в зависимости от структурной организации железосвязывающих групп (Hider, Kong, 2010). Сидерофоры могут синтезироваться, во-первых, нерибосомальными пептидсинтазами (NRPS), во-вторых, ферментами NIS (NRPS-independent siderophore), в-третьих, благодаря комбинации двух вышеперечисленных групп ферментов (Barry, Challis, 2009). Процесс транспорта сидерофоров у грамотрицательных и грамположительных бактерий различается. У грамотрицательных бактерий сидерофоры сначала транспортируются в периплазматическое пространство с помощью белков MFS (major facilitator subtype), а затем секретируются из клеток через канал TolC при участии эффлюксной помпы RND (resistance/nodulated/cell division), заякоренной в цитоплазматической мембране (Wilson et al., 2016) (рис. 3.4.2). После связывания с железом сидерофор переносится обратно в периплазму через специальный канал, формируемый рецептором сидерофора OMR (outer membrane receptor), который располагается в наружной мембране, и белком внутренней мембраны TonB. В периплазме сидерофор доставляется к ABC-транспортеру, располагающемуся во внутренней мембране, с помощью белка PBP (periplasmic binding protein). Через этот транспортер нагруженный железом сидерофор переносится в цитоплазму (Krewulak, Vogel, 2008) (рис. 3.4.2).

Вследствие отсутствия наружной мембраны у грамположительных бактерий, транспортировка сидерофоров у них осуществляется более простым способом, чем у грамотрицательных. Секреция сидерофоров у грамположительных бактерий изучена плохо; однако недавние исследования указывают на то, что в этом процессе, как и у грамотрицательных бактерий, задействованы MFS-белки (Hannauer et al., 2015). Транспорт связанных с железом сидерофоров внутрь клетки осуществляется при участии двух компонентов: сидерофор-распознающего белка SBP (siderophore binding protein) и пермеазы, доставляющей сидерофор в цитоплазму (Krewulak, Vogel, 2008).

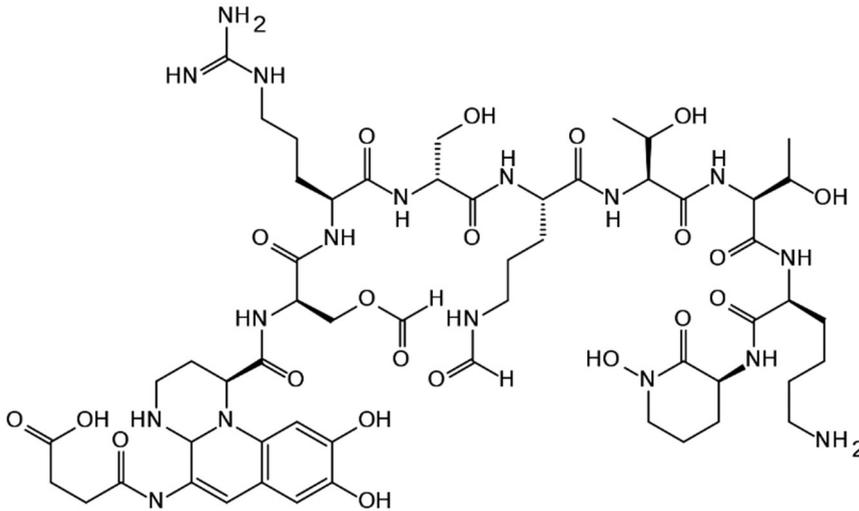
Среди фитопатогенных бактерий самым известным модельным объектом изучения сидерофоров является *Dickeya dadantii* — один из представителей энтеробактерий, вызывающих мокрые гнили растений (soft-rot *Enterobacteriaceae*). Дикеи синтезируют два разных сидерофора — ахромобактин и хризобактин (Enard et al., 1988; Franza et al., 2005) (рис. 3.4.1).



Ахромобактин (*Dickeya dadantii*)



Хризобактин (*Dickeya dadantii*)



Пиовердин (*Pseudomonas syringae*)

Рис. 3.4.1. Химическая структура сидерофоров, продуцируемых фитопатогенными бактериями.

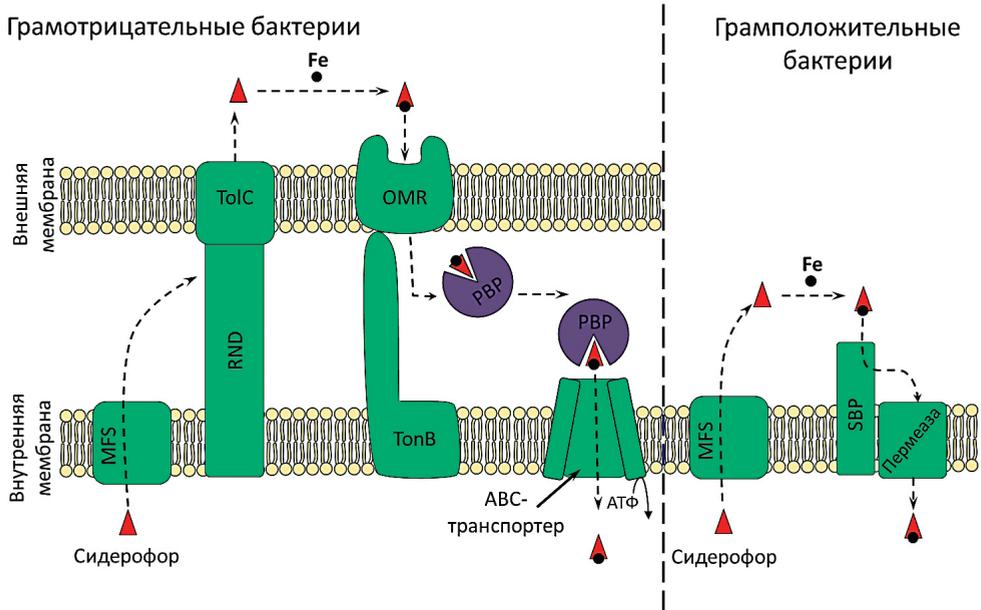


Рис. 3.4.2. Общая схема транспорта сидерофоров у грамотрицательных и грамположительных бактерий. **MFS** (major facilitator subtype) — транспортер сидерофора; **ToIC** — канал наружной мембраны; **RND** (resistance/nodulated/cell division) — эффлюксная помпа; **OMR** — рецептор сидерофора (outer membrane receptor); **TonB** — белок, осуществляющий перенос сидерофора в периплазму; **PBP** (periplasmic binding protein) — белок, связывающий сидерофор в периплазме и доставляющий его к ABC-транспортеру; **SBP** (siderophore binding protein) — сидерофор-распознающий белок. Красными треугольниками обозначены сидерофоры, черными точками — железо. Пунктирными линиями указано направление транспорта сидерофора. Дополнительные пояснения к рисунку — в тексте.

Мутации в генах, кодирующих ферменты биосинтеза как ахромобактина, так и хризобактина, приводят к снижению вирулентности микроорганизмов, что выражается уменьшением титра бактерий *in planta* и отсутствием симптомов мокрой гнили у инфицированных растений (Enard et al., 1988; Franza et al., 2005).

Сидерофоры дикей, как оказалось, выполняют две разные функции. Во-первых, как и все сидерофоры, они обеспечивают доставку в бактериальные клетки железа, которое, в частности, играет роль кофактора пектатлиаз — основных факторов вирулентности этой бактерии (Hugouvieux-Cotte-Pattat et al., 2014). Во-вторых, хризобактин обладает сигнальной активностью в отношении клеток растений, вызывая у хозяина специфическую реакцию, направленную на нейтрализацию дефицита железа. В результате этого в корнях растений активируются системы ассимиляции железа, и уровень этого элемента *in planta* повышается

(Segond et al., 2009). Такой сигнальный эффект хризобактина может быть следствием как защитной стратегии растения, так и обманной тактики, используемой патогеном для эффективной колонизации хозяина (Dellagi et al., 2009). С одной стороны, растения в ходе эволюции могли «научиться» распознавать сидерофоры и реагировать на них повышением уровня железа, которое, в свою очередь, способствует активации прооксидантных систем и индукции образования активных форм кислорода. Не исключено, что благодаря этому уровень устойчивости растений к дикейям может повышаться. С другой стороны, активируя системы ассимиляции железа хозяина, патоген, возможно, направленно повышает уровень этого элемента в своем микроокружении для увеличения эффективности колонизации тканей растения. Хотя следствия сигнальной роли сидерофоров дикейи остаются дискуссионными, вероятнее все же, что хризобактин-индуцируемая ассимиляция железа — это результат обманной тактики патогена, поскольку этот процесс приурочен к интенсивному развитию симптомов заболевания.

Помимо дикейи, многие другие фитопатогенные бактерии используют сидерофоры в качестве факторов вирулентности. Фитопатогенная псевдомонада *Pseudomonas syringae* синтезирует сидерофор пиовердин (рис. 3.4.1). «Отключение» гена, кодирующего один из ферментов биосинтеза пиовердина, значительно снижает вирулентность этой бактерии. По всей вероятности, это связано с тем, что продукция факторов вирулентности *P. syringae* (фитотоксина табтоксина, экзополисахаридов, медиаторов межклеточной коммуникации) требует высокого уровня железа в клетке (Taguchi et al., 2010).

Взаимодействие фитопатогенных ксантомонад (*Xanthomonas campestris*) с растениями тоже опосредовано сидерофором, который назван у этих микроорганизмов ксантоферрином. Уровень экспрессии генов, кодирующих ферменты его биосинтеза, повышается при колонизации растений, а нокаут этих генов приводит к снижению вирулентности микроорганизма (Pandey et al., 2017). Сидерофоры необходимы также пантоям (*Pantoea stewartii*) для колонизации хозяев, а также передвижения как в системе *in planta*, так и *in vitro* (Burbank et al., 2015). Пектобактерии (*Pectobacterium atrosepticum*), по всей видимости, тоже используют сидерофоры при «нападении» на своих хозяев, поскольку у генов, аннотированных как кодирующие ферменты биосинтеза сидерофоров, повышается уровень экспрессии при колонизации микроорганизмами растений (Gorshkov et al., 2018).

Таким образом, недостаток железа для многих фитопатогенов является фактором, лимитирующим полноценное проявление их вирулентности. Чтобы обеспечить себя этим элементом, в ходе эволюции микроорганизмы приобрели специальные «челноки» (сидерофоры), которые доставляют железо в клетки микроорганизмов из окружающей среды. Некоторые сидерофоры могут, помимо своих основных функций (транспорт железа), выполнять еще и дополнительные, например, связанные с индукцией специфических ответов растений. Помимо описанных выше сидерофоров, у фитопатогенных ксантомонад, пектобактерий, ралстоний и стрептомицетов были обнаружены сидерофор-подобные соедине-

ния, а также гены, продукты которых потенциально задействованы в их биосинтезе (Bull et al., 1996; Bhatt, Denny, 2004; Pandey, Sonti, 2010; Seipke et al., 2011); но структура и роль в патогенезе этих соединений на сегодняшний день не установлены.

Литература:

- Barry, S. M., & Challis, G. L. (2009). Recent advances in siderophore biosynthesis. *Current Opinion in Chemical Biology*, 13(2), 205–215.
- Bhatt, G., & Denny, T. P. (2004). *Ralstonia solanacearum* iron scavenging by the siderophore staphyloferrin B is controlled by PhcA, the global virulence regulator. *Journal of Bacteriology*, 186(23), 7896–7904.
- Bull, C. T., Carnegie, S. R., & Loper, J. E. (1996). Pathogenicity of mutants of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* deficient in aerobactin and catecholate siderophore production. *Phytopathology*, 86(3), 260–266.
- Burbank, L., Mohammadi, M., & Roper, M. C. (2015). Siderophore-mediated iron acquisition influences motility and is required for full virulence of the xylem-dwelling bacterial phytopathogen *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(1), 139–148.
- Dellagi, A., Segond, D., Rigault, M., Fagard, M., Simon, C., Saindrenan, P., & Expert, D. (2009). Microbial siderophores exert a subtle role in *Arabidopsis* during infection by manipulating the immune response and the iron status. *Plant Physiology*, 150(4), 1687–1696.
- Enard, C., Diolez, A., & Expert, D. (1988). Systemic virulence of *Erwinia chrysanthemi* 3937 requires a functional iron assimilation system. *Journal of Bacteriology*, 170(6), 2419–2426.
- Franza, T., Mahé, B., & Expert, D. (2005). *Erwinia chrysanthemi* requires a second iron transport route dependent of the siderophore achromobactin for extracellular growth and plant infection. *Molecular Microbiology*, 55(1), 261–275.
- Gorshkov, V., Gubaev, R., Petrova, O., Daminova, A., Gogoleva, N., Ageeva, M., Parfirova, O., Prokchorchik, M., Nikolaichik, Y., & Gogolev, Y. (2018). Transcriptome profiling helps to identify potential and true molecular switches of stealth to brute force behavior in *Pectobacterium atrosepticum* during systemic colonization of tobacco plants. *European Journal of Plant Pathology*, in press.
- Hannauer, M., Sheldon, J. R., & Heinrichs, D. E. (2015). Involvement of major facilitator superfamily proteins SfaA and SbnD in staphyloferrin secretion in *Staphylococcus aureus*. *FEBS Letters*, 589(6), 730–737.
- Hider, R. C., & Kong, X. (2010). Chemistry and biology of siderophores. *Natural Product Reports*, 27(5), 637–657.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Condemine, G., & Shevchik, V. E. (2014). Bacterial pectate lyases, structural and functional diversity. *Environmental Microbiology Reports*, 6(5), 427–440.
- Krewulak, K. D., & Vogel, H. J. (2008). Structural biology of bacterial iron uptake. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — Biomembranes*, 1778(9), 1781–1804.

Lemanceau, P., Expert, D., Gaymard, F., Bakker, P. A. H. M., & Briat, J. F. (2009). Role of iron in plant — microbe interactions. *Advances in Botanical Research*, 51, 491–549.

Loper, J. E., & Buyer, J. S. (1991). Siderophores in microbial interactions on plant surfaces. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 4(1), 5–13.

Pandey, A., & Sonti, R. V. (2010). Role of the FeoB protein and siderophore in promoting virulence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* on rice. *Journal of Bacteriology*, 192(12), 3187–3203.

Pandey, S. S., Patnana, P. K., Rai, R., & Chatterjee, S. (2017). Xanthoferrin, the α -hydroxycarboxylate-type siderophore of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, is required for optimum virulence and growth inside cabbage. *Molecular Plant Pathology*, 18(7), 949–962.

Segond, D., Dellagi, A., Lanquar, V., Rigault, M., Patrit, O., Thomine, S., & Expert, D. (2009). NRAMP genes function in *Arabidopsis thaliana* resistance to *Erwinia chrysanthemi* infection. *The Plant Journal*, 58(2), 195–207.

Seipke, R. F., Song, L., Bicz, J., Laskaris, P., Yaxley, A. M., Challis, G. L., & Loria, R. (2011). The plant pathogen *Streptomyces scabies* 87–22 has a functional pyochelin biosynthetic pathway that is regulated by TetR- and AfsR-family proteins. *Microbiology*, 157(9), 2681–2693.

Taguchi, F., Suzuki, T., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T., & Ichinose, Y. (2010). The siderophore pyoverdine of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605 is an intrinsic virulence factor in host tobacco infection. *Journal of Bacteriology*, 192(1), 117–126.

Wilson, B. R., Bogdan, A. R., Miyazawa, M., Hashimoto, K., & Tsuji, Y. (2016). Siderophores in iron metabolism: from mechanism to therapy potential. *Trends in Molecular Medicine*, 22(12), 1077–1090.

3.5. Жгутики и пили: подвижность микроорганизмов

Критерием вирулентности патогенных микроорганизмов, в том числе фитопатогенов, является их способность активно передвигаться. Эта способность необходима как на прединвазивной стадии для направленного движения в сторону организма хозяина, так и на постинвазивной, чтобы системно распространиться по растительным тканям. Для фитопатогенных организмов описаны три основных типа подвижности, которые реализуются благодаря двум субклеточным структурам. Первые два типа подвижности — плавание (*swimming motility*) и роение (*swarming motility*) — осуществляются благодаря работе жгутикового аппарата, а третий — тянущая подвижность (*twitching motility*) — за счет работы пилей.

Подвижность, зависящая от жгутикового аппарата: плавание и роение

Существует два обязательных условия для реализации плавания и роения бактерий: наличие жгутикового аппарата и способность жгутика к вращению. Мутантные формы бактерий, либо лишенные жгутиков, либо несущие парализованные (невращающиеся) жгутики, не способны ни плавать, ни роиться (Hossain et al., 2005; Ковтунов с соавт., 2013). Еще одним компонентом, координирующим подвижность бактерий, является функциональная система хемотаксиса. Эта система, представляющая собой совокупность сенсоров и регуляторов, определяющих направление вращения жгутика (по или против часовой стрелки), позволяет бактериям перемещаться в сторону аттрактантов и в противоположном направлении от репеллентов (Eisenbach, 2011).

Плавание считается наиболее простым способом подвижности, которая осуществляется бактериями в жидких средах. Плавание — это индивидуальный тип подвижности, то есть для его реализации клеткам не требуется «общаться» между собой посредством межклеточной коммуникации (Harshey, 2003).

Роение, наоборот, представляет собой пример скоординированной («социальной») подвижности. Такая подвижность осуществляется только группой клеток и реализуется в полужидких (вязких) средах. Дополнительным условием (по сравнению с плаванием) для такого типа подвижности является коммуникация клеток, которая осуществляется как при помощи низкомолекулярных диффундирующих сигнальных соединений, так и через физические контакты между отдельными клетками (Harshey, 2003; Partridge, Harshey, 2013; Harshey, Partridge, 2015).

Внешне роение в условиях *in vitro* можно визуализировать по характерному помутнению агаризованной среды за пределами зоны внесения бактерий (рис. 3.5.1). Такую зону, которая образуется в результате перемещения бактерий от места инокуляции в область аттрактанта и/или градиента питательного субстрата, принято называть макроколонией. Морфология макроколоний роящихся бактерий может различаться в зависимости от вида микроорганизма и условий культивирования и иметь как ровный концентрический вид, так и форму с различными узорами (выбросы, протуберанцы) (Verstraeten et al., 2008).

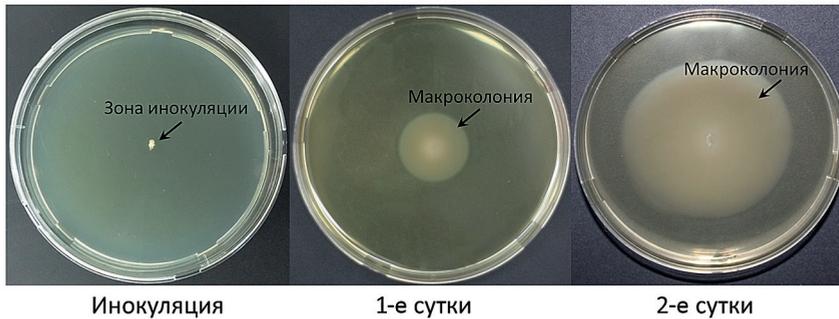


Рис. 3.5.1. Динамика формирования макроколонии роящимися клетками фитопатогенной бактерии *Pectobacterium atrosepticum*. Бактерии роятся в толще полужидкой среды (0,4% агара).

Роение часто бывает сопряжено с дифференцировкой клеток в особый морфотип, называемый швармерами. Дифференцировка в швармеры наиболее детально описана на примере условно патогенной для теплокровных бактерии *Proteus mirabilis*. При роении клетки этого микроорганизма претерпевают морфологические изменения: длина клеток увеличивается до 40 раз из-за подавления процессов деления и блокировки образования перегородок между клетками. При этом на клетках появляется большое количество дополнительных жгутиков, а также увеличивается число нуклеоидов (до 20 на клетку) (Belas, 1992). Несмотря на то, что подобный характер изменений при дифференцировке в швармеры описан для ряда видов бактерий, в том числе фитопатогенов, в большинстве случаев эти изменения не столь динамичные (масштабные), как у *Proteus mirabilis*. Существует даже специальный термин «слабые швармеры», отражающий слабое увеличение линейных размеров и незначительное увеличение количества жгутиков при переходе к роению, а также способность передвигаться только в слабвязких средах, но не в средах повышенной плотности (более 0,6% агара) (Ермилова с соавт., 2004; Partridge, Harshey, 2013).

Жгутики, необходимые для реализации плавания и роения, выполняют локомоторную функцию и являются сложной структурой, включающей три основных компонента: 1) филамент — длинная внешняя нить, состоящая из белка флагеллина; 2) крюк — гибкая изогнутая структура, соединяющая филамент с базальным телом; 3) базальное тело — комплекс, обеспечивающий закрепление жгутика в клеточной стенке, а также его вращение (Macnab, 1992, 1999; Bardy et al., 2003) (рис. 3.5.2). Энергия для вращения жгутикового мотора генерируется за счет трансмембранного протонного потенциала ионов H^+ или Na^+ (Скулачев, 1989), а в некоторых случаях — K^+ , Rb^+ , Ca^{2+} и Mg^{2+} (Terahara et al., 2012; Imazawa et al., 2016).

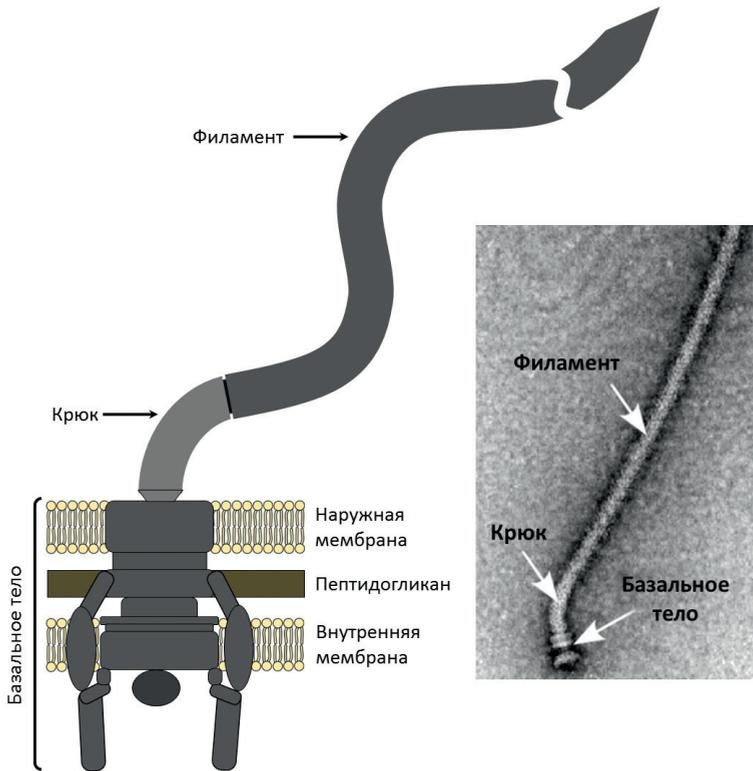


Рис. 3.5.2. Схема и микрофотография
(<https://phys.org/news/2017-08-panomachines-bacteria.html>) жгутика бактерий.

Направление движения бактерий может корректироваться микроорганизмами благодаря связи жгутикового мотора с системами хеморецепции, которые воспринимают аттрактанты и репелленты и передают сигнал, определяя таким образом направление вращения жгутика (Armitage, 1992; Hazelbauer et al., 2008). Хеморецепторные системы, как правило, состоят из сенсорного белка (киназы), воспринимающего сигнал и передающего его на второй компонент — регулятор ответа, который, в свою очередь, взаимодействует со жгутиковым мотором. Вращение всех жгутиков против часовой стрелки позволяет формировать из них пучок на одном из полюсов клетки, который функционирует как пропеллер и толкает клетку вперед. При отсутствии аттрактанта в среде или в присутствии репеллента, регулятор ответа фосфорилируется и связывается со жгутиковым мотором, изменяя таким образом направление вращения жгутика. Изменение направления вращения жгутиков заставляет единый пучок жгутиков распасться, что меняет траекторию движения клетки. Таким образом, бактериальный мотор вращается по часовой стрелке в присутствии репеллента, а в отсутствие репеллента — против часовой (Eisenbach, 2011).

Важность компонентов жгутикового аппарата в колонизации растений-хозяев была неоднократно продемонстрирована на примере фитопатогенных бактерий. Мутанты *Agrobacterium tumefaciens* по генам моторного компонента жгутикового аппарата не были способны колонизировать ризосферу (Shaw et al., 1991), а «отключение» хемосенсорной системы приводило к значительному снижению вирулентности этих микроорганизмов (Hawes, Smith, 1989). Штаммы *Ralstonia solanacearum*, не синтезирующие жгутики, а также дефектные по компонентам жгутикового мотора и хемосенсорным системам, характеризовались сниженной вирулентностью (Tans-Kersten et al., 2001). Неподвижные мутанты возбудителя мягких гнилей *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* сохраняли способность мацерировать растительные ткани, однако область проявления симптомов заболевания была значительно меньше, чем в случае родительского штамма (Hossain et al., 2005).

Помимо подвижности, жгутики могут участвовать и в таких процессах, как адгезия, формирование биопленок, а также секреция факторов вирулентности (Aroga et al., 1998; Young et al., 1999; Konkel et al., 2004; Neal-McKinney et al., 2010). Таким образом, жгутики являются полифункциональными структурами, которые придают микробным клеткам различные свойства, в частности определяющие вирулентность. В то же время жгутики, а точнее фрагменты флагеллина, являются универсальными элиситорами, то есть соединениями, которые распознаются в растительной клетке как сигнал опасности и индуцируют защитный ответ (Tanaka et al., 2003; Zipfel et al., 2004; Takai et al., 2008). Следовательно, роль жгутикового аппарата в растительно-микробном взаимодействии дуалистична.

Для того чтобы бактериальные жгутики оставались «невидимыми» для защитных систем растений, патогенные организмы в процессе эволюции приобрели способность разными способами экранировать элиситорные свойства флагеллинов. Во-первых, в генах флагеллинов некоторых микроорганизмов закрепились мутации, которые не мешают работе жгутика, но препятствуют распознаванию его участков защитными системами растений (Clarke et al., 2013). Во-вторых, флагеллины могут подвергаться значительным посттрансляционным модификациям, таким как гликозилирование (Moens et al., 1995), фосфорилирование (Kelly-Wintenberg et al., 1993), метилирование (Ambler, Rees, 1959) и сульфатирование (Wieland et al., 1985), что блокирует их взаимодействие с рецепторами, активирующими иммунный ответ (Taguchi et al., 2009). В-третьих, многие фитопатогены в процессе эволюции приобрели специальные гены, которые кодируют белки, препятствующие передаче сигнала в растительных клетках при распознавании фрагментов молекул флагеллинов (Dodds, Rathjen, 2010; Spoel, Dong, 2012; Macho, Zipfel, 2015). Механизмы распознавания и передачи сигнала флагеллина в растительной клетке подробно описаны в главе 6.1 «Количественная устойчивость». В-четвертых, некоторые фитопатогены, например *Pseudomonas syringae*, после того как достигнут «нужного» компартмента в организме хозяина, перестают синтезировать компоненты жгутикового аппарата, переходя на «оседлый образ жизни», что позволяет предотвратить активацию защитных систем растения (Yu et al., 2013; Chaban et al., 2015).

Подвижность, зависящая от пилей: тянущая подвижность

Еще одним типом «социальной» подвижности является тянущая подвижность (twitching motility). В отличие от роения, этот тип подвижности осуществляется не за счет работы жгутикового аппарата, а посредством других структур — пилей, или фимбрий (Mattick, 2002; Giltner et al., 2012). Эти структуры представляют собой нитевидные белковые филаменты длиной 1–4 мкм и внешним диаметром до 8 нм, основной единицей которых является белок пилин (Mattick, 2002; Ермилова с соавт., 2004). Вообще пили — это очень разнообразные структуры, которые в первую очередь определяют адгезивные свойства микробных клеток, то есть способность к прикреплению как к абиотическим поверхностям, так и друг к другу и к организму хозяина (Burtows, 2012). Но есть группа пилей (пили IV типа), которые, помимо обеспечения адгезии, позволяют бактериям передвигаться. Аппарат для сборки и функционирования таких пилей включает, помимо пилина, следующие компоненты: 1) интегральный мембранный белок препилин пептидаза (PilD), отрезающий сигнальную последовательность препилина; 2) белок наружной мембраны секретин (PilQ), необходимый для вывода субъединиц пилина за пределы клетки; 3) белок PilB, осуществляющий полимеризацию пилина, удлинняя таким образом пили; 4) белок PilC1, образующий на конце пили своеобразную «шапочку», необходимую для ее прикрепления к поверхности; 5) АТФаза (PilT) в основании пили, поставляющая энергию для «сокращения» органеллы (Burdman et al., 2011) (рис. 3.5.3). Функции еще одного компонента — белка PilG до конца не изучены, но, по мнению некоторых авторов, этот белок взаимодействует с АТФазой, передавая ей сигналы из окружающей среды (Ермилова с соавт., 2004). Тянущая подвижность осуществляется благодаря тому, что пили IV типа «сокращаются» за счет их последовательной сборки и деполимеризации. Благодаря этому клетка как бы подтягивается в нужном направлении, совершая движения, которые напоминают подергивание.

Роль пилей, обеспечивающих тянущую подвижность, в колонизации растений была продемонстрирована на примере фитопатогенных бактерий (Van Doorn et al., 1994; Ojanen-Reuhs et al., 1997; Meng et al., 2005; Das et al., 2009; Wairuri et al., 2012). Необходимо отметить, что тянущая подвижность имеет одно важное преимущество по сравнению со жгутик-зависимой подвижностью для патогенов, системно распространяющихся по сосудам ксилемы. Для такого системного распространения по ксилеме бактериям бывает необходимо перемещаться не только вверх, что легко осуществить благодаря транспирационному току, но и вниз (против течения), чтобы колонизировать подземные органы и придаточные побеги. Жгутиковая подвижность не может обеспечить перемещение бактерий против транспирационного тока, поскольку скорость такого передвижения микроорганизмов уступает скорости ксилемного потока на несколько порядков величин. В случае же тянущей подвижности противодействующий ток жидкости не оказывает влияния на движение микроорганизмов, поскольку бактерии при реализации такой подвижности прикрепляются к стенке сосуда и «подтягивают» себя в нужном направлении за счет «сокращения» пилей. Видимо, поэтому мутации в генах,

кодирующих компоненты пилей, в большей степени сказываются на вирулентности васкулярных патогенов, то есть тех, которые интенсивно колонизируют сосуды ксилемы, чем на паразитах, обитающих только в паренхимных тканях.

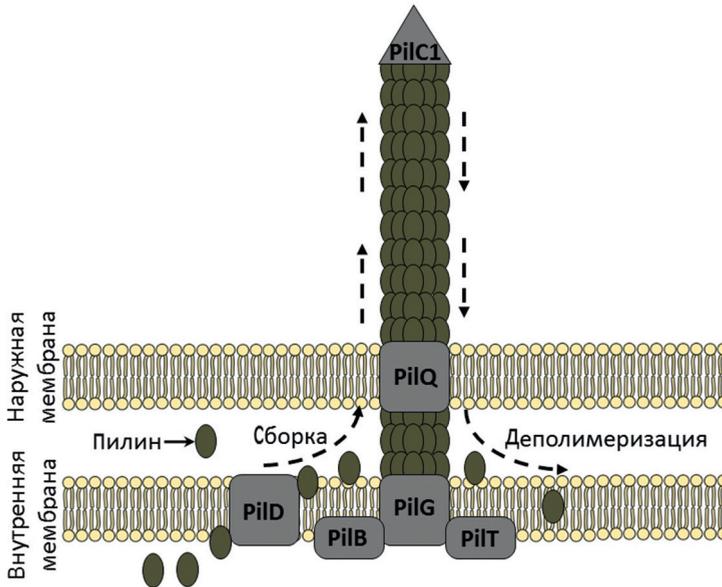


Рис. 3.5.3. Схема белков, обеспечивающих сборку и работу пилей IV типа (по: Burdman et al., 2011). **PilD** — препилин пептидаза; **PilQ** — белок наружной мембраны секретин; **PilB** — белок, осуществляющий полимеризацию пилина; **PilC1** — белок, образующий «шапочку» на конце пилей; **PilT** — АТФаза; **PilG** — предполагаемый регулятор АТФазы.

Движение при помощи тянущей подвижности против тока жидкости было наглядно продемонстрировано с использованием проточных микрокамер, которые имитируют сосуды ксилемы растений, для *Xylella fastidiosa* — сосудистого патогена винограда и ряда других культур (Meng et al., 2005). Нокаутирование генов белков, отвечающих за работу пилей IV типа, значительно снижало вирулентность этой бактерии, в том числе способность к системному распространению по растению-хозяину. Мутанты *Ralstonia solanacearum*, дефектные по тянущей подвижности, также характеризовались сниженной вирулентностью в отношении растений томата (Wairuri et al., 2012). У фитопатогена представителей семейства тыквенных *Acidovorax citrulli*, который колонизирует как паренхиму, так и ксилему, при «отключении» пилей IV типа сохранялась способность колонизировать коровую паренхиму и вызывать локальное развитие симптомов заболевания в месте инокуляции, но значительно снижалась эффективность системного распространения бактерий по сосудистой системе (Bahar et al., 2010). У представителей рода *Xanthomonas* мутации в генах, связанных с пилеями IV типа, снижали виру-

лентность только у тех микроорганизмов, чей жизненный цикл приурочен к сосудам ксилемы, но не тех, которые сосуды не колонизируют (Van Doorn et al., 1994; Ojanen-Reuhs et al., 1997; Das et al., 2009).

Таким образом, важным критерием вирулентности фитопатогенных микроорганизмов является их способность активно передвигаться при помощи жгутиков и пилей в теле растения-хозяина. Причем для некоторых фитопатогенов показана роль обеих структур (и жгутиков, и пилей) в детерминировании вирулентности. По всей вероятности, разные способы подвижности необходимы для реализации разных этапов взаимодействия макро- и микроорганизмов, а также колонизации разных компартментов организма хозяина.

Литература:

- Ермилова, Е. В., Залуцкая, Ж. М., & Лапина, Т. В. (2004). Подвижность и поведение микроорганизмов (Ч. 1. Прокариоты). С.-Петербург: Изд-во Санкт-Петербургского университета.
- Ковтунов, Е. А., Шелудько, А. В., Чернышова, М. П., Петрова, Л. П., & Кацы, Е. И. (2013). Мутанты бактерии *Azospirillum brasilense* Sp245 со вставкой омегона в генах липидного метаболизма *mmsB* или *fabG* дефектны по подвижности и жгутикованию. *Генетика*, 49(11), 1270–1270.
- Скулачев, В. П. (1989). Энергетика биологических мембран. Москва: Изд-во Наука.
- Ambler, R. P., & Rees, M. W. (1959). ϵ -N-Methyl-lysine in bacterial flagellar protein. *Nature*, 184(4679), 56–57.
- Armitage, J. P. (1992). Behavioral responses in bacteria. *Annual Review of Physiology*, 54(1), 683–714.
- Arora, S. K., Ritchings, B. W., Almira, E. C., Lory, S., & Ramphal, R. (1998). The *Pseudomonas aeruginosa* flagellar cap protein, FliD, is responsible for mucin adhesion. *Infection and Immunity*, 66(3), 1000–1007.
- Bahar, O., De La Fuente, L., & Burdman, S. (2010). Assessing adhesion, biofilm formation and motility of *Acidovorax citrulli* using microfluidic flow chambers. *FEMS Microbiology Letters*, 312(1), 33–39.
- Bardy, S. L., Ng, S. Y., & Jarrell, K. F. (2003). Prokaryotic motility structures. *Microbiology*, 149(2), 295–304.
- Belas, R. (1992). The swarming phenomenon of *Proteus mirabilis*. Intercellular communication and multicellular interactions may provide clues to this 100-year-old mystery. *ASM American Society for Microbiology News*, 58(1), 15–22.
- Burdman, S., Bahar, O., Parker, J. K., & De La Fuente, L. (2011). Involvement of type IV pili in pathogenicity of plant pathogenic bacteria. *Genes*, 2(4), 706–735.
- Burrows, L. L. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility: type IV pili in action. *Annual Review of Microbiology*, 66, 493–520.

Chaban, B., Hughes, H. V., & Beeby, M. (2015). The flagellum in bacterial pathogens: for motility and a whole lot more. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 46, 91–103.

Clarke, C. R., Chinchilla, D., Hind, S. R., Taguchi, F., Miki, R., Ichinose, Y., ... & Vinatzer, B. A. (2013). Allelic variation in two distinct *Pseudomonas syringae* flagellin epitopes modulates the strength of plant immune responses but not bacterial motility. *New Phytologist*, 200(3), 847–860.

Das, A., Rangaraj, N., & Sonti, R. V. (2009). Multiple adhesin-like functions of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* are involved in promoting leaf attachment, entry, and virulence on rice. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(1), 73–85.

Dodds, P. N., & Rathjen, J. P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant—pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics*, 11(8), 539–548.

Eisenbach, M. (2011). Bacterial chemotaxis. *eLS*, John Wiley & Sons.

Giltner, C. L., Nguyen, Y., & Burrows, L. L. (2012). Type IV pilin proteins: versatile molecular modules. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(4), 740–772.

Harshey, R. M. (2003). Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annual Reviews in Microbiology*, 57(1), 249–273.

Harshey, R. M., & Partridge, J. D. (2015). Shelter in a swarm. *Journal of Molecular Biology*, 427(23), 3683–3694.

Hawes, M. C., & Smith, L. Y. (1989). Requirement for chemotaxis in pathogenicity of *Agrobacterium tumefaciens* on roots of soil-grown pea plants. *Journal of Bacteriology*, 171(10), 5668–5671.

Hazelbauer, G. L., Falke, J. J., & Parkinson, J. S. (2008). Bacterial chemoreceptors: high-performance signaling in networked arrays. *Trends in Biochemical Sciences*, 33(1), 9–19.

Hossain, M. M., Shibata, S., Aizawa, S. I., & Tsuyumu, S. (2005). Motility is an important determinant for pathogenesis of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 66(4), 134–143.

Imazawa, R., Takahashi, Y., Aoki, W., Sano, M., & Ito, M. (2016). A novel type bacterial flagellar motor that can use divalent cations as a coupling ion. *Scientific Reports*, 6, 19773.

Kelly-Wintenberg, K., South, S. L., & Montie, T. C. (1993). Tyrosine phosphate in a- and b-type flagellins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 175(8), 2458–2461.

Konkel, M. E., Klena, J. D., Rivera-Amill, V., Monteville, M. R., Biswas, D., Raphael, B., & Mickelson, J. (2004). Secretion of virulence proteins from *Campylobacter jejuni* is dependent on a functional flagellar export apparatus. *Journal of Bacteriology*, 186(11), 3296–3303.

Macho, A. P., & Zipfel, C. (2015). Targeting of plant pattern recognition receptor-triggered immunity by bacterial type-III secretion system effectors. *Current Opinion in Microbiology*, 23, 14–22.

Macnab, R. M. (1992). Genetics and biogenesis of bacterial flagella. *Annual Reviews of Genetics*, 26(1), 131–158.

Macnab, R. M. (1999). The bacterial flagellum: reversible rotary propeller and type III export apparatus. *Journal of Bacteriology*, 181(23), 7149–7153.

Mattick, J. S. (2002). Type IV pili and twitching motility. *Annual Reviews in Microbiology*, 56(1), 289–314.

Meng, Y., Li, Y., Galvani, C. D., Hao, G., Turner, J. N., Burr, T. J., & Hoch, H. C. (2005). Upstream migration of *Xylella fastidiosa* via pilus-driven twitching motility. *Journal of Bacteriology*, 187(16), 5560–5567.

Moens, S., Michiels, K., & Vanderleyden, J. (1995). Glycosylation of the flagellin of the polar flagellum of *Azospirillum brasilense*, a gram-negative nitrogen-fixing bacterium. *Microbiology*, 141(10), 2651–2657.

Neal-McKinney, J. M., Christensen, J. E., & Konkel, M. E. (2010). Amino-terminal residues dictate the export efficiency of the *Campylobacter jejuni* filament proteins via the flagellum. *Molecular Microbiology*, 76(4), 918–931.

Ojanen-Reuhs, T., Kalkkinen, N., Westerlund-Wikström, B., Van Doorn, J., Haahtela, K., Nurmiaho-Lassila, E. L., ... & Korhonen, T. K. (1997). Characterization of the *fimA* gene encoding bundle-forming fimbriae of the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Journal of Bacteriology*, 179(4), 1280–1290.

Partridge, J. D., & Harshey, R. M. (2013). Swarming: flexible roaming plans. *Journal of Bacteriology*, 195(5), 909–918.

Shaw, C. H., Loake, G. J., Brown, A. P., Garrett, C. S., Deakin, W., Alton, G., ... & Primavesi, L. (1991). Isolation and characterization of behavioural mutants and genes of *Agrobacterium tumefaciens*. *Microbiology*, 137(8), 1939–1953.

Spoel, S. H., & Dong, X. (2012). How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature Reviews Immunology*, 12(2), 89–100.

Taguchi, F., Suzuki, T., Takeuchi, K., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T., & Ichinose, Y. (2009). Glycosylation of flagellin from *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605 contributes to evasion of host tobacco plant surveillance system. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 74(1), 11–17.

Takai, R., Isogai, A., Takayama, S., & Che, F. S. (2008). Analysis of flagellin perception mediated by flg22 receptor OsFLS2 in rice. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(12), 1635–1642.

Tanaka, N., Che, F. S., Watanabe, N., Fujiwara, S., Takayama, S., & Isogai, A. (2003). Flagellin from an incompatible strain of *Acidovorax avenae* mediates H₂O₂ generation accompanying hypersensitive cell death and expression of PAL, Cht-1, and PBZ1, but not of Lox in rice. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16(5), 422–428.

Tans-Kersten, J., Huang, H., & Allen, C. (2001). *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato. *Journal of Bacteriology*, 183(12), 3597–3605.

Terahara, N., Sano, M., & Ito, M. (2012). A *Bacillus* flagellar motor that can use both Na⁺ and K⁺ as a coupling ion is converted by a single mutation to use only Na⁺. *PLoS ONE*, 7(9), e46248.

Van Doorn, J., Boonekamp, P. M., & Oudega, B. (1994). Partial characterization of fimbriae of *Xanthomonas campestris* pv. *hyacinthi*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 7(3), 334–344.

Verstraeten, N., Braeken, K., Debkumari, B., Fauvart, M., Fransaer, J., Vermant, J., & Michiels, J. (2008). Living on a surface: swarming and biofilm formation. *Trends in Microbiology*, 16(10), 496–506.

Wairuri, C. K., Van der Waals, J. E., Van Schalkwyk, A., & Theron, J. (2012). *Ralstonia solanacearum* needs Flp pili for virulence on potato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(4), 546–556.

Wieland, F., Paul, G., & Sumper, M. (1985). Halobacterial flagellins are sulfated glycoproteins. *Journal of Biological Chemistry*, 260(28), 15180–15185.

Young, G. M., Schmiel, D. H., & Miller, V. L. (1999). A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(11), 6456–6461.

Yu, X., Lund, S. P., Scott, R. A., Greenwald, J. W., Records, A. H., Nettleton, D., ... & Beattie, G. A. (2013). Transcriptional responses of *Pseudomonas syringae* to growth in epiphytic versus apoplastic leaf sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(5), 425–434.

Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E. J., Jones, J. D., Felix, G., & Boller, T. (2004). Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature*, 428(6984), 764–767.

3.6. Бактериальные экзополисахариды

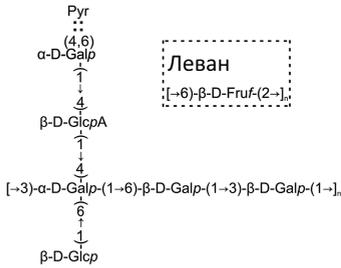
Важную роль во взаимодействии фитопатогенных бактерий с растениями играют полисахариды, секретируемые из бактериальных клеток в окружающую среду, которые называются экзополисахаридами (ЭПС). Эти полимеры выполняют множество разных функций. Они служат структурными элементами в бактериальной популяции, обеспечивают адгезию микроорганизмов, защищают клетки от неблагоприятных факторов, являясь важными факторами вирулентности. ЭПС были описаны на примере многих видов фитопатогенных бактерий: *Erwinia amylovora* (амиловоран, леван), *Xanthomonas campestris* (ксантан), *Pantoea stewartii* (стевартан), *Xylella fastidiosa* (фастидиан), *Clavibacter michiganensis* (клаван), *Agrobacterium tumefaciens* (сукциногликан, курдлан, целлюлоза), *Pseudomonas syringae* (альгинат), а также *Dickeya dadantii*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas oryzae* (рис. 3.6.1, табл. 3.6.1).

В отличие от растительных полисахаридов, которые образуются путем пошагового присоединения единичного моносахарида к растущей цепи сложного углевода, синтез большинства бактериальных ЭПС осуществляется блочно. Отдельные блоки (повторяющиеся звенья) формируются в цитоплазме и транспортируются в периплазму, где после соединения друг с другом переносятся за пределы клетки. В результате такого способа синтеза образующийся полимер имеет регулярное строение, то есть состоит из повторяющихся одинаковых олигосахаридных блоков (Reid, Cuthbertson, 2012; Zivkovic et al., 2015).

Некоторые микроорганизмы могут синтезировать несколько разных ЭПС; при этом их количественное соотношение может определяться условиями существования бактерий. Так, например, при культивировании *in vitro* в среде с высоким содержанием сахарозы *Erwinia amylovora* преимущественно синтезирует леван, а в присутствии растительных метаболитов или в системе *in planta* эти бактерии производят два типа ЭПС (амиловоран и леван) примерно в одинаковом соотношении (Gross et al., 1992; Mehmood et al., 2015). Помимо образования разных по моносахаридному составу ЭПС, разнообразие этих полимеров определяется нематричным характером синтеза полисахаридов, что может делать две молекулы одного и того же типа полимера не абсолютно похожими друг на друга. В случае фитопатогенных бактерий подобная вариабельность ЭПС продемонстрирована на примере ряда микроорганизмов: *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas oryzae*, *Clavibacter michiganensis*, *Pseudomonas syringae*. При колонизации растений эти фитопатогены синтезируют больший по молекулярной массе ЭПС, чем в условиях *in vitro* (Angadi, 1978; Bennett, Billing, 1980; Fett, Dunn, 1989; Van der Bulk et al., 1991). Это может быть связано как с увеличением степени полимеризации полисахаридов, синтезируемых при взаимодействии бактерий с растениями, так и с агрегацией отдельных молекул. По всей видимости, такого рода вариабельность и микрогетерогенность ЭПС является основой для их полифункциональности.

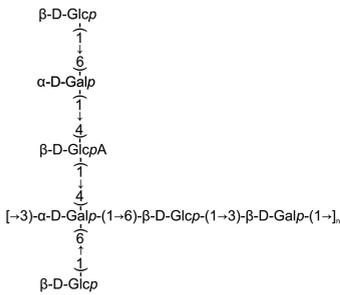
Erwinia amylovora

Амиловоран



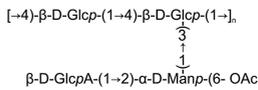
Pantoea stewartii

Стевартан



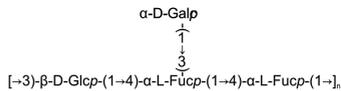
Xylella fastidiosa

Фастидиан

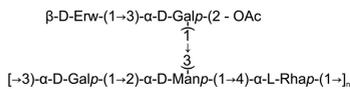


Clavibacter michiganensis

Клаван

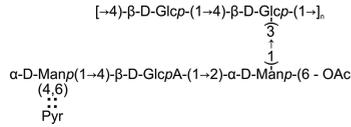


Pectobacterium atrosepticum

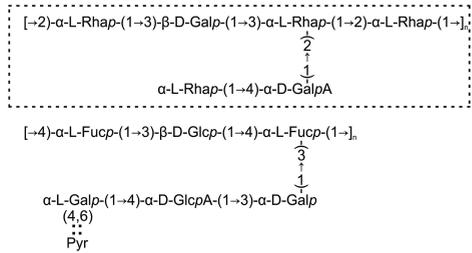
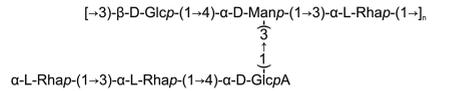


Xanthomonas campestris

Ксантан

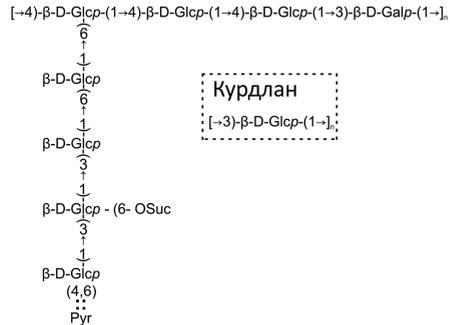


Dickeya dadantii



Agrobacterium tumefaciens

Сукциногликан



Pseudomonas syringae

Альгинат

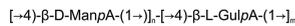


Рис. 3.6.1. Структура повторяющихся звеньев различных экзополисахаридов

фитопатогенных бактерий. **Fru** — фруктоза, **Fuc** — фукоза, **Rha** — рамноза, **Glc** — глюкоза, **Gal** — галактоза, **Man** — манноза, **GlcA** — глюкуроновая кислота, **GalA** — галактуроновая кислота, **ManA** — маннуроновая кислота, **GulA** — гулуруновая кислота, **Erw** — эрвиниоза, **OAc** — ацетильная группа, **OSuc** — сукцинильная группа, **Pyr** — пирувильная группа, **p** — пиранозная форма моносахарида, **f** — фуранозная форма моносахарида.

Таблица 3.6.1.

Экзопполисахариды фитопатогенных бактерий. Fru — фруктоза, Fuc — фукоза, Rha — рамноза, Glc — глюкоза, Gal — галактоза, Man — манноза, GlcA — глюкуроновая кислота, GalA — галактуроновая кислота, ManA — маннуриновая кислота, GulA — гулуриновая кислота, GlcNAc — N-ацетилглюкозамин, Ergw — эрвиниоза.

Микроорганизм-продуцент	Название	Моносахаридный состав	Функции при взаимодействии с растением	Ссылки
<i>Pseudomonas syringae</i>	Альгинат	ManpA:GulpA (1:1)	Защита от АФК, хелатирование Ca ²⁺	Laue et al., 2008
<i>Pantoea stewartii</i>	Стевартан	Glc:Gal:GalA (3:3:1)	Биосурфактант	Coplin, Cook, 1990; Netter et al., 2008
<i>Clavibacter michiganensis</i>	Клаван	Glc:Gal:Fuc (1:1:2)	Васкулярная дисфункция	Van der Bulk et al., 1991
<i>Xylella fastidiosa</i>	Фастидиан	Glc:Man:GlcA (2:1:1)	Образование биопленок в сосудах ксилемы; васкулярная дисфункция	Roper et al., 2007
<i>Erwinia amylovora</i>	Амиловоран	Glc:Gal:GlcA (1:4:1)	Васкулярная дисфункция, защита от агглютинации и АФК	Romeiro et al., 1981; Kiraly et al., 1997
<i>Xanthomonas campestris</i>	Леван	Fru	Колонизация растительных тканей	Geier, Geider, 1993
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Ксантан	Glc:Man:GlcA (2:2:1)	Васкулярная дисфункция; хелатирование кальция	Bianco et al., 2016
<i>Ralstonia solanacearum</i>	Сукциноглицан	Glc:Gal (7:1)	Стрессоустойчивость	Tomlinson et al., 2010
	Курдлан	Glc	Стрессоустойчивость	Miller, Gore, 1992
	Целлюлоза	Glc	Адгезия к растительным клеткам	Matthysse et al., 1981, 2005
	—	Glc:GlcA:GlcNAc (1:1:1)	Васкулярная дисфункция, защита от АФК	Milling et al., 2011
	—	Rha:Gal:GalA (4:1:1)	Васкулярная дисфункция	Gray et al., 2000
<i>Dickeya dadantii</i> (<i>Erwinia chrysanthemi</i>)	—	Rha:Glc:Man:GlcA (3:1:1:1)	Васкулярная дисфункция	Yang et al., 1994
<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	—	Glc:Gal:Fuc:GlcA (1:2:2:1)	Васкулярная дисфункция	Ding et al., 2004
	—	Rha:Gal:Man:Ergw (1:2:1:1)	Образование эмболов в сосудах ксилемы	Gorshkov et al., 2017

Структурная функция ЭПС заключается в обеспечении объединения отдельных микробных клеток в единые 3D-структуры, напоминающие ткани многоклеточного организма. К таким структурам относятся микроколонии, агрегаты, маты и биопленки; образование последних часто является необходимым условием для успешной колонизации растения-хозяина (см. главу 3.8). При сборке таких «многоклеточных» структур ЭПС служат в качестве основного компонента экстраклеточного матрикса, который склеивает клетки друг с другом. Возможность формирования такого матрикса обеспечивается свойствами ЭПС: отдельные молекулы этих полимеров способны взаимодействовать как друг с другом, так и с гетерологичными молекулами (белки, липиды, нуклеиновые кислоты) электростатическими, дисперсионными и вандерваальсовыми силами, а также образуя водородные связи и взаимодействуя через поливалентные катионы (Sutherland, 2001; Jennings et al., 2015). Благодаря этому формируется достаточно прочная и эластичная межмолекулярная сеть, которая объединяет отдельные клетки в единую систему. Такое объединение клеток является необходимым условием для координированной продукции факторов вирулентности и противостояния стрессовым воздействиям (см. главы 3.8 и 4.1).

Способность ЭПС к формированию комплексов определяется особенностями структуры этих молекул. Несмотря на то, что основными компонентами этих полимеров являются нейтральные моносахариды, в состав ЭПС могут также входить заряженные уоновые кислоты, а также разнообразные модифицирующие группы (метоксильная, ацетильная, пирувильная, сукцинильная), которые и определяют способность этих полимеров образовывать гомо- и гетерологичные комплексы и формировать вязкие гелеподобные субстанции (Sutherland, 2001). Хорошо известный ЭПС возбудителя бурой гнили *Xanthomonas campestris* — ксантан, остов которого состоит из нейтральных β -1,4-D-глюкозильных остатков, содержит в боковых цепях заряженную глюкуроновую кислоту, а также остатки нейтрального моносахарида маннозы, к которым присоединены заряженные метоксильные, ацетильные и пирувильные группы. Показано, что пирувильные и ацетильные группы определяют вязкость водных растворов ксантана (Silva et al., 2009). Присутствие этих групп также придает желеобразующие свойства амиловорану (ЭПС возбудителя бактериального ожога плодовых деревьев *Erwinia amylovora*) и клавану (ЭПС *Clavibacter michiganensis*, вызывающего кольцевую гниль картофеля) (Nimtz et al., 1996; Vanhooren, Vandamme, 2000).

Особое значение желеобразующие свойства ЭПС имеют для колонизации бактериями сосудов ксилемы. Как правило, патогены, обитающие преимущественно в сосудах ксилемы и вызывающие васкулярную дисфункцию (закупорку сосудов), например, такие как *Erwinia amylovora*, *Xylella fastidiosa*, *Pantoea stewartii*, производят ЭПС в большем количестве, чем патогены, колонизирующие паренхимные ткани (Leigh, Coplin, 1992; Bae et al., 2015). Большое количество ЭПС таким патогенам необходимо для увеличения вязкости ксилемного сока, что позволяет уменьшить интенсивность транспирационного потока, который негативно сказывается на «социальном поведении» микробов (см. главу 4.1).

Адгезивные функции ЭПС заключаются в обеспечении прочного связывания микробных клеток с колонизируемыми поверхностями, в том числе клетками растений. Прикрепление к клеткам хозяина необходимо фитопатогенам как при колонизации покровов растения на инвазивной стадии взаимодействия, так и при колонизации сосудов ксилемы, в которых интенсивный водный поток может препятствовать проявлению вирулентности микроорганизма. Первый этап прикрепления бактерий к поверхностям обычно связывают с работой пилей и белков адгезинов (O'Toole et al., 2000; Donlan, 2002). На следующем этапе выделение ЭПС значительно увеличивает силу адгезии бактерий благодаря электростатическим, вандерваальсовым и гидродинамическим силам и водородным связям (Maier, 1999; Dunne, 2002). Кроме того, ЭПС могут увеличивать эффективность передвижения бактерий, в том числе в тканях растения, выполняя функцию сурфактанта (поверхностно-активного вещества), снижающего поверхностное натяжение воды (Neu et al., 1992; Flemming, Wingender, 2010). Таким свойством, например, обладает стевартан — ЭПС, синтезируемый *Pantoea stewartii* (Herrera et al., 2008).

Защитные функции ЭПС определяются несколькими свойствами этих полимеров. Вследствие гидрофильности ЭПС предохраняют клетки от высыхания, что особенно актуально при колонизации покровов растений (филлосфера) (Yu et al., 1999). Благодаря ионообменным свойствам, ЭПС могут препятствовать поступлению в клетку токсичных соединений (Gilbert et al., 1997; Wadström et al., 2012). Так, например, показано, что амиловоран способен связывать токсичный для бактерий белок растений, вызывающий агглютинацию (склеивание и лизис) клеток патогена (Romeiro et al., 1981).

ЭПС способны также предохранять клетки бактерий от действия активных форм кислорода (АФК), снижая разными способами их уровень в тканях инфицированных растений. Во-первых, ЭПС могут непосредственно осуществлять детоксикацию АФК восстанавливающим концом полимера и/или при помощи сукцинильных групп (Lehman, Long, 2013). Во-вторых, ЭПС способны репрессировать работу НАДФН-оксидазы растений — фермента, ответственного за генерацию АФК (Bylund et al., 2006). В-третьих, эти полимеры индуцируют антиоксидантные системы растения-хозяина, обеспечивающие детоксикацию АФК при инфекции (Prakasha et al., 2017). В-четвертых, ЭПС хелатируют (связывают) ионы кальция, которые выступают в качестве индукторов образования АФК при инфекции (см. главу 6.1) (Емельянов с соавт., 2008; Bianco et al., 2016). В-пятых, ЭПС способны связывать восстановленную форму железа, необходимую для генерирования гидроксильного радикала в ходе реакции Фентона (Cho et al., 2013) (см. главу 5.3, рис. 5.3.1).

ЭПС могут также функционировать в качестве «шапки-невидимки», которая экранирует антигенные детерминанты на поверхности клеток патогена и делает его «невидимым» для организма хозяина. Так, инфильтрация в растения ЭПС ксантана препятствует развитию защитного ответа (реакция гиперчувствительности) после инфицирования авирулентными штаммами *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*, которые активируют эту реакцию, если растения предваритель-

но не обрабатывают ксантаном (Leigh, Couplin, 1992). Кроме того, ЭПС могут предотвращать связывание бактериальных клеток растительными агглютинидами, которые иммобилизуют патоген и приводят к его элиминации. Еще на заре исследований ультраструктурных аспектов взаимодействия фитопатогенных бактерий и растений было обнаружено, что при инфекции в растении образуются субстанции, которые «прилипают» к клеткам авирулентных микроорганизмов, что в конечном счете приводит к их гибели; при этом на поверхности вирулентных штаммов бактерий формируются капсулы (состоящие из ЭПС), которые препятствуют «прилипанию» этих субстанций к бактериальным клеткам (Huang et al., 1975; Goodman, 1978). Действительно, оказалось, что не производящие ЭПС штаммы *Erwinia amylovora*, *Pantoea stewartii*, *Ralstonia solanacearum* связываются растительными агглютинидами, а штаммы этих же видов бактерий, синтезирующие ЭПС, — нет (Bradshaw-Rouse et al., 1981; Young, Sequeira, 1986; Menggad, Laurent, 1998). В то же время показано, что ЭПС сами могут обладать элиситорными свойствами, то есть распознаваться растением-хозяином как сигнал опасности, приводя к индукции защитных систем макроорганизма. Так, показано, что ЭПС *Pseudomonas syringae*, *Pantoea agglomerans*, *Xanthomonas campestris* и *Agrobacterium tumefaciens* (Romeiro, Kimura, 1997; de Pinto et al., 2003; Fu et al., 2011) индуцируют в растениях такие иммунные ответы, как синтез фитоалексинов, индукция АФК, а также закрытие устьиц.

Таким образом, экзополисахариды представляют собой многофункциональные факторы вирулентности фитопатогенных бактерий, которые обеспечивают прикрепление микроорганизмов к клеткам растений, служат в качестве матрикса биопленок и защищают патогены от неблагоприятных факторов, в том числе иммунных ответов растения-хозяина. Разнообразие функций, выполняемых этими полимерами, по всей видимости, определяется структурной микрогетерогенностью ЭПС, которая формируется из-за разной степени их полимеризации и неодинакового количества и характера расположения модифицирующих групп даже у молекул одного и того же типа полимера.

Литература:

Емельянов, В. И., Кравчук, Ж. Н., Поляковский, С. А., & Дмитриев, А. П. (2008). Отложение каллозы при обработке клеток томатов (*Lycopersicon esculentum* L.) биотическими элиситорами. *Цитология и генетика*, 2, 21–28.

Angadi, C. V. (1978). Extra-cellular slime of *Xanthomonas oryzae* in bacterial leaf blight of rice. *Journal of Phytopathology*, 93(2), 170–180.

Bae, C., Han, S. W., Song, Y. R., Kim, B. Y., Lee, H. J., Lee, J. M., ... & Oh, C. S. (2015). Infection processes of xylem-colonizing pathogenic bacteria: possible explanations for the scarcity of qualitative disease resistance genes against them in crops. *Theoretical and Applied Genetics*, 128(7), 1219–1229.

Bennett, R. A., & Billing, E. (1980). Origin of the polysaccharide component of ooze from plants infected with *Erwinia amylovora*. *Microbiology*, 116(2), 341–349.

Bianco, M. I., Toum, L., Yaryura, P. M., Mielnichuk, N., Gudesblat, G. E., Roeschlin, R., ... & Vojnov, A. A. (2016). Xanthan pyruvilation is essential for the virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 29(9), 688–699.

Bradshaw-Rouse, J. J., Whatley, M. H., Coplin, D. L., Woods, A., Sequeira, L., & Kelman, A. (1981). Agglutination of *Erwinia stewartii* strains with a corn agglutinin: correlation with extracellular polysaccharide production and pathogenicity. *Applied and Environmental Microbiology*, 42(2), 344–350.

Bylund, J., Burgess, L. A., Cescutti, P., Ernst, R. K., & Speert, D. P. (2006). Exopolysaccharides from *Burkholderia cenocepacia* inhibit neutrophil chemotaxis and scavenge reactive oxygen species. *Journal of Biological Chemistry*, 281(5), 2526–2532.

Cho, E., Choi, J. M., Kim, H., Tahir, M. N., Choi, Y., & Jung, S. (2013). Ferrous iron chelating property of low-molecular weight succinoglycans isolated from *Sinorhizobium meliloti*. *Biometals*, 26(2), 321–328.

Coplin, D. L., & Cook, D. (1990). Molecular genetics of extracellular polysaccharide biosynthesis in vascular phytopathogenic bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 3(5), 271–279.

de Pinto, M. C., Lavermicocca, P., Evidente, A., Corsaro, M. M., Lazzaroni, S., & De Gara, L. (2003). Exopolysaccharides produced by plant pathogenic bacteria affect ascorbate metabolism in *Nicotiana tabacum*. *Plant and Cell Physiology*, 44(8), 803–810.

Ding, Q., Yang, B. Y., & Montgomery, R. (2004). Structure and hydrodynamic properties of the extracellular polysaccharide from a mutant strain (RA3W) of *Erwinia chrysanthemi* RA3. *Carbohydrate Research*, 339(11), 2049–2053.

Donlan, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), 881.

Dunne, W. M. (2002). Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 155–166.

Fett, W. F., & Dunn, M. F. (1989). Exopolysaccharides produced by phytopathogenic *Pseudomonas syringae* pathovars in infected leaves of susceptible hosts. *Plant Physiology*, 89(1), 5–9.

Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623–633.

Fu, Y., Yin, H., Wang, W., Wang, M., Zhang, H., Zhao, X., & Du, Y. (2011). β -1,3-Glucan with different degree of polymerization induced different defense responses in tobacco. *Carbohydrate Polymers*, 86(2), 774–782.

Geier, G., & Geider, K. (1993). Characterization and influence on virulence of the levansucrase gene from the fireblight pathogen *Erwinia amylovora*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 42(6), 387–404.

Gilbert, P., Das, J., & Foley, I. (1997). Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Advances in Dental Research*, 11(1), 160–167.

Goodman, R. N. (1978). Inducible resistance responses in plants to plant pathogenic bacteria. *Mycopathologia*, 65(1), 107–113.

Gorshkov, V., Islamov, B., Mikshina, P., Petrova, O., Burygin, G., Sigida, E., ... & Gogolev, Y. (2017). *Pectobacterium atrosepticum* exopolysaccharides: identification, molecular structure, formation under stress and *in planta* conditions. *Glycobiology*, 27(11), 1016–1026.

Gray, J. S., Yang, B. Y., & Montgomery, R. (2000). Extracellular polysaccharide of *Erwinia chrysanthemi* A350 and ribotyping of *Erwinia chrysanthemi* spp. *Carbohydrate Research*, 324(4), 255–267.

Gross, M., Geier, G., Rudolph, K., & Geider, K. (1992). Levan and levansucrase synthesized by the fireblight pathogen *Erwinia amylovora*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 40(6), 371–381.

Herrera, C. M., Koutsoudis, M. D., Wang, X., & Von Bodman, S. B. (2008). *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* exhibits surface motility, which is a critical aspect of Stewart's wilt disease development on maize. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(10), 1359–1370.

Huang, P. Y., Huang, J. S., & Goodman, R. N. (1975). Resistance mechanisms of apple shoots to an avirulent strain of *Erwinia amylovora*. *Physiological Plant Pathology*, 6(3), 283IN13287–286IN17.

Jennings, L. K., Storek, K. M., Ledvina, H. E., Coulon, C., Marmont, L. S., Sadovskaya, I., ... & Wozniak, D. J. (2015). Pel is a cationic exopolysaccharide that cross-links extracellular DNA in the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(36), 11353–11358.

Kiraly, Z., El-Zahaby, H. M., & Klement, Z. (1997). Role of extracellular polysaccharide (EPS) slime of plant pathogenic bacteria in protecting cells to reactive oxygen species. *Journal of Phytopathology*, 145(2–3), 59–68.

Laue, H., Schenk, A., Li, H., & Ullrich, M. (2008). The distribution of multiple exopolysaccharides in *Pseudomonas syringae* biofilms. In: *Pseudomonas syringae Pathovars and Related Pathogens — Identification, Epidemiology and Genomics*. Springer, Dordrecht, 147–157.

Lehman, A. P., & Long, S. R. (2013). Exopolysaccharides from *Sinorhizobium meliloti* can protect against H₂O₂-dependent damage. *Journal of Bacteriology*, 195(23), 5362–5369.

Leigh, J. A., & Coplin, D. L. (1992). Exopolysaccharides in plant-bacterial interactions. *Annual Reviews in Microbiology*, 46(1), 307–346.

Matthysse, A. G., Holmes, K. V., & Gurlitz, R. H. (1981). Elaboration of cellulose fibrils by *Agrobacterium tumefaciens* during attachment to carrot cells. *Journal of Bacteriology*, 145(1), 583–595.

Matthysse, A. G., Marry, M., Krall, L., Kaye, M., Ramey, B. E., Fuqua, C., & White, A. R. (2005). The effect of cellulose overproduction on binding and biofilm formation on roots by *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18(9), 1002–1010.

Mayer, C., Moritz, R., Kirschner, C., Borchard, W., Maibaum, R., Wingender, J., & Flemming, H. C. (1999). The role of intermolecular interactions: studies on model systems for bacterial biofilms. *International Journal of Biological Macromolecules*, 26(1), 3–16.

Mehmood, A., Abdallah, K., Khandekar, S., Zhurina, D., Srivastava, A., Al-Karablieh, N., ... & Ullrich, M. S. (2015). Expression of extra-cellular levansucrase in *Pseudomonas syringae* is controlled by the *in planta* fitness-promoting metabolic repressor HexR. *BMC Microbiology*, 15(1), 48.

Menggad, M., & Laurent, J. (1998). Mutations in *ams* genes of *Erwinia amylovora* affect the interactions with host plants. *European Journal of Plant Pathology*, 104(3), 313–322.

Miller, K. J., & Gore, R. S. (1992). Cyclic beta-1,6-1,3-glucans of *Bradyrhizobium*: functional analogs of the cyclic beta-1,2-glucans of *Rhizobium*? *Current Microbiology*, 24(2), 101–104.

Milling, A., Babujee, L., & Allen, C. (2011). *Ralstonia solanacearum* extracellular polysaccharide is a specific elicitor of defense responses in wilt-resistant tomato plants. *PLoS ONE*, 6(1), e15853.

Neu, T. R., Dengler, T., Jann, B., & Poralla, K. (1992). Structural studies of an emulsion-stabilizing exopolysaccharide produced by an adhesive, hydrophobic *Rhodococcus* strain. *Microbiology*, 138(12), 2531–2537.

Nimtze, M., Mort, A., Domke, T., Wray, V., Zhang, Y., Qiu, F., ... & Geider, K. (1996). Structure of amylovoran, the capsular exopolysaccharide from the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. *Carbohydrate Research*, 287(1), 59–76.

O'Toole, G., Kaplan, H. B., & Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology*, 54(1), 49–79.

Prakasha, A., Grice, I. D., Kumar, K. V., Sadashiva, M. P., Shankar, H. N., & Umesh, S. (2017). Extracellular polysaccharide from *Ralstonia solanacearum*; A strong inducer of eggplant defense against bacterial wilt. *Biological Control*, 110, 107–116.

Reid, A. N., & Cuthbertson, L. (2012). Biosynthesis of capsular polysaccharides and exopolysaccharides. In: *Bacterial Glycomics: Current Research, Technology and Applications*. Caister Academic Press.

Romeiro, R. D., Karr, A., & Goodman, R. (1981). Isolation of a factor from apple that agglutinates *Erwinia amylovora*. *Plant Physiology*, 68(3), 772–777.

Romeiro, R. S., & Kimura, O. (1997). Induced resistance in pepper leaves infiltrated with purified bacterial elicitors from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Journal of Phytopathology*, 145(11–12), 495–498.

Roper, M. C., Greve, L. C., Labavitch, J. M., & Kirkpatrick, B. C. (2007). Detection and visualization of an exopolysaccharide produced by *Xylella fastidiosa* *in vitro* and *in planta*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(22), 7252–7258.

Silva, M. F., Fornari, R. C., Mazutti, M. A., de Oliveira, D., Padilha, F. F., Cichoski, A. J., ... & Treichel, H. (2009). Production and characterization of xantham gum by *Xanthomonas campestris* using cheese whey as sole carbon source. *Journal of Food Engineering*, 90(1), 119–123.

Sutherland, I. W. (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, 147(1), 3–9.

Tomlinson, A. D., Ramey-Hartung, B., Day, T. W., Merritt, P. M., & Fuqua, C. (2010). *Agrobacterium tumefaciens* ExoR represses succinoglycan biosynthesis and is required for biofilm formation and motility. *Microbiology*, 156(9), 2670–2681.

Van den Bulk, R. W., Zevenhuizen, L. P. T. M., Cordewener, J. H. G., & Dons, J. J. M. (1991). Characterization of the extracellular polysaccharide produced by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology*, 81(6), 619–623.

Vanhooren, P. T., & Vandamme, E. J. (2000). Microbial production of clavans, an L-fucose rich exopolysaccharide. *Progress in Biotechnology*, 17, 109–114.

Wadström, T., Eliasson, I., Holder, I., & Ljungh, A. (Eds.). (2012). Pathogenesis of wound and biomaterial-associated infections. Springer Science & Business Media.

Yang, B. Y., Gray, J. S., & Montgomery, R. (1994). Extracellular polysaccharide of *Erwinia chrysanthemi* Ech6. *International Journal of Biological Macromolecules*, 16(6), 306–312.

Young, D. H., & Sequeira, L. (1986). Binding of *Pseudomonas solanacearum* fimbriae to tobacco leaf cell walls and its inhibition by bacterial extracellular polysaccharides. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 28(3), 393–402.

Yu, J., Peñaloza-Vázquez, A., Chakrabarty, A. M., & Bender, C. L. (1999). Involvement of the exopolysaccharide alginate in the virulence and epiphytic fitness of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Molecular Microbiology*, 33(4), 712–720.

Zivkovic, M., Miljkovic, M., Ruas-Madiedo, P., Strahinic, I., Tolinacki, M., Golic, N., & Kojic, M. (2015). Exopolysaccharide production and ropy phenotype are determined by two gene clusters in putative probiotic strain *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(4), 1387.

3.7. Агробактериальная система естественного трансгенеза растений

Уникальным для фитопатогенных агробактерий фактором вирулентности служит система для трансформации клеток растений, с помощью которой фрагмент плазмидной ДНК микроорганизма переносится в клетку хозяина и интегрируется в геном макроорганизма. В результате этого процесса на инфицированных растениях формируются новообразования: это могут быть галлы — опухоли в надземной части растений, вызываемые *Agrobacterium tumefaciens* (реклассифицирована в *Rhizobium radiobacter*), или многочисленные придаточные корни, часто называемые «борода-тыми», образование которых индуцируют бактерии *Agrobacterium rhizogenes* (реклассифицирована в *Rhizobium rhizogenes*) (Gelvin, 2003; Cheng et al., 2004).

Встраиваемый в растительную клетку фрагмент ДНК агробактерий — Т-ДНК (T-DNA, transfer DNA) располагается на плазмиде размером около 200 тысяч пар нуклеотидов, которая у *A. tumefaciens* называется Ti-плазмидой (tumor-inducing, опухоль-индуцирующей), а у *A. rhizogenes* — Ri (root-inducing, индуцирующей корнеобразование). Помимо Т-ДНК, на этих плаزمиде выделяют *vir*-область, на которой находятся гены белков, необходимых для переноса Т-ДНК в растительную клетку, *tra*-, *trb*-, *rep*-регионы, ответственные за репликацию и горизонтальный перенос плазмиды в популяции агробактерий, и область, включающую гены ферментов катаболизма опинов — модифицированных аминокислот, синтезируемых трансформированными клетками растений и потребляемых агробактериями (Christie, Gordon, 2014) (рис. 3.7.1). *Vir*-область содержит гены, кодирующие: 1) двухкомпонентную систему VirA/VirG, которая воспринимает метаболиты растения-хозяина и передает сигнал, активирующий программу вирулентности агробактерий; 2) компоненты системы секреции IV типа (VirB1-VirB11, VirD4), через которую осуществляется перенос Т-ДНК в клетку растения (подробно об устройстве этой секреторной системы написано в главе 3.2); 3) вспомогательные и эффекторные белки (VirE, VirC, VirD, VirF), участвующие в вырезании и переносе Т-ДНК в клетку хозяина (рис. 3.7.1) (Krenek et al., 2015). В основном Ti- и Ri-плазмиды устроены сходным образом; главные различия между ними заключаются в наличии в Ri-плазмиде дополнительных генов *rol* (root loci) в области Т-ДНК, а также в отсутствии в них характерных для Ti-плазмид генов *virE1* и *virE2*; у *A. rhizogenes* функции белков VirE1 и VirE2 выполняет белок, кодируемый геном GALLS (Suzuki et al., 2009).

В составе Т-ДНК располагаются гены, кодирующие ферменты биосинтеза опинов, а также ауксина и цитокининов — фитогормонов, активирующих ростовые процессы в клетках растения. В промоторных областях этих генов находятся сайты связывания эукариотической РНК-полимеразы (ТАТА- и СААТ-боксы), а также последовательности, узнаваемые разными растительными факторами регуляции транскрипции (MYB, DOF, WRKY, bHLH, ARR1, ARF) (Zhang et al., 2015). Благодаря этому гены, расположенные в области Т-ДНК, активно экспрессируются в растительной клетке, что приводит к увеличению содержания опинов, ауксина и цитокининов.

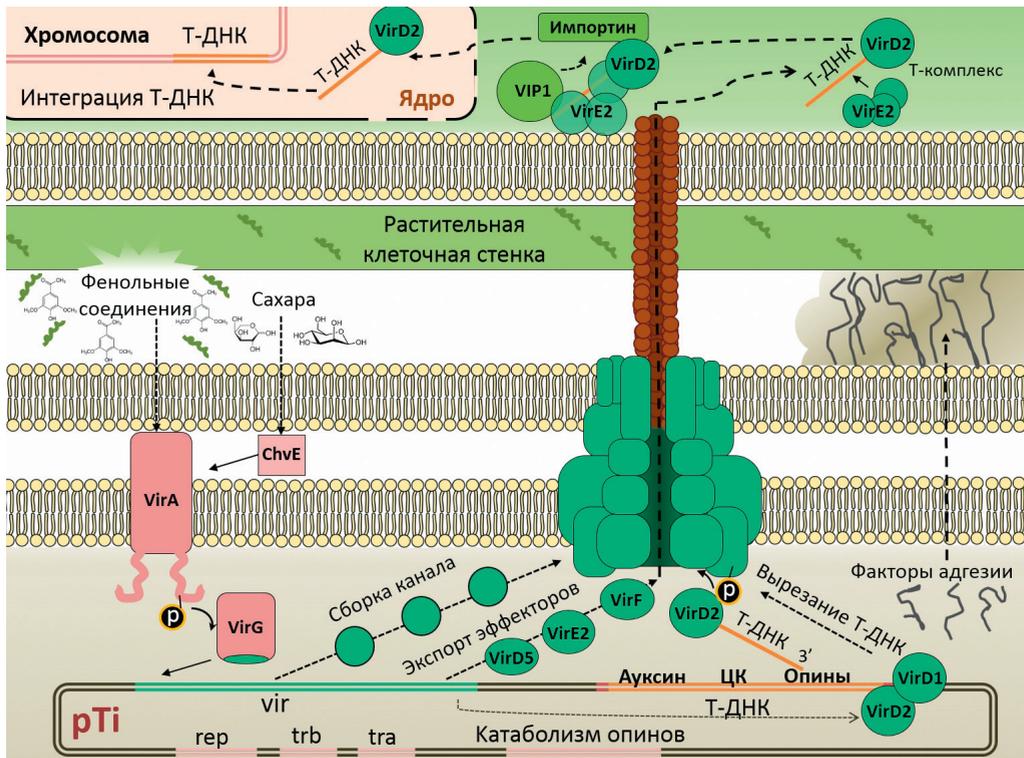


Рис. 3.7.1. Схема процессов переноса и встраивания Т-ДНК *Agrobacterium tumefaciens* в геном растительной клетки. рТi — Ti-плаزمид, на которой обозначены следующие области: *vir*-регион (в котором располагаются гены, кодирующие белки системы секреции IV типа, эффекторные белки (VirF, VirD5, VirE2) и белки (VirD1-2), осуществляющие вырезание и перенос Т-ДНК); Т-ДНК (в которой располагаются гены ферментов биосинтеза опинов, ауксина и цитокининов); *rep*, *tra*, *trb* — области, необходимые для репликации и горизонтального переноса Ti-плазмиды в популяции агробактерий; область генов ферментов катаболизма опинов. Сенсоры сахаров ChvE и фенольных соединений VirA активируют фактор регуляции транскрипции VirG, который, в свою очередь, индуцирует экспрессию *vir*-генов. В результате этого происходит сборка системы секреции IV типа и вырезание одной цепи Т-ДНК с помощью VirD2 и вспомогательных белков. VirD2-Т-ДНК-комплекс и ряд эффекторных белков (VirE2, VirD5, VirF) транспортируются в цитоплазму растительной клетки через канал системы секреции. В цитоплазме растительной клетки к Т-ДНК присоединяются молекулы белка VirE2 и растительные белки — импортин и VIP; затем весь этот комплекс доставляется в ядро и Т-ДНК встраивается в хромосому клетки хозяина.

Дополнительные пояснения к рисунку — в тексте.

Опины (октопины, маннопины, нопалины, агроцинопины), которые не могут быть утилизированы растительными клетками из-за отсутствия необходимых для этого ферментов, потребляются агробактериями в качестве ростового субстрата, а ауксин и цитокинины вызывают неконтролируемое деление и гипертрофию инфицированных клеток. Таким образом, новообразования, формирование которых индуцируется агробактериями, работают как фабрики по производству продуктов питания для этих микроорганизмов (Владимиров с соавт., 2015).

Запуск программы вирулентности агробактерий происходит, когда микроорганизмы начинают «чувствовать» своего хозяина, воспринимая некоторые его метаболиты как сигналы для атаки. К этим метаболитам относятся фенольные соединения (ацетосирингон, 3,5-диметоксиацетофенон, гидроксиацетосирингон), выделяемые в окружающую среду пораненными растительными тканями, а также простые углеводы (арабиноза, ксилоза, галактуроновые и глюкуроновые кислоты) (Hu et al., 2013; Subramoni et al., 2014). С одной стороны, эти метаболиты действуют как аттрактанты, активируя системы хемотаксиса микроорганизмов (см. главу 3.5), «заставляя» таким образом бактерии двигаться в сторону растения. При достижении тканей хозяина микроорганизм сорбируется на растительных клеточных стенках при помощи разнообразных факторов адгезии (Heindl et al., 2014; Feiret et al., 2017). С другой стороны, фенольные соединения и сахара служат в качестве индукторов экспрессии *vir*-генов агробактерий. При этом простые углеводы растений воспринимаются периплазматическим белком ChvE, который затем активирует белок внутренней мембраны VirA, являющийся сенсором фенольных соединений (Peng et al., 1998). Связывание фенольных соединений с VirA приводит к активации фактора регуляции транскрипции VirG и последующей индукции *vir*-генов (рис. 3.7.1). В результате этого происходит вырезание Т-ДНК из Ti-/Ri-плазмиды и индуцируется «сборка» системы секреции IV типа, необходимой для доставки Т-ДНК в растительную клетку (Gelvin, 2003).

Важную роль в вырезании Т-ДНК и ее доставке играет белок VirD2, который выполняет две ключевые функции. Во-первых, этот белок, обладающий эндонуклеазной активностью, при участии вспомогательных белков VirD1, VirC1, VirC2 вырезает одну цепь Т-ДНК из Ti-/Ri-плазмиды. Во-вторых, связываясь с 5'-концом вырезанной одноцепочечной Т-ДНК, VirD2 обеспечивает ее доставку в ядро клетки хозяина благодаря наличию у этого белка последовательности, соответствующей сигналу ядерной локализации NLS (nuclear localization signal) (Gelvin, 2003). Система секреции IV типа обеспечивает доставку VirD2-Т-ДНК-комплекса, а также ряда эффекторных белков (VirE2, VirE3, VirD5, VirF) в цитоплазму растительной клетки. Уже в клетке хозяина один из этих эффекторов — VirE2 — связывается с Т-ДНК, что предотвращает ее разрушение растительными нуклеазами. Роль остальных эффекторных белков (VirE3, VirD5, VirF) в патогенезе остается невыясненной (Gelvin, 2012). Доставке Т-комплекса в ядро предшествует взаимодействие связанных с Т-ДНК белков VirD2, VirE2 с раститель-

ными белками: импортинами и факторами регуляции транскрипции VIP1 и VIP2, которые, по всей видимости, играют роль в интеграции T-ДНК в геном растения. Относительно механизмов встраивания T-ДНК в растительный геном существует несколько теоретических моделей; однако четкими экспериментальными доказательствами эти модели пока не подкреплены (Bourgas et al., 2015).

Агробактериальная система для трансформации растений нашла широкое применение в биотехнологии и фундаментальных исследованиях. С ее помощью проводится трансгенез (внедрение чужеродных генов) и редактирование геномов растений, в том числе с целью увеличения качества растительной продукции и выяснения механизмов функционирования растительного организма. Самый общий принцип адаптирования агробактериальной системы трансформации растений для генно-инженерных задач биотехнологии и фундаментальной науки связан с заменой области T-ДНК в T_i-плазмиде на целевой участок ДНК, который нужно интегрировать в растительный геном. Кроме того, для направленного изменения геномов растений T_i-плазмиду значительно «облегчают», вырезая из нее «ненужные» для генной инженерии участки (например, гены катаболизма опинов). Оставшиеся «нужные» гены и дополнительные необходимые для правильной работы системы элементы (например, промоторы, селективные маркеры, сайты для мультиклонирования и т. д.) разделяют на два независимых репликона (две плазмиды), получая таким образом так называемый бинарный вектор. Оба репликона бинарного вектора внедряют в клетки агробактерий и этими бактериями инфицируют клетки или экспланты растений. На одном из репликонов (универсальном) располагается *vir*-область, кодирующая «машину» для переноса ДНК, а на втором (модифицируемом исследователем в зависимости от задач) — специальный регион, в который предварительно встроен интересующий исследователя участок ДНК с целью дальнейшего переноса в растительный геном, а также маркер для селекции. Такой маркер необходим для того, чтобы отобрать только те клетки растения, в геном которых встроился целевой фрагмент ДНК. Обычно в качестве селективного маркера используют ген устойчивости к определенному фитотоксичному соединению. Благодаря этому при переносе растительных клеток на среду с токсичным соединением выживают и размножаются только те клетки, в которых прошел процесс трансформации. В дальнейшем, вследствие тотипотентности, трансформированные клетки растений регенерируют до целого организма, все клетки которого содержат «новый» участок ДНК (Gelvin, 2003; Suzuki et al., 2009; Gelvin, 2012).

Таким образом, в наступательном арсенале агробактерий есть особая система, которая обеспечивает генетическое модифицирование клеток растения-хозяина (встраивание агробактериальной T-ДНК). Такая генетическая модификация приводит к тому, что растительный организм начинает функционировать на благо патогену, производя для него в большом количестве продукты питания — опины (модифицированные аминокислоты). Взаимодействие агробактерий и растений

представляет собой наглядный пример того, какими изысканными и замысловатыми могут быть механизмы взаимодействия фитопатогенов и растений и как понимание этих механизмов позволяет адаптировать и использовать их в биотехнологии для улучшения качества растительной продукции и как удобный инструмент для исследования биологических процессов.

Литература:

Владимиров, И. А., Матвеева, Т. В., & Лутова, Л. А. (2015). Гены биосинтеза и катаболизма опинов *Agrobacterium tumefaciens* и *Agrobacterium rhizogenes*. *Генетика*, 51(2), 137–137.

Bourras, S., Rouxel, T., & Meyer, M. (2015). *Agrobacterium tumefaciens* gene transfer: how a plant pathogen hacks the nuclei of plant and nonplant organisms. *Phytopathology*, 105(10), 1288–1301.

Cheng, M., Lowe, B. A., Michael Spencer, T., Ye, X., & Armstrong, C. L. (2004). Invited review: factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of monocotyledonous species. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 40(1), 31–45.

Christie, P. J., & Gordon, J. E. (2014). The *Agrobacterium* Ti plasmids. *Microbiology Spectrum*, 2(6).

Feirer, N., Kim, D., Xu, J., Fernandez, N., Waters, C. M., & Fuqua, C. (2017). The *Agrobacterium tumefaciens* CheY-like protein ClaR regulates biofilm formation. *Microbiology*, in press.

Gelvin, S. B. (2003). *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the «Gene-Jockeying» tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(1), 16–37.

Gelvin, S. B. (2012). Traversing the cell: *Agrobacterium* T-DNA's journey to the host genome. *Frontiers in Plant Science*, 3, 52.

Heindl, J. E., Wang, Y., Heckel, B. C., Mohari, B., Feirer, N., & Fuqua, C. (2014). Mechanisms and regulation of surface interactions and biofilm formation in *Agrobacterium*. *Frontiers in Plant Science*, 5, 176.

Hu, X., Zhao, J., DeGrado, W. F., & Binns, A. N. (2013). *Agrobacterium tumefaciens* recognizes its host environment using ChvE to bind diverse plant sugars as virulence signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(2), 678–683.

Krenek, P., Samajova, O., Luptovciak, I., Duskocilova, A., Komis, G., & Samaj, J. (2015). Transient plant transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: principles, methods and applications. *Biotechnology Advances*, 33(6), 1024–1042.

Peng, W. T., Lee, Y. W., & Nester, E. W. (1998). The phenolic recognition profiles of the *Agrobacterium tumefaciens* VirA protein are broadened by a high level of the sugar binding protein ChvE. *Journal of Bacteriology*, 180(21), 5632–5638.

Subramoni, S., Nathoo, N., Klimov, E., & Yuan, Z. C. (2014). *Agrobacterium tumefaciens* responses to plant-derived signaling molecules. *Frontiers in Plant Science*, 5, 322.

Suzuki, K., Tanaka, K., Yamamoto, S., Kiyokawa, K., Moriguchi, K., & Yoshida, K. (2009). Ti and Ri plasmids. In: *Microbial Megaplasmids*. Springer Berlin Heidelberg, 133–147.

Zhang, Y., Lee, C. W., Wehner, N., Imdahl, F., Svetlana, V., Weiste, C., ... & Deeken, R. (2015). Regulation of oncogene expression in T-DNA-transformed host plant cells. *PLoS Pathogens*, 11(1), e1004620.

3.8. «Цитодифференцировка» фитопатогенных бактерий

Вирулентность фитопатогенных бактерий во многом зависит от набора и количественного соотношения разных морфофизиологических форм клеток микроорганизма, образующихся при колонизации хозяина. Хотя долгое время микробную популяцию воспринимали как совокупность «одинаковых» клеток, на сегодняшний день стало очевидно, что популяции микроорганизмов представляют собой гетерогенные и динамичные системы, которые могут состоять из клеток, значительно различающихся по морфологическим и физиологическим параметрам (Balaban et al., 2004; Baulina, 2008; Gefen, Balaban, 2009). При этом морфофизиологический состав популяции, который меняется в зависимости от внешних условий, может детерминировать «поведение» бактерий и, в частности, тактику их взаимодействия с растениями (Balaban et al., 2004; Strovas et al., 2007).

Морфофизиологическая разнородность бактериальных клеток позволяет рассматривать популяцию микробов как совокупность разных субпопуляций, объединенных друг с другом физиологически и функционально (Baulina, 2008). При относительно стабильных внешних условиях основные свойства популяции определяются доминирующей субпопуляцией (доминирующими субпопуляциями). Минорные при этом не вносят существенного вклада в физиологические показатели популяции в целом. Однако изменение внешних условий может привести к доминированию исходно минорной субпопуляции (субпопуляций), если она оказывается наиболее приспособленной к новым условиям (Booth, 2002; Aertsen, Michiels, 2005; Kussell, Leibler, 2005; den Besten et al., 2007; Ingham et al., 2008). Такая мобильность морфофизиологической структуры популяции позволяет бактериям при необходимости менять стратегию «поведения» и гибко адаптироваться к меняющимся условиям окружающей среды (Balaban et al., 2004; Strovas et al., 2007; Lidstrom, Конопка, 2010). При этом эффективность освоения бактериями различных экологических ниш значительно повышается.

Процесс образования не похожих друг на друга клеток в популяциях бактерий иногда называют «цитодифференцировкой» — по аналогии со специализацией клеток высших организмов (Neimark, 1986; Booth, 2002; Aertsen, Michiels, 2005). Хотя процесс «цитодифференцировки» у бактерий исследован крайне слабо, очевидно, что его механизмы имеют принципиальные отличия от механизмов дифференцировки клеток высших организмов. Тем не менее у прокариот, как и у высших организмов, существуют способы создания функционально специализированных клеток и «тканеподобных» структур, которые влияют на свойства микробной популяции, в том числе вирулентность.

Основными тестовыми системами для исследования процесса «цитодифференцировки» бактерий являются модельные стрессовые условия *in vitro*. Считается, что при стрессе в значительной степени реализуется потенциал бактерий к формированию разных типов клеток. В действительности, искусственные системы вряд ли дают возможность получить полноценное представление о «цитодифференцировке» микроорганизмов в естественных условиях, гораздо более

динамичных, чем культуры *in vitro* (Baulina, 2008; Lidstrom, Konopka, 2010). Так, например, физиологические, физико-химические и фитоиммунные параметры отдельных клеток и тканей растения-хозяина значительно различаются; поэтому клетки микроорганизма, колонизирующие разные компартменты растений, оказываются в разных условиях, что формирует основу для функциональной специализации микробных клеток. Действительно, было продемонстрировано, что при колонизации растений в популяции бактерий образуются морфологически разные клеточные формы; при этом состав и количественное соотношение этих форм зависит от типа колонизируемой ткани и стадии инфекционного процесса (Gorshkov et al., 2014). Вероятно, что эти формы действуют подобно разным родам войск в армии, решающим разные задачи во имя достижения общей цели — захват новой территории.

Некоторые морфофизиологические варианты клеток и тканеподобных структур микроорганизмов были классифицированы в зависимости от ряда их характеристик. Далее будут рассмотрены те из них (жизнеспособные, но некультивируемые клетки, L-формы, микробные биопленки и бактериальные эмболы), которые были обнаружены у фитопатогенных бактерий, в том числе в системах *in planta*.

Развитие высокопроизводительных методов молекулярной диагностики позволило однозначно установить, что разнообразие и количество бактерий в окружающей среде значительно больше, чем можно выявить с использованием классических микробиологических методов (Tringe et al., 2005; Thomas et al., 2012; Neelakanta, Sultana, 2013; Sunagawa et al., 2013). Это связано с тем, что большинство микроорганизмов не поддается культивированию в искусственных условиях, и единственный способ их идентифицировать — это детектировать их ДНК. Такие формы бактерий были названы **«жизнеспособные, но некультивируемые»**. Впервые некультивируемые формы были описаны на примере *Escherichia coli* и *Vibrio cholera* (Xu et al., 1982). К настоящему времени образование некультивируемых форм показано для многих видов бактерий, в том числе большинства интенсивно исследуемых фитопатогенов: *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas axonopodis*, *Clavibacter michiganensis*, *Pectobacterium atrosepticum*, а также нескольких видов фитоплазм (фитопатогенных микоплазм) (Wilson, Lindow, 1992; Grey, Steck, 2001; Ordax et al., 2006; Chernov et al., 2010; Khan et al., 2010; Oliver, 2010; Kong et al., 2014; Jiang et al., 2016; Santander, Biosca, 2017). В основном некультивируемые формы изучают в модельных культурах *in vitro*; но на ряде примеров образование таких форм фитопатогенными бактериями продемонстрировано и в системах *in planta*, то есть в организме растения-хозяина (Grey, Steck, 2001; Ordax et al., 2006; Campo et al., 2009; Chernov et al., 2010; Gorshkov et al., 2014).

Некультивируемые формы бактерий могут морфологически отличаться от активно делящихся (культивируемых) клеток по ряду параметров. При этом некультивируемые формы могут иметь (но не обязательно имеют) особенности

в строении и свойствах клеточной стенки, мембраны, в структуре цитоплазмы и нуклеоида; при переходе в некультивируемое состояние могут меняться форма и размер клеток (Linder, Oliver, 1989; Kondo et al., 1994; Mukamolova et al., 1995; Signoretto et al., 2002; Day, Oliver, 2004; Su et al., 2015). В плане физиологических особенностей для некультивируемых форм характерна низкая метаболическая активность (синтез макромолекул и дыхание); у них снижается уровень транскрипции генов и происходит «консервирование» генетического аппарата клетки, которое выражается конденсацией нуклеоида (Warner, Oliver, 1998; Зигангирова с соавт., 2003). Однако у таких клеток сохраняется значительный уровень АТФ, а также мембранный потенциал (Oliver, 2010). Кроме того, в некультивируемых клетках синтезируются мРНК, в том числе транскрипты генов вирулентности (Vora et al., 2005).

Считается, что некультивируемые формы бактерий могут служить в качестве резерва популяции при действии неблагоприятных факторов (Lleo et al., 2007; Su et al., 2013). Их резервная функция обеспечивается двумя основными свойствами. Во-первых, в таком состоянии, характеризующемся отсутствием пролиферативной активности и низким уровнем метаболизма, значительно повышается устойчивость клеток к разнообразным неблагоприятным факторам (Signoretto et al., 2000; Álvarez et al., 2008; Nowakowska, Oliver, 2013; Ramamurthy et al., 2014; Postnikova et al., 2015). Фактически клетки при переходе в некультивируемое состояние становятся нечувствительными (индифферентными) к стрессорам. Существование в таком «нечувствительном» состоянии принято называть персистенцией. Благодаря невосприимчивости к стрессорам, некультивируемые формы с гораздо большей вероятностью, чем метаболически активные клетки, выживут в неблагоприятных условиях (Weichart, Kjelleberg, 1996; Wong, Wang, 2004; Lleo et al., 2007; Anuchin et al., 2009; Nowakowska, Oliver, 2013). Показано, что в некультивируемом состоянии жизнеспособность клеток может сохраняться несколько лет (Bunker et al., 2004; Amel et al., 2008).

Вторым свойством некультивируемых клеток, позволяющим им служить резервом популяции, является способность к реверсии в пролиферирующие формы, то есть при определенных условиях восстанавливать процессы деления и давать начало новой популяции. Как переход в некультивируемое состояние, так и последующая реверсия в вегетативные (делящиеся) формы обычно являются индуцируемыми процессами. Образованию некультивируемых форм способствуют разнообразные стрессовые факторы, например неоптимальная температура и осмотичность, отсутствие ростового субстрата, действие токсичных соединений, в том числе тяжелых металлов (Oliver, 2010). Долгое время тяжелые металлы (медьсодержащие препараты) использовали для борьбы с фитобактериозами; при этом на примере фитопатогенных бактерий родов *Erwinia*, *Xanthomonas* и *Clavibacter* было показано, что медь не столько убивает клетки этих микроорганизмов, сколько индуцирует их переход в некультивируемое состояние (Alexander et al., 1999; Ghezzi, Steck, 1999; Grey, Steck, 2001; Ordax et al., 2006; Campo et al., 2009). В свою очередь, хелатирование меди, которое может осуществляться, в том

числе метаболитами растений, возвращает клетки в активное состояние, что в конечном итоге способно приводить к развитию острого инфекционного процесса (Ghezzi, Steck, 1999; Ordax et al., 2006).

Для *Ralstonia solanacearum* и *Pectobacterium atrosepticum* показано, что образование некультивируемых форм этих бактерий происходит непосредственно в растительных тканях на поздних стадиях инфекции и/или на растительных остатках после гибели растения-хозяина; таким образом микроорганизмы, по-видимому, готовят себя к переживанию вневегетационного периода в почве (Grey, Steck, 2001; Gorshkov et al., 2014). Кроме того, некультивируемые формы бактерий могут образовываться в растениях при латентных инфекциях, когда симптомы заболевания морфологически не проявляются (Thomas, 2004a, b; Thomas et al., 2008a, b; Panicker et al., 2007).

Для реверсии некультивируемых клеток в вегетативные формы — процесса, который называют «оживлением», — просто прекращения действия стрессора обычно недостаточно; как правило, требуются дополнительные факторы, которые служат сигналами для отмены программы пролиферативного и физиологического покоя. Так, например, для реверсии некультивируемых клеток фитопатогенов *Ralstonia solanacearum* и *Clavibacter michiganensis* в вегетативные (делящиеся) формы необходимы метаболиты растений (Grey, Steck, 2001; Jiang et al., 2016), а для «оживления» некультивируемых форм *Pectobacterium atrosepticum* требуется отмывка клеток от компонентов, содержащихся в их микроокружении (Горшков с соавт., 2009). Для ряда бактерий «оживление» некультивируемых клеток может происходить при обработке антиоксидантами, изменении температуры (в том числе после теплового шока), действии специфических белков и компонентов супернатантов пролиферирующих культур (McDougald et al., 1998; Mukamolova et al., 1998, 2002, 2006; Shleeve et al., 2004; Oliver, 2010; Kong et al., 2014).

Еще одним важным свойством некультивируемых клеток и/или их ревертантов (клетки после процедуры «оживления») является способность вызывать патологические процессы у своих хозяев. Это было неоднократно продемонстрировано на примере целого ряда тестовых систем, в том числе на фитопатогенных бактериях родов *Ralstonia*, *Erwinia*, *Xanthomonas* и *Clavibacter* (Grey, Steck, 2001; Ordax et al., 2006; Campo et al., 2009; Jiang et al., 2016). В связи с этим можно сделать заключение, что формирование некультивируемых форм бактерий является важным аспектом взаимодействия фитопатогенных микроорганизмов с растениями-хозяевами. Во-первых, образование таких устойчивых форм может позволить микроорганизму выжить в тканях растения в случае индукции защитного ответа и возобновить наступление при наиболее благоприятных для этого условиях. Во-вторых, переход в некультивируемое состояние на поздних стадиях инфекционного процесса и/или в конце вегетационного сезона может дать возможность микроорганизму «грамотно подготовиться» к этапу жизненного цикла вне организма хозяина, чтобы сохранить патогенный потенциал для взаимодействия с новым растением.

Другим «нетипичным» морфофизиологическим вариантом клеток микроорганизмов являются **L-формы**. Эти формы полностью или частично утрачивают клеточную стенку, в зависимости от чего подразделяются на протопласты и сферопласты соответственно. L-формы могут образовываться в популяции микробов спонтанно или индуцированно как в системах *in vitro*, так и в теле растения-хозяина. L-формы могут различаться по форме и размерам. Уровень метаболизма L-форм обычно значительно ниже, чем у вегетативных клеток (Casadesus, 2007).

L-формы бактерий были описаны на примере многих микроорганизмов, в том числе таких известных фитопатогенных бактерий, как *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas campestris*, *Erwinia carotovora* (Jones, Paton, 1973; Choi et al., 1988; Amijee et al., 1992; Elvira-Recuenco, van Vuurde, 2003). Уже более полувека назад было высказано предположение, что L-формы бактерий могут быть причиной заболевания растений (Heimbeck, 1954). Тем не менее механизмы их образования и роль в микробной экологии, в том числе во взаимодействии с высшими организмами, остаются далекими до понимания. Во многом это связано со сложностью культивирования L-форм в условиях *in vitro*, что делает их непростыми объектами для исследования (Madoff, 1981; Strang et al., 1991; Elvira-Recuenco, van Vuurde, 2003; Kawai et al., 2015). Тем не менее существуют способы, которые позволяют, по крайней мере на какое-то время, лишиться бактерии клеточной стенки. Эти способы включают обработку ингибиторами биосинтеза клеточной стенки и воздействие ультрафиолета (Sharp, 1954; Landman, Halle, 1963; Herrere et al., 1976); образование L-форм пектобактерий (*Pectobacterium atrosepticum*) возможно также индуцировать лимитированием ростового субстрата (Petrova et al., 2016).

Поскольку образование L-форм обычно индуцируется стрессовыми факторами, появление в популяции таких клеточных форм связывают с адаптивным ответом бактерий на неблагоприятные условия (Herrere et al., 1976; Allan et al., 2009; Errington, 2013). В особенности образование L-форм может быть выгодно патогенным микроорганизмам при колонизации хозяев. Клеточная стенка бактерий содержит большое количество антигенов (элиситоров — индукторов иммунного ответа растений), которые могут распознаваться хозяйским организмом как сигнал опасности и активировать защитный ответ (Thakur, Sohal, 2013; Malinovsky et al., 2014; Miedes et al., 2014; Wiesel et al., 2014). Утрата клеточной стенки позволяет L-формам избавиться от антигенов и оставаться «невидимыми» для оборонительных систем макроорганизма. Действительно, было показано, что L-формы *Pseudomonas syringae*, в отличие от исходных вегетативных клеток этого микроорганизма, не индуцируют реакцию гиперчувствительности — мощнейший защитный ответ растений, который обычно приводит к полной элиминации патогена (Amijee et al., 1992). Благодаря сниженным антигенным (элиситорным) свойствам L-формы способны длительно персистировать (то есть находиться в неактивном состоянии) в организме хозяина, являясь причиной скрытых латентных инфекций (Allan et al., 2009).

В то же время, поскольку факторы вирулентности фитопатогенных бактерий транспортируются через специальные каналы — системы секреции (см. главу 3.2),

закрепленные в бактериальной клеточной стенке, утрата этого компартмента L-формами может приводить к значительному снижению вирулентности и агрессивности микроорганизма (Herrere et al., 1976). Тем не менее роль L-форм во взаимодействии с растениями может быть весьма значительной. Во-первых, на это указывает их образование не только при бессимптомных, но и при типичных инфекциях. Существует предположение, что L-формы могут быть необходимы для колонизации растительных протопластов; аргументом в пользу этого служит обнаружение L-форм в цитоплазме клеток хозяина (Paton, Innes, 1991). Вероятно, что L-формы могут «поглощаться» растительной клеткой в результате эндоцитоза; однако, каким образом такие формы преодолевают растительную клеточную стенку, остается не выясненным. Во-вторых, благодаря тому, что L-формы, как и некультивируемые клетки, способны к реверсии в исходные вегетативные формы, которые полностью вирулентны и могут эффективно колонизировать организм хозяина, образование L-форм *in planta* можно рассматривать как «подготовительный этап» к интенсивной колонизации растения и/или способ «выжидания» нужного момента для нападения (Jones, Paton, 1973; Herrere et al., 1976; Allan et al., 2009).

Помимо особых «дифференцированных» клеток, в популяциях микроорганизмов образуются «тканеподобные» структуры, в составе которых клетки физически контактируют друг с другом и действуют координированно. В естественных условиях существование бактерий в виде таких структур, а не обособленных клеток является скорее нормой, чем исключением. Подобные «многоклеточные» структуры называют **био пленками** (Shapiro, 1998; Николаев, Плакунов, 2007). В объединении отдельных микробных клеток в биопленку важную роль играет экстраклеточный матрикс, в качестве основного компонента которого служат бактериальные экзополисахариды (эти полимеры подробно описаны в главе 3.6). Помимо экзополисахаридов, в состав экстраклеточного матрикса биопленок могут также входить белки, нуклеиновые кислоты, липиды (Conrad et al., 2003; Bogino et al., 2013). Отдельные клетки в биопленках обычно различаются по физиологическим параметрам и могут обладать функциональной специализацией. Одной из наиболее известных форм клеток внутри биопленок являются так называемые **персистеры**. Эти клетки, которые могут формироваться как в биопленке, так и в планктонной культуре, обладают повышенной устойчивостью к стрессовым факторам, благодаря сниженной метаболической и пролиферативной активности (Bogino et al., 2013; Singh et al., 2017).

Формирование бактериальных биопленок представляет актуальную проблему для медицины. Это связано с тем, что, во-первых, от биопленок сложно избавиться с помощью лекарственных препаратов, в том числе антибиотикотерапии (Stewart, 2002; Нюйбю et al., 2010). Микроорганизмы, образуя биопленку, становятся более резистентными к стрессорам из-за дифференцировки части популяции в устойчивые формы (например, персистеры) и интенсивного формирования полисахаридного матрикса, который служит «щитом», защищающим клетки от множества

неблагоприятных факторов, в том числе антимикробных соединений (Gilbert et al., 1997; Kumar, Mody, 2009; Patyka et al., 2016). Во-вторых, проблема, связанная с образованием биопленок, может заключаться в увеличении агрессивности микробов при формировании этих «многоклеточных» структур. Это является следствием высокой плотности бактериальной популяции в биопленках, которая благоприятствует интенсивной продукции клетками факторов вирулентности (см. главу 4.1).

По тем же самым причинам формирование биопленок часто является важным аспектом взаимодействия фитопатогенных бактерий с растениями и развития бактериозов (Tans-Kersten et al., 2001; Dow et al., 2003; Walker et al., 2004; Koczan et al., 2009). Образование биопленок происходит на поверхности раздела фаз, в том числе при прикреплении клеток к твердому субстрату (рис. 3.8.1). При колонизации растения-хозяина клетки микроорганизмов сорбируются на растительных клеточных стенках с помощью факторов адгезии (пили, белки адгезины), после чего происходит образование внеклеточного матрикса и постепенное разрастание биопленки (Dunne, 2002; Danhorn, Fuqua, 2007). Сборка биопленок обычно осуществляется таким образом, что в ней формируется сложная система каналов, необходимых для циркуляции водных растворов. Подобные «проводящие системы» обеспечивают возможность взаимодействия клеток с окружающей средой: приток питательного субстрата, отток экстраклеточных метаболитов (ферментов, токсинов), обмен информацией с помощью сигнальных молекул межклеточной коммуникации и т. д. (Costerton, 1995; Stanley, Lazazzera, 2004; Quiñones et al., 2005). После «созревания» биопленок может происходить их полная или частичная дисперсия (распад), благодаря которой клетки могут расселяться и осваивать новые территории (Rinaudi, Giordano, 2010) (рис. 3.8.1).

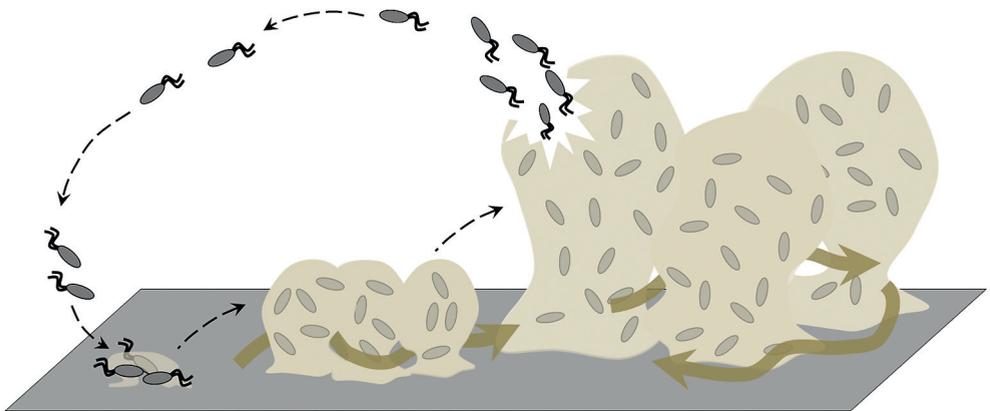


Рис. 3.8.1. Схема процесса формирования бактериальных биопленок.

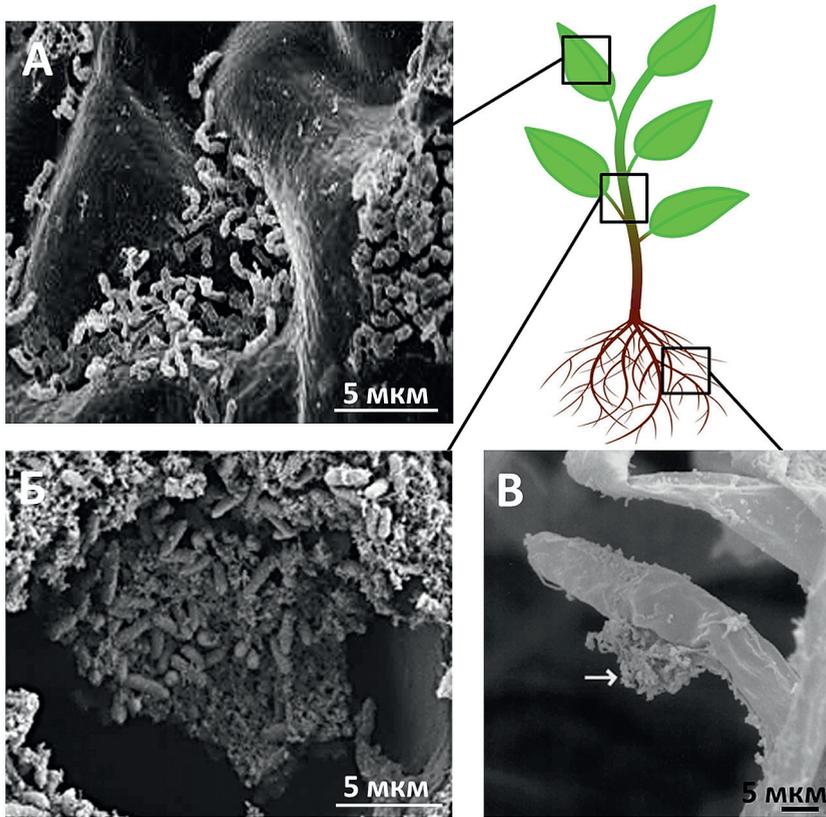


Рис. 3.8.2. Микрофотографии бактериальных биопленок в филлосфере (А) (Fett et al., 2000), сосудах ксилемы (Б) (Koutsoudis et al., 2006) и ризосфере (В) (Fett et al., 2000).

Обычно формирование биопленок фитопатогенами приурочено к колонизации покровов растений (ризосфера, филлосфера), а также сосудов ксилемы (Jacques et al., 2005; Caserta et al., 2010; Koczan et al., 2011) (рис. 3.8.2). Образование биопленок на покровных тканях растений предохраняет клетки микроорганизмов от многочисленных стрессовых факторов, например высыхания на поверхности листьев или антагонистического «поведения» представителей почвенной микрофлоры в ризосфере (Fukui, 2003; Flemming et al., 2016). В сосудах ксилемы формирование биопленок фитопатогенами представляет особую важность для микроорганизмов. Сложность колонизации сосудов заключается в интенсивном ксилемном транспорте воды. Транспирационный поток может создавать «хаос» в популяции микробов, не позволяя отдельным клеткам взаимодействовать друг с другом как физически, так и при помощи экстраклеточных сигналов межклеточной коммуникации, что является необходимым условием для вирулентности (см. главу 4.1). В составе биопленки бактерии могут «зацепиться» друг за друга и прикрепиться к поверхности стенки сосуда, что обеспечивает формирование от-

носителем упорядоченной структуры, в рамках которой может осуществляться «социальное» поведение микробов, в том числе координированное производство детерминант патогенности (Dow et al., 2003; West et al., 2006; Diggle, 2010).

Образование биопленок в сосудах ксилемы было описано на примере многих видов фитопатогенных бактерий: *Erwinia amylovora*, *Pantoea stewartii*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris*, *X. alfalfae*, *X. citri* и *Xylella fastidiosa* (Tyson et al., 1985; Tans-Kersten et al., 2001; Dow et al., 2003; Koutsoudis et al., 2006; Koczan et al., 2009; Mori et al., 2016). Считается, что интенсивное формирование бактериальных биопленок в ксилеме приводит к нарушению водного транспорта из-за механической блокировки сосудов бактериальными клетками и экзополисахаридами и поэтому является причиной увяданий (увяданий) растений (Kang et al., 2002; de Souza et al., 2004; Caserta et al., 2010; Koczan et al., 2011). В то же время роль биопленок в увядании растений на сегодняшний день дискуссионна; нарушение транспирационного потока в большей степени связывают с образованием в инфицированных растениях тилл и гелей — структур, которые образуются вследствие преобразования растительной клеточной стенки и вызывают «закупорку» сосудов (Bonsen, Kučera, 1990; Sun et al., 2007). Тиллы и гели часто определяют устойчивость к фитопатогенам, не позволяя бактериям системно распространяться по ксилеме с транспирационным потоком (см. главу 5.1). При этом интенсивное образование тилл и гелей может «задушить» растение при развитии бактериозов, благоприятствуя таким образом размножению патогена в теле хозяина (см. главу 7.3).

Среди «многоклеточных» структур, формируемых клетками фитопатогенных бактерий в растениях, помимо биопленок, были описаны **бактериальные эмболы** (Gorshkov et al., 2014). На сегодняшний день бактериальные эмболы были обнаружены только на примере фитопатогенных пектобактерий — возбудителей мокрых гнилей растений. Биопленки и бактериальные эмболы имеют сходства, связанные с «многоклеточностью» и формированием в сосудах ксилемы, но в то же время различаются как морфологическими особенностями, так и механизмами «сборки». В отличие от биопленок, в бактериальных эмболах отсутствуют каналы для циркуляции водных растворов; эмболы — очень плотные образования, которые полностью закупоривают сосуд ксилемы (рис. 3.8.3). Клетки в составе эмболов достаточно однородные; хотя, по мере «созревания» этих структур, претерпевают морфологические изменения (Gorshkov et al., 2014).

Процессы образования биопленок и бактериальных эмболов различаются. Если в случае биопленок начальной стадией формирования, как выше упоминалось, является прикрепление клеток к стенкам сосудов, то при сборке бактериальных эмболов бактерии не прикрепляются к растительным клеточным стенкам. «Концентрирование» бактерий в определенном участке сосуда при формировании эмбола обеспечивается благодаря локальному желированию ксилемного сока. Желирование при этом происходит вследствие «выброса» из растительных клеточных стенок в полость сосудов одного из типов пектиновых веществ — рамногалактуронана I.

Этот полимер служит в качестве первичного экстраклеточного матрикса для бактериальных клеток, который обеспечивает объединение отдельных микробных клеток в единую «многоклеточную» структуру (Gorshkov et al., 2016) (рис. 3.8.3). По мере уплотнения структуры бактериального эмбола пектиновый матрикс замещается бактериальными экзополисахаридами (Gorshkov et al., 2017).

Еще одним отличием бактериальных эмболов от биопленок является то, что эмболы, по всей видимости, не определяют агрессивное поведение микроорганизмов. В пользу этого свидетельствует формирование этих структур в сосудах только первичной ксилемы; во вторичной ксилеме — основной проводящей ткани растения — эмболы не образуются, и поэтому они не приводят к возникновению водного дефицита в растении. Кроме того, бактериальные эмболы были обнаружены не только при типичных (с выраженными симптомами), но и при латентных (скрытых) инфекциях, когда патологические процессы в инфицированном растении не развиваются.

Существует гипотеза, что бактериальные эмболы выполняют две функции, важные для бактерий, независимо от стратегии их взаимодействия с хозяином, то есть и при типичных, и при латентных инфекциях. Во-первых, благодаря блокированию водного потока в сосудах первичной ксилемы, эмболы могут обеспечить условия для нисходящей миграции бактерий по сосудам к подземным органам (корни, клубни) растения-хозяина, где микроорганизмы могут перезимовывать, находясь внутри макроорганизма, а не в агрессивной для патогенов почвенной экосистеме. Во-вторых, бактериальные эмболы, предположительно, являются структурами, образование которых необходимо для прохождения жизненного цикла. В пользу этого свидетельствует последовательная координированная модификация морфологии клеток бактерий в составе эмбола; при этом на терминальной стадии развития этой структуры клетки бактерий приобретают морфологию покоящихся форм, которые адаптированы для переживания вневегетационного периода и последующего инфицирования нового растения (Gorshkov et al., 2014).

Таким образом, процесс «цитодифференцировки» бактериальных клеток является важным аспектом взаимодействия фитопатогенов с растениями. Внутри растения клетки микроорганизма могут преобразовываться в функционально специализированные формы (некультивируемые клетки, L-формы) или «собираться» в тканеподобные структуры (биопленки, бактериальные эмболы). Сам растительный организм из-за подразделения на разные типы клеток и тканей с неоднородными и динамично меняющимися условиями формирует основу для реализации потенциала бактериальных клеток к функциональной специализации. В свою очередь, образование морфофизиологически разнородных клеток бактерий обеспечивает эффективное взаимодействие патогена с разными «компартаментами» растения, благоприятствует системной колонизации макроорганизма, а также позволяет патогену правильно подготовиться к переживанию межвегетационного периода.

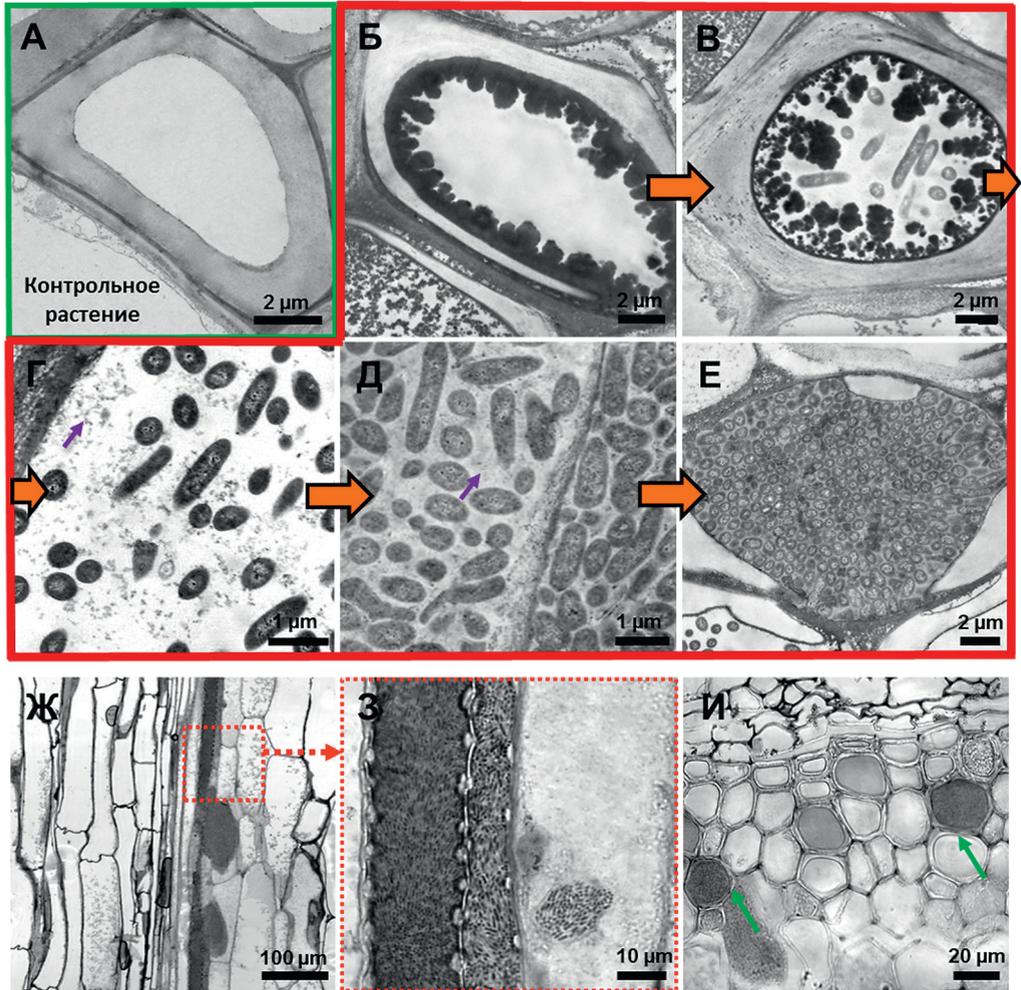


Рис. 3.8.3. Микрофотографии сосудов ксилемы растений, инфицированных *Pectobacterium atrosepticum*, при формировании бактериальных эмболов (Gorshkov et al., 2014).

А — сосуд контрольного неинфицированного растения. На фотографиях Б – Е представлены последовательные стадии формирования бактериального эмбола; сиреневыми стрелками обозначены субстанции, высвобождающиеся из растительной клеточной стенки, которые формируют экстраклеточный матрикс бактериальных эмболов. Ж — продольный срез стебля инфицированного растения в области сосудов первичной ксилемы. З — увеличенный фрагмент с бактериальными эмболами, выделенный на фотографии Ж. И — поперечный срез стебля инфицированного растения в области сосудов первичной ксилемы с бактериальными эмболами (обозначены зелеными стрелками).

Литература:

Горшков, В. Ю., Петрова, О. Е., Мухаметшина, Н. Е., Агеева, М. В., Мулюкин, А. Л., & Гоголев, Ю. В. (2009). Образование «некультивируемых» покоящихся форм фитопатогенной бактерии *Erwinia carotovora*. *Микробиология*, 78(5), 647–655.

Зигангирова, Н. А., Бархатова, О. И., Раковская, И. В., & Гинцбург, А. Л. (2003). Влияние факторов внешней среды на экспрессию гена *Mycoplasma pneumoniae*, детерминирующего синтез белка адгезии P1. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*, 4, 17.

Николаев, Ю. А., & Плакунов, В. К. (2007). Биопленка — «город микробов» или аналог многоклеточного организма? *Микробиология*, 76(2), 149–163.

Aertsen, A., & Michiels, C. W. (2005). Diversify or die: generation of diversity in response to stress. *Critical Reviews in Microbiology*, 31(2), 69–78.

Alexander, E., Pham, D., & Steck, T. R. (1999). The viable-but-nonculturable condition is induced by copper in *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium leguminosarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(8), 3754–3756.

Allan, E. J., Hoischen, C., & Gumpert, J. (2009). Bacterial L-Forms. *Advances in Applied Microbiology*, 68, 1–39.

Álvarez, B., López, M. M., & Biosca, E. G. (2008). Survival strategies and pathogenicity of *Ralstonia solanacearum* phylotype II subjected to prolonged starvation in environmental water microcosms. *Microbiology*, 154(11), 3590–3598.

Amel, B. K. N., Amine, B., & Amina, B. (2008). Survival of *Vibrio fluvialis* in seawater under starvation conditions. *Microbiological Research*, 163(3), 323–328.

Amijee, F., Allans, E. J., Waterhouse, R. N., Glover, L. A., & Paton, A. M. (1992). Non-pathogenic association of L-form bacteria (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*) with bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) and its potential for biocontrol of halo blight disease. *Biocontrol Science and Technology*, 2(3), 203–214.

Anuchin, A. M., Mulyukin, A. L., Suzina, N. E., Duda, V. I., El-Registan, G. I., & Kaprelyants, A. S. (2009). Dormant forms of *Mycobacterium smegmatis* with distinct morphology. *Microbiology*, 155(4), 1071–1079.

Balaban, N. Q., Merrin, J., Chait, R., Kowalik, L., & Leibler, S. (2004). Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science*, 305(5690), 1622–1625.

Baulina, O. I. (2008). Population cytology and its role in research of life activity of procaryotes. *Moscow University Biological Sciences Bulletin*, 63(1), 32–39.

Bogino, P. C., Oliva, M. D. L. M., Sorroche, F. G., & Giordano, W. (2013). The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(8), 15838–15859.

Bonsen, K. J., & Kučera, L. J. (1990). Vessel occlusions in plants: morphological, functional and evolutionary aspects. *IAWA Journal*, 11(4), 393–399.

Booth, I. R. (2002). Stress and the single cell: intrapopulation diversity is a mechanism to ensure survival upon exposure to stress. *International Journal of Food Microbiology*, 78(1), 19–30.

Bunker, S. T., Bates, T. C., & Oliver, J. D. (2004). Effects of temperature on detection of plasmid or chromosomally encoded *gfp*- and *lux*-labeled *Pseudomonas fluorescens* in soil. *Environmental Biosafety Research*, 3(2), 83–90.

Campo, R., Russi, P., Mara, P., Mara, H., Peyrou, M., De León, I. P., & Gaggero, C. (2009). *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* enters the VBNC state after copper treatment and retains its virulence. *FEMS Microbiology Letters*, 298(2), 143–148.

Casadesús, J. (2007). Bacterial L-forms require peptidoglycan synthesis for cell division. *Bioessays*, 29(12), 1189–1191.

Caserta, R., Takita, M. A., Targon, M. L., Rosselli-Murai, L. K., De Souza, A. P., Peroni, L., ... & Machado, M. A. (2010). Expression of *Xylella fastidiosa* fimbrial and afimbrial proteins during biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(13), 4250–4259.

Chernov, V. M., Chernova, O. A., Mouzykantov, A. A., Ponomareva, A. A., Trushin, M. V., Gorshkov, O. V., & Nesterova, T. N. (2010). Phytopathogenicity of avian mycoplasma *Mycoplasma gallisepticum* S6: morphologic and ultracytostructural changes in plants infected with the vegetative forms and the viable but nonculturable forms of the bacterium. *Microbiological Research*, 165(4), 346–350.

Choi, J. H., Cho, Y. S., & Park, E. W. (1988). Spheroplast formation and regeneration of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*. *Korean Journal of Plant Pathology (Korea R.)*, 4(4), 297–304.

Conrad, A., Kontro, M., Keinänen, M. M., Cadoret, A., Faure, P., Mansuy-Huault, L., & Block, J. C. (2003). Fatty acids of lipid fractions in extracellular polymeric substances of activated sludge flocs. *Lipids*, 38(10), 1093–1105.

Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., & Lappin-Scott, H. M. (1995). Microbial biofilms. *Annual Reviews in Microbiology*, 49(1), 711–745.

Danhorn, T., & Fuqua, C. (2007). Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annual Reviews of Microbiology*, 61, 401–422.

Day, A. P., & Oliver, J. D. (2004). Changes in membrane fatty acid composition during entry of *Vibrio vulnificus* into the viable but nonculturable state. *The Journal of Microbiology*, 42(2), 69–73.

de Souza, A. A., Takita, M. A., Coletta-Filho, H. D., Caldana, C., Yanai, G. M., Muto, N. H., ... & Machado, M. A. (2004). Gene expression profile of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* during biofilm formation *in vitro*. *FEMS Microbiology Letters*, 237(2), 341–353.

den Besten, H. M., Ingham, C. J., van Hylckama Vlieg, J. E., Beerthuyzen, M. M., Zwietering, M. H., & Abee, T. (2007). Quantitative analysis of population heterogeneity of the adaptive salt stress response and growth capacity of *Bacillus cereus* ATCC 14579. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(15), 4797–4804.

Diggle, S. P. (2010). Microbial communication and virulence: lessons from evolutionary theory. *Microbiology*, 156(12), 3503–3512.

Dow, J. M., Crossman, L., Findlay, K., He, Y. Q., Feng, J. X., & Tang, J. L. (2003). Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell — cell signaling and is required for full virulence to plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(19), 10995–11000.

Dunne, W. M. (2002). Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 155–166.

Elvira-Recuenco, M., & van Vuurde, J. W. (2003). Efficiency of procedures for induction and cultivation of *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* L-form. *Microbiological Research*, 158(4), 271–279.

Errington, J. (2013). L-form bacteria, cell walls and the origins of life. *Open Biology*, 3(1), 120143.

Fett, W. F. (2000). Naturally occurring biofilms on alfalfa and other types of sprouts. *Journal of Food Protection*, 63(5), 625–632.

Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 563–575.

Fukui, R. (2003). Suppression of soilborne plant pathogens through community evolution of soil microorganisms. *Microbes and Environments*, 18(1), 1–9.

Gefen, O., & Balaban, N. Q. (2009). The importance of being persistent: heterogeneity of bacterial populations under antibiotic stress. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(4), 704–717.

Ghezzi, J. I., & Steck, T. R. (1999). Induction of the viable but non-culturable condition in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in liquid microcosms and sterile soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 30(3), 203–208.

Gilbert, P., Das, J., & Foley, I. (1997). Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Advances in Dental Research*, 11(1), 160–167.

Gorshkov, V. Y., Daminova, A. G., Mikshina, P. V., Petrova, O. E., Ageeva, M. V., Salnikov, V. V., ... & Gogolev, Y. V. (2016). Pathogen-induced conditioning of the primary xylem vessels — a prerequisite for the formation of bacterial emboli by *Pectobacterium atrosepticum*. *Plant Biology*, 18(4), 609–617.

Gorshkov, V., Daminova, A., Ageeva, M., Petrova, O., Gogoleva, N., Tarasova, N., & Gogolev, Y. (2014). Dissociation of a population of *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 in tobacco plants: formation of bacterial emboli and dormant cells. *Protoplasma*, 251(3), 499–510.

Gorshkov, V., Islamov, B., Mikshina, P., Petrova, O., Burygin, G., Sigida, E., ... & Gogolev, Y. (2017). *Pectobacterium atrosepticum* exopolysaccharides: identification, molecular structure, formation under stress and *in planta* conditions. *Glycobiology*, 27(11), 1016–1026.

Grey, B. E., & Steck, T. R. (2001). The viable but nonculturable state of *Ralstonia solanacearum* may be involved in long-term survival and plant infection. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(9), 3866–3872.

Heimbeck, L. S., Louise S. (1954). On the etiology of brown roots, yellowing and wilt due to 'B type (Dienes) L. (Kleineberger) forms' of bacteria with special reference to Pea wilt. Oslo, Dreyers Forlag.

Herrera, E., Huertos M. R. & Jurado O. G. (1976). Stable L-phase of *Erwinia carotovora* induced by ultraviolet irradiation. *Phytopathology*, 66, 400–405.

- Hoiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., & Ciofu, O. (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35(4), 322–332.
- Ingham, C. J., Beerthuyzen, M., & van Hylckama Vlieg, J. (2008). Population heterogeneity of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 microcolonies in response to and recovery from acid stress. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(24), 7750–7758.
- Jacques, M. A., Josi, K., Darrasse, A., & Samson, R. (2005). *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* is aggregated in stable biofilm population sizes in the phyllosphere of field-grown beans. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(4), 2008–2015.
- Jiang, N., Lv, Q. Y., Xu, X., Cao, Y. S., Walcott, R. R., Li, J. Q., & Luo, L. X. (2016). Induction of the viable but nonculturable state in *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and *in planta* resuscitation of the cells on tomato seedlings. *Plant Pathology*, 65(5), 826–836.
- Jones, S. M., & Paton, A. M. (1973). The L-Phase of *Erwinia carotovora* var. *atroseptica* and its possible association with plant tissue. *Journal of Applied Microbiology*, 36(4), 729–737.
- Kang, Y., Liu, H., Genin, S., Schell, M. A., & Denny, T. P. (2002). *Ralstonia solanacearum* requires type 4 pili to adhere to multiple surfaces and for natural transformation and virulence. *Molecular Microbiology*, 46(2), 427–437.
- Kawai, Y., Mercier, R., Wu, L. J., Domínguez-Cuevas, P., Oshima, T., & Errington, J. (2015). Cell growth of wall-free L-form bacteria is limited by oxidative damage. *Current Biology*, 25(12), 1613–1618.
- Khan, M. M. T., Pyle, B. H., & Camper, A. K. (2010). Specific and rapid enumeration of viable but nonculturable and viable-culturable gram-negative bacteria by using flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(15), 5088–5096.
- Koczan, J. M., Lenneman, B. R., McGrath, M. J., & Sundin, G. W. (2011). Cell surface attachment structures contribute to biofilm formation and xylem colonization by *Erwinia amylovora*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(19), 7031–7039.
- Koczan, J. M., McGrath, M. J., Zhao, Y., & Sundin, G. W. (2009). Contribution of *Erwinia amylovora* exopolysaccharides amylovoran and levan to biofilm formation: implications in pathogenicity. *Phytopathology*, 99(11), 1237–1244.
- Kondo, K., Takade, A., & Amako, K. (1994). Morphology of the viable but nonculturable *Vibrio cholerae* as determined by the freeze fixation technique. *FEMS Microbiology Letters*, 123(1-2), 179–184.
- Kong, H. G., Bae, J. Y., Lee, H. J., Joo, H. J., Jung, E. J., Chung, E., & Lee, S. W. (2014). Induction of the viable but nonculturable state of *Ralstonia solanacearum* by low temperature in the soil microcosm and its resuscitation by catalase. *PLoS ONE*, 9(10), e109792.
- Koutsoudis, M. D., Tsaltas, D., Minogue, T. D., & von Bodman, S. B. (2006). Quorum-sensing regulation governs bacterial adhesion, biofilm development, and host colonization in *Pantoea stewartii* subspecies *stewartii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(15), 5983–5988.
- Kumar, A. S., & Mody, K. (2009). Microbial exopolysaccharides: variety and potential applications. In: *Microbial Production of Biopolymers and Polymer Precursors: Applications and Perspectives*. Caister Academic Press, 229–254.

Kussell, E., & Leibler, S. (2005). Phenotypic diversity, population growth, and information in fluctuating environments. *Science*, 309(5743), 2075–2078.

Landman, O. E., & Halle, S. (1963). Enzymically and physically induced inheritance changes in *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Biology*, 7(6), 721IN19-738.

Lidstrom, M. E., & Konopka, M. C. (2010). The role of physiological heterogeneity in microbial population behavior. *Nature Chemical Biology*, 6(10), 705-712.

Linder, K. & Oliver, J. D. (1989). Membrane fatty acid and virulence changes in the viable but nonculturable state of *Vibrio vulnificus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(11), 2837–2842.

Lleò, M., Benedetti, D., Tafi, M. C., Signoretto, C., & Canepari, P. (2007). Inhibition of the resuscitation from the viable but non-culturable state in *Enterococcus faecalis*. *Environmental Microbiology*, 9(9), 2313–2320.

Madoff, S. (1981). The L-forms of bacteria. In: *The Prokaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria*. Springer-Verlag, Berlin, 2225–2237.

Malinovsky, F. G., Fangel, J. U., & Willats, W. G. (2014). The role of the cell wall in plant immunity. *Frontiers in Plant Science*, 5, 178.

McDougald, D., Rice, S. A., Weichart, D., & Kjelleberg, S. (1998). Nonculturability: adaptation or debilitation? *FEMS Microbiology Ecology*, 25(1), 1–9.

Miedes, E., Vanholme, R., Boerjan, W., & Molina, A. (2014). The role of the secondary cell wall in plant resistance to pathogens. *Frontiers in Plant Science*, 5, 358.

Mori, Y., Inoue, K., Ikeda, K., Nakayashiki, H., Higashimoto, C., Ohnishi, K., ... & Hikichi, Y. (2016). The vascular plant-pathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum* produces biofilms required for its virulence on the surfaces of tomato cells adjacent to intercellular spaces. *Molecular Plant Pathology*, 17(6), 890–902.

Mukamolova, G. V., Murzin, A. G., Salina, E. G., Demina, G. R., Kell, D. B., Kaprelyants, A. S., & Young, M. (2006). Muralytic activity of *Micrococcus luteus* Rpf and its relationship to physiological activity in promoting bacterial growth and resuscitation. *Molecular Microbiology*, 59(1), 84–98.

Mukamolova, G. V., Turapov, O. A., Kazarian, K., Telkov, M., Kaprelyants, A. S., Kell, D. B., & Young, M. (2002). The *rpf* gene of *Micrococcus luteus* encodes an essential secreted growth factor. *Molecular Microbiology*, 46(3), 611–621.

Mukamolova, G. V., Yanopolskaya, N. D., Kell, D. B., & Kaprelyants, A. S. (1998). On resuscitation from the dormant state of *Micrococcus luteus*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 73(3), 237–243.

Mukamolova, G. V., Yanopolskaya, N. D., Votyakova, T. V., Popov, V. I., Kaprelyants, A. S., & Kell, D. B. (1995). Biochemical changes accompanying the long-term starvation of *Micrococcus luteus* cells in spent growth medium. *Archives of Microbiology*, 163(5), 373–379.

Neelakanta, G., & Sultana, H. (2013). The use of metagenomic approaches to analyze changes in microbial communities. *Microbiology Insights*, 6, 37–48.

Neimark, H. C. (1986). Origin and evolution of wall-less prokaryotes. In: *The Bacterial L-Forms*. Springer, 21–42.

Nowakowska, J., & Oliver, J. D. (2013). Resistance to environmental stresses by *Vibrio vulnificus* in the viable but nonculturable state. *FEMS Microbiology Ecology*, 84(1), 213–222.

Oliver, J. D. (2010). Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(4), 415–425.

Ordax, M., Marco-Noales, E., López, M. M., & Biosca, E. G. (2006). Survival strategy of *Erwinia amylovora* against copper: induction of the viable-but-nonculturable state. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(5), 3482–3488.

Panicker, B., Thomas, P., Janakiram, T., Venugopalan, R., & Narayanappa, S. B. (2007). Influence of cytokinin levels on *in vitro* propagation of shy suckering chrysanthemum “Arka Swarna” and activation of endophytic bacteria. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 43(6), 614–622.

Paton, A. M., & Innes, C. M. (1991). Methods for the establishment of intracellular associations of L-forms with higher plants. *Journal of Applied Microbiology*, 71(1), 59–64.

Patyka, V., Buletsa, N., Pasichnyk, L., Zhitkevich, N., Kalinichenko, A., Gnatiuk, T., & Butsenko, L. (2016). Specifics of pesticides effects on the phytopathogenic bacteria. *Ecological Chemistry and Engineering S*, 23(2), 311–331.

Petrova, O., Gorshkov, V., Sergeeva, I., Daminova, A., Ageeva, M., & Gogolev, Y. (2016). Alternative scenarios of starvation-induced adaptation in *Pectobacterium atrosepticum*. *Research in Microbiology*, 167(4), 254–261.

Postnikova, O. A., Shao, J., Mock, N. M., Baker, C. J., & Nemchinov, L. G. (2015). Gene expression profiling in viable but nonculturable (VBNC) cells of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1419.

Quiñones, B., Dulla, G., & Lindow, S. E. (2005). Quorum sensing regulates exopolysaccharide production, motility, and virulence in *Pseudomonas syringae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18(7), 682–693.

Ramamurthy, T., Ghosh, A., Pazhani, G. P., & Shinoda, S. (2014). Current perspectives on viable but non-culturable (VBNC) pathogenic bacteria. *Frontiers in Public Health*, 2, 103.

Rinaudi, L. V., & Giordano, W. (2010). An integrated view of biofilm formation in rhizobia. *FEMS Microbiology Letters*, 304(1), 1–11.

Santander, R. D., & Biosca, E. G. (2017). *Erwinia amylovora* psychrotrophic adaptations: evidence of pathogenic potential and survival at temperate and low environmental temperatures. *PeerJ*, 5, e3931.

Shapiro, J. A. (1998). Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. *Annual Reviews in Microbiology*, 52(1), 81–104.

Sharp, J. T. (1954). L-colonies from hemolytic streptococci: new technic in the study of L-forms of bacteria. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 87(1), 94–97.

Shleeva, M., Mukamolova, G. V., Young, M., Williams, H. D., & Kaprelyants, A. S. (2004). Formation of 'non-culturable' cells of *Mycobacterium smegmatis* in stationary phase in response to growth under suboptimal conditions and their Rpf-mediated resuscitation. *Microbiology*, 150(6), 1687–1697.

Signoretto, C., del Mar Lleo, M., & Canepari, P. (2002). Modification of the peptidoglycan of *Escherichia coli* in the viable but nonculturable state. *Current Microbiology*, 44(2), 125–131.

Signoretto, C., del Mar Lleò, M., Tafi, M. C., & Canepari, P. (2000). Cell wall chemical composition of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), 1953–1959.

Singh, S., Singh, S. K., Chowdhury, I., & Singh, R. (2017). Understanding the mechanism of bacterial biofilms resistance to antimicrobial agents. *The Open Microbiology Journal*, 11, 53–62.

Stanley, N. R., & Lazazzera, B. A. (2004). Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Molecular Microbiology*, 52(4), 917–924.

Stewart, P. S. (2002). Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *International Journal of Medical Microbiology*, 292(2), 107–113.

Strang, J. A., Allan, E. J., Seddon, B., & Paton, A. M. (1991). Induction of *Bacillus brevis* L-forms. *Journal of Applied Microbiology*, 70(1), 47–51.

Strovas, T. J., Sauter, L. M., Guo, X., & Lidstrom, M. E. (2007). Cell-to-cell heterogeneity in growth rate and gene expression in *Methylobacterium extorquens* AM1. *Journal of Bacteriology*, 189(19), 7127–7133.

Su, X., Chen, X., Hu, J., Shen, C., & Ding, L. (2013). Exploring the potential environmental functions of viable but non-culturable bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(12), 2213–2218.

Su, X., Zhang, Q., Hu, J., Hashmi, M. Z., Ding, L., & Shen, C. (2015). Enhanced degradation of biphenyl from PCB-contaminated sediments: the impact of extracellular organic matter from *Micrococcus luteus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(4), 1989–2000.

Sun, Q., Rost, T. L., Reid, M. S., & Matthews, M. A. (2007). Ethylene and not embolism is required for wound-induced tylose development in stems of grapevines. *Plant Physiology*, 145(4), 1629–1636.

Sunagawa, S., Mende, D. R., Zeller, G., Izquierdo-Carrasco, F., Berger, S. A., Kultima, J. R., ... & Rasmussen, S. (2013). Metagenomic species profiling using universal phylogenetic marker genes. *Nature Methods*, 10(12), 1196–1199.

Tans-Kersten J., Huang H., Allen C. (2001). *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato. *Journal of Bacteriology*, 183(12), 3597–3605.

Thakur, M., & Sohal, B. S. (2013). Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: a review. *ISRN Biochemistry*, 2013.

Thomas, P. (2004a). *In vitro* decline in plant cultures: detection of a legion of covert bacteria as the cause for degeneration of long-term micropropagated triploid watermelon cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 77(2), 173–179.

Thomas, P. (2004b). A three-step screening procedure for detection of covert and endophytic bacteria in plant tissue cultures. *Current Science*, 87(1), 67–72.

Thomas, P., Swarna, G. K., Patil, P., & Rawal, R. D. (2008a). Ubiquitous presence of normally non-culturable endophytic bacteria in field shoot-tips of banana and their gradual activation to quiescent cultivable form in tissue cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 93(1), 39–54.

Thomas, P., Swarna, G. K., Roy, P. K., & Patil, P. (2008b). Identification of culturable and originally non-culturable endophytic bacteria isolated from shoot tip cultures of banana cv. Grand Naine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 93(1), 55.

Thomas, T., Gilbert, J., & Meyer, F. (2012). Metagenomics—a guide from sampling to data analysis. *Microbial Informatics and Experimentation*, 2(1), 3.

Tringe, S. G., Von Mering, C., Kobayashi, A., Salamov, A. A., Chen, K., Chang, H. W., ... & Bork, P. (2005). Comparative metagenomics of microbial communities. *Science*, 308(5721), 554–557.

Tyson, G. E., Stojanovic, B. J., Kuklinski, R. F., DiVittorio, T. J., & Sullivan, M. L. (1985). Scanning electron microscopy of Pierce's disease bacterium in petiolar xylem of grape leaves. *Phytopathology*, 75(3), 264–269.

Vora, G. J., Meador, C. E., Bird, M. M., Bopp, C. A., Andreadis, J. D., & Stenger, D. A. (2005). Microarray-based detection of genetic heterogeneity, antimicrobial resistance, and the viable but nonculturable state in human pathogenic *Vibrio* spp. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(52), 19109–19114.

Walker, T. S., Bais, H. P., Déziel, E., Schweizer, H. P., Rahme, L. G., Fall, R., & Vivanco, J. M. (2004). *Pseudomonas aeruginosa*-plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formation, and root exudation. *Plant Physiology*, 134(1), 320–331.

Warner, J. M., & Oliver, J. D. (1998). Randomly amplified polymorphic DNA analysis of starved and viable but nonculturable *Vibrio vulnificus* cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(8), 3025–3028.

Weichart, D., & Kjelleberg, S. (1996). Stress resistance and recovery potential of culturable and viable but nonculturable cells of *Vibrio vulnificus*. *Microbiology*, 142(4), 845–853.

West, S. A., Griffin, A. S., Gardner, A., & Diggle, S. P. (2006). Social evolution theory for microorganisms. *Nature Reviews Microbiology*, 4(8), 597–607.

Wiesel, L., Newton, A. C., Elliott, I., Booty, D., Gilroy, E. M., Birch, P. R., & Hein, I. (2014). Molecular effects of resistance elicitors from biological origin and their potential for crop protection. *Frontiers in Plant Science*, 5, 655.

Wilson, M., & Lindow, S. E. (1992). Relationship of total viable and culturable cells in epiphytic populations of *Pseudomonas syringae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(12), 3908–3913.

Wong, H. C., & Wang, P. (2004). Induction of viable but nonculturable state in *Vibrio parahaemolyticus* and its susceptibility to environmental stresses. *Journal of Applied Microbiology*, 96(2), 359–366.

Xu, H. S., Roberts, N., Singleton, F. L., Attwell, R. W., Grimes, D. J., & Colwell, R. R. (1982). Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microbial Ecology*, 8(4), 313–323.

Глава 4

РЕГУЛЯЦИЯ ПРОДУКЦИИ ФАКТОРОВ ВИРУЛЕНТНОСТИ

Наличие у фитопатогенных бактерий большого арсенала факторов вирулентности является не единственным критерием их способности колонизировать растение, поскольку конститутивная продукция детерминант патогенности не обеспечивала бы той эффективности взаимодействия с хозяином, как при строгом контроле их синтеза. Это связано с тем, что, во-первых, продукция факторов вирулентности — это энергетически затратный процесс, поэтому синтез тех или иных детерминант патогенности должен осуществляться только при строгой необходимости (например, на определенной стадии взаимодействия с растением). Во-вторых, многие (если не все) факторы вирулентности (или продукты их действия) обладают элиситорной активностью, то есть формируют сигнальный фон, активирующий защитные системы растений. Преждевременное превышение критической дозы таких сигналов может вызвать мощный иммунный ответ растения и элиминацию патогена. В связи с этим продукция факторов вирулентности патогенов тщательно контролируется разнообразными регуляторными системами прокариот в зависимости от плотности их популяции, тех или иных метаболитов растения-хозяина, а также комплекса физико-химических факторов.

4.1. Регуляторная система «чувства кворума» (quorum sensing)

Наиболее интенсивно изучаемой регуляторной системой прокариот является система «чувства кворума», или «кворум сенсинга» (quorum sensing), которая контролирует проявление различных бактериальных фенотипов в зависимости от плотности популяции микроорганизмов. Кворум сенсинг — это феномен межклеточной коммуникации бактерий, которая осуществляется с помощью легко диффундирующих из клеток низкомолекулярных медиаторов (аутоиндукторов) и регулируется по принципу положительной обратной связи. Кворум-зависимая регуляция позволяет на популяционном уровне скоординировать физиологические реакции бактерий, благодаря чему группа клеток способна действовать согласованно. Большое значение эта система имеет для «грамотной» оптимизации продукции факторов вирулентности, в том числе у фитопатогенных бактерий (Waters, Bassler, 2005).

Согласно принципу «один в поле не воин», микроорганизмы при низкой плотности популяции обычно не продуцируют большое количество детерминант патогенности, поскольку их синтез в растении-хозяине неизбежно приводит к появлению элиситоров — физиологически активных соединений, которые индуцируют фитоиммунные ответы хозяина. Так, например, бактериальные ферменты, разрушающие растительную клеточную стенку, являются причиной распада сложных

полисахаридов хозяина и появления в результате этого олигосахаридных «обломков», воспринимаемых растением как сигнал опасности (см. главы 5.1, 6.1). Поэтому, чтобы предотвратить преждевременную активацию защитных систем растения, синтез факторов вирулентности обычно осуществляется микроорганизмами координированно и только относительно большой группой клеток, которая способна противостоять иммунным ответам хозяина. Такой принцип регуляции продукции детерминант патогенности на молекулярном уровне обеспечивает система кворум сенсинга.

Несмотря на определяющую роль в регуляции синтеза факторов вирулентности, система кворума была открыта на примере непатогенных бактерий *Vibrio fischeri*, которые являются симбионтами моллюска *Euprymna scolopes* (Fuqua, Winans, 1994). Эти бактерии обитают в специальном органе моллюска, который светится благодаря люминесценции живущих в нем бактерий. Продукция люминесцентных белков осуществляется этой бактерией только при высокой плотности популяции, достигаемой в световом органе макроорганизма-симбионта. Оказалось, что синтез этих белков регулируют производимые микроорганизмами низкомолекулярные аутоиндукторы — ацилированные лактоны гомосерина (ацил-гомосеринлактоны, или АГЛ) (рис. 4.1.1), которые свободно диффундируют из клетки в клетку и по мере увеличения плотности популяции накапливаются в бактериальном микроокружении (Whitehead et al., 2001).

Механизм работы системы кворума *V. fischeri* основан на синтезе и рецепции АГЛ. При низкой плотности популяции продукция АГЛ репрессирована и осуществляется с небольшой интенсивностью из-за низкого содержания в клетках ферментов биосинтеза этих аутоиндукторов — АГЛ-синтаз — белков семейства LuxI. Вследствие увеличения плотности бактериальной популяции, несмотря на низкий уровень биосинтеза, АГЛ накапливаются как в окружающей среде, так и в самих клетках, что приводит к взаимодействию аутоиндукторов с сенсорными белками семейства LuxR. Эти белки служат в качестве регуляторов транскрипции большой группы генов, в число которых входит ген АГЛ-синтазы. При связывании АГЛ с сенсорами происходит дерепрессия транскрипции кворум-зависимых генов и активируется продукция АГЛ-синтаз, которые, в свою очередь, обеспечивают еще большее увеличение уровня АГЛ (Waters, Bassler, 2005) (рис. 4.1.2).

Таким образом, АГЛ, по сути, являются индукторами своего собственного биосинтеза, что формирует положительную обратную связь в механизме активации системы кворума и приводит к лавинообразному накоплению аутоиндукторов в среде. АГЛ-сенсорные белки при этом в зависимости от таксономической принадлежности микроорганизма могут работать по-разному. Некоторые из АГЛ-сенсоров, связываясь с промоторными областями целевых генов, выступают в качестве репрессоров их транскрипции; при взаимодействии с АГЛ конформация этих белков меняется, что снижает их сродство к промоторным областям и дерепрессивует транскрипцию кворум-зависимых генов. Другие АГЛ-сенсоры, наоборот, являются активаторами транскрипции и взаимодействуют с промоторными областями целевых генов только при связывании с АГЛ (Subramoni, Venturi, 2009).

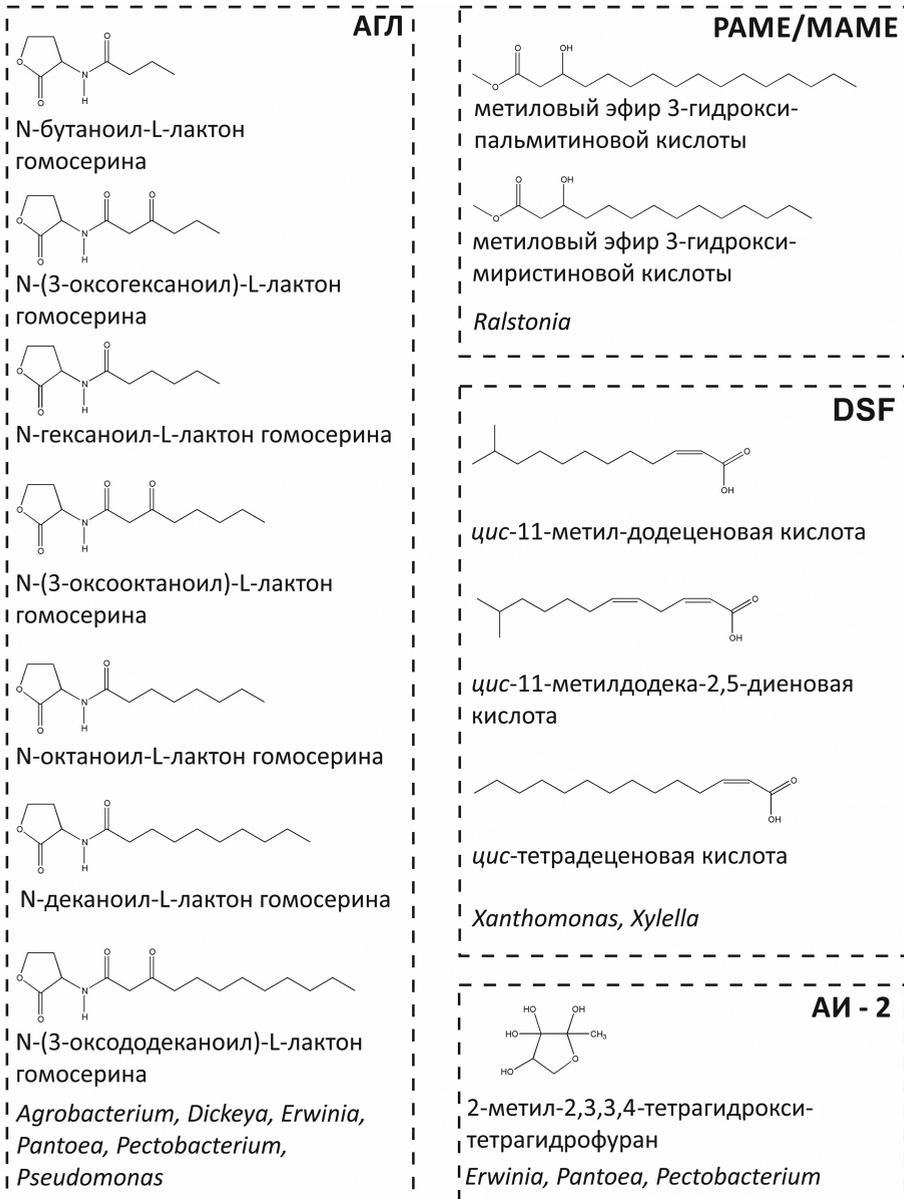


Рис. 4.1.1. Медиаторы систем кворум сенсинга, описанные у фитопатогенных бактерий.

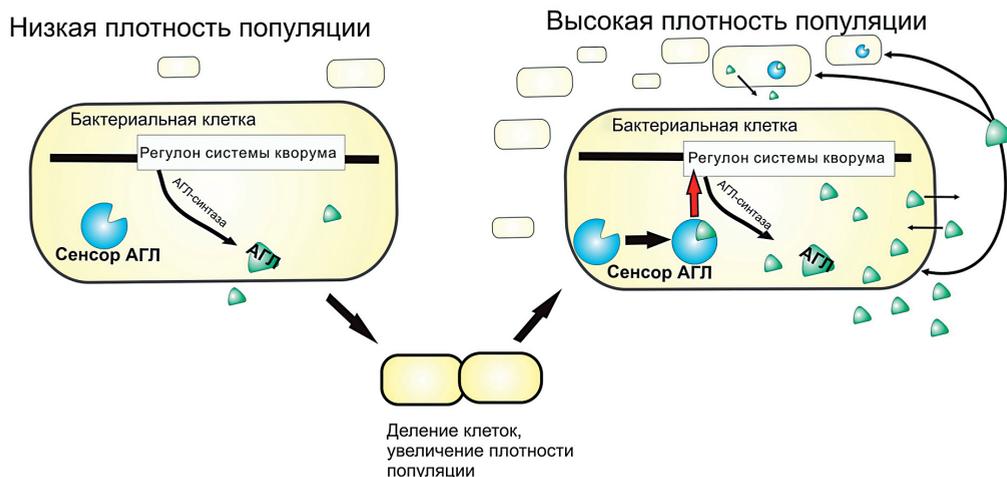


Рис. 4.1.2. Схема регуляции АГЛ-зависимой системы кворум сенсинга. При низкой плотности популяции и низкой концентрации АГЛ транскрипция кворум-зависимых генов репрессирована. В процессе увеличения плотности популяции АГЛ накапливаются и взаимодействуют с сенсорным белком. Комплекс «АГЛ+сенсор» активирует транскрипцию регулона системы кворума, в состав которого, в частности, входит ген АГЛ-синтазы. В результате этого интенсифицируется продукция АГЛ, что приводит к еще большей активации системы кворума.

АГЛ-зависимая система кворума была обнаружена, помимо *V. fischeri*, у многих бактерий, в том числе фитопатогенных *Pseudomonas syringae*, *Agrobacterium tumefaciens*, а также у многочисленных представителей фитопатогенных энтеробактерий (рода *Erwinia*, *Pantoea*, *Dickeya*, *Pectobacterium*) (Withers et al., 2001; Loh et al., 2002; Case et al., 2008). У фитопатогенов система кворума контролирует такие процессы, как синтез ферментов, разрушающих растительную клеточную стенку, продукцию компонентов систем секреции, подвижность, образование экзополисахаридов, перенос плазмид, образование биопленок и т. д. Неоднократно было продемонстрировано, что «отключение» АГЛ-зависимых систем кворума негативно сказывается на вирулентности фитопатогенных микроорганизмов. Так, например, мутация в генах АГЛ-синтаз репрессировывает у представителей родов *Pectobacterium* и *Dickeya* продукцию ферментов, разрушающих растительную клеточную стенку (Pirhonen et al., 1993; Burt et al., 2006; Potrykus et al., 2017), а у родов *Pseudomonas* и *Pantoea* — синтез экстраклеточных полисахаридов (von Bodman et al., 1998; Quinones et al., 2005).

Разные виды бактерий, в том числе разные фитопатогены, могут использовать в качестве аутоиндукторов межклеточной коммуникации отличные от АГЛ соединения (рис. 4.1.1). Так, у ксантомонад и ксилелл медиаторами систем кворума служат производные *cis*-2-ненасыщенных жирных кислот, которые были названы DSF (diffusible signal factor). При низкой плотности популяции DSF синтезируют

ются с малой интенсивностью, вследствие того, что фермент их биосинтеза RpfF (regulation of pathogenicity factors) репрессирован мембраносвязанным сенсором DSF (RpfC). При высокой плотности популяции, когда DSF накапливаются в среде и взаимодействуют с RpfC, происходит диссоциация RpfF-RpfC-комплекса. В результате этого синтаза DSF дерепрессируется, и происходит резкое накопление DSF в среде (Srivastava, Waters, 2012; An et al., 2013; Dow, 2017) (рис. 4.1.3). Таким образом, положительная обратная связь при активации DSF-зависимой системы формируется из-за прямого обратимого белок-белкового взаимодействия синтазы RpfF и сенсора RpfC, а не за счет активации транскрипции гена синтазы аутоиндукторов, как в случае АГЛ-зависимой системы кворума. Это подтверждается, в частности, повышенным уровнем биосинтеза DSF мутантными по гену *rpfC* штаммами ксантомад и ксилелл по сравнению с бактериями дикого типа (He et al., 2006a; Chatterjee et al., 2008).

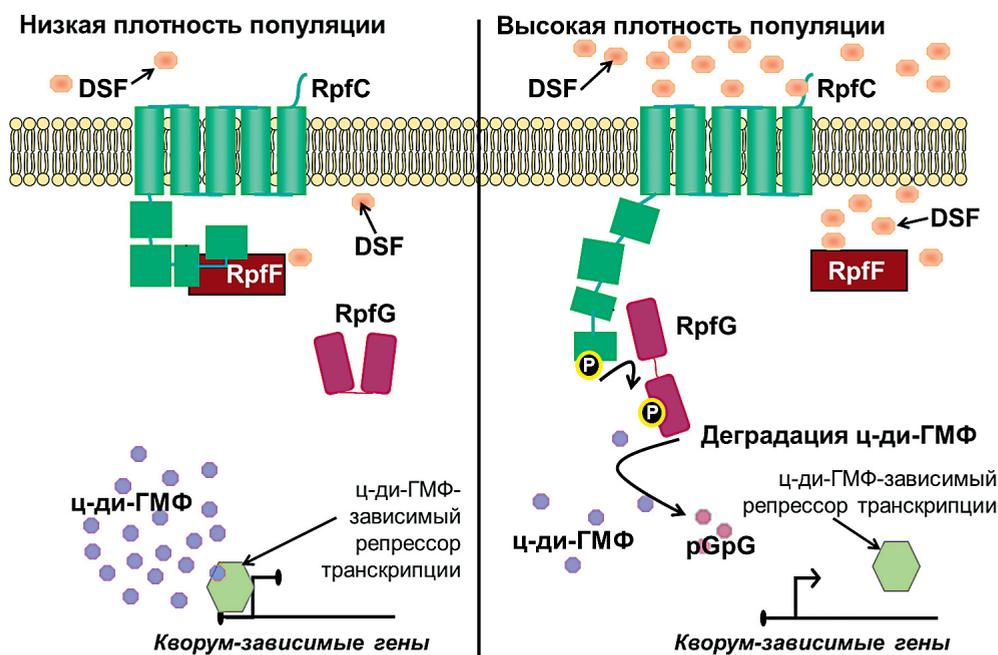


Рис. 4.1.3. Схема регуляции DSF-зависимой системы кворум сенсинга. При низкой плотности популяции концентрация DSF низкая из-за репрессии DSF-синтазы RpfF мембраносвязанным DSF-сенсором RpfC, а транскрипция кворум-зависимых генов подавлена ц-ди-ГМФ-зависимым репрессором транскрипции. При увеличении плотности бактериальной популяции DSF накапливаются и взаимодействуют с RpfC, что дерепрессирует работу DSF-синтазы RpfF и приводит к увеличению содержания DSF. Связанный с DSF RpfC способен активировать белок RpfG, который разрушает ц-ди-ГМФ. Разрушение ц-ди-ГМФ инактивирует ц-ди-ГМФ-зависимый репрессор транскрипции кворум-зависимых генов, благодаря чему происходит активация их экспрессии. Дополнительные пояснения к рисунку — в тексте.

На сегодняшний день обсуждается два возможных механизма регуляции экспрессии DSF-зависимых генов. В случае первого механизма, характерного и для ксилелл, и для ксантомонад, регуляторный эффект на транскрипцию кворум-зависимых генов достигается при участии вторичного посредника (мессенджера) циклического дигуанозинмонофосфата (ц-ди-ГМФ). При этом сенсор RpfC, фосфорилированный в результате взаимодействия с DSF, активирует белок RpfG. Этот белок, благодаря наличию фосфодиэстеразной активности, разрушает ц-ди-ГМФ, который, в свою очередь, контролирует репрессорные функции кворум-зависимых факторов регуляции транскрипции. Кворум-зависимое разрушение ц-ди-ГМФ таким образом приводит к дерепрессии транскрипции кворум-зависимых генов (Srivastava, Waters 2012; Dow, 2017) (рис. 4.1.3).

Второй способ передачи сигнала кворума, описанный для ксантомонад, но не для ксилелл, связан со взаимодействием DSF с цитоплазматическим сенсором RpfS. DSF-RpfS-комплекс, в свою очередь, активирует фактор регуляции транскрипции XC_2578, координирующий экспрессию кворум-зависимых генов (An et al., 2014).

Влияние DSF-зависимой системы кворума на продукцию факторов вирулентности неоднозначное. У ксантомонад индукция этой системы, как и в случае вышеописанных АГЛ-зависимых систем кворума других микроорганизмов, активирует экспрессию генов факторов вирулентности (экзополисахарид ксантан, целлюлаза, пектацелиаза, протеаза, липаза, белки жгутиков и пилей IV типа) (Tang et al., 1991; Barber et al., 1997; He et al., 2006b). Мутанты *X. campestris* по гену синтазы RpfF характеризуются низким уровнем продукции детерминант патогенности и сниженной вирулентностью; при этом экзогенное внесение DSF восстанавливает исходный вирулентный фенотип дикого типа (He et al., 2006b).

В то же время у ксилелл (*Xylella fastidiosa*) активация DSF-зависимой системы кворума в основном негативно сказывается на продукции факторов вирулентности, в том числе на формировании биопленок (Chatterjee et al., 2008; Ionescu et al., 2013). По всей вероятности, такой «необычный» эффект системы кворума связан с особенностью стратегии взаимодействия ксилелл с растениями. Эти микроорганизмы внутри растений живут только в сосудах ксилемы (xylem-limited bacteria), где образуют не очень крупные биопленки, которые не сильно препятствуют транспирационному току. При этом не синтезирующие DSF мутанты образуют гипертрофированные биопленки, которые полностью блокируют транспорт воды (Chatterjee et al., 2008). Считается, что тотальная закупорка сосуда является негативным фактором для ксилелл, поскольку лишает их возможности получать необходимые для роста соединения, которые доставляются транспирационным током. Поэтому система кворума у ксилелл оптимизирована таким образом, чтобы предотвращать избыточное образование биопленок *in planta* и пролонгировать период взаимодействия патогена и хозяина.

Помимо DSF, у ксантомонад и ксилелл в качестве сигнала межклеточной коммуникации служит низкомолекулярный белок Ax21. Известно, что этот белок транспортируется из клеток через систему секреции первого типа, однако меха-

низм работы Ax21-зависимой системы коммуникации пока не расшифрован (Han et al., 2011). Установлено, что у ксантомонад белок Ax21 определяет их вирулентность (Han et al., 2011); в то время как «отключение» кодирующего его гена у ксилелл не влияет на способность микроорганизмов взаимодействовать с растением (Pierce et al., 2014).

Возбудители бурой гнили — бактерии вида *Ralstonia solanacearum*, как и ксантомонады и ксилеллы, в качестве сигналов межклеточной коммуникации используют производные жирных кислот: метиловый эфир 3-гидроксимиристиновой кислоты (3-ОН MAME) и метиловый эфир 3-гидроксипальмитиновой кислоты (3-ОН PAME) (Hikichi et al., 2017) (рис. 4.1.1). Ключевым ферментом биосинтеза этих соединений является синтаза PhcB, а в качестве их сенсора служит белок PhcS. При связывании с 3-ОН MAME или 3-ОН PAME киназа PhcS фосфорилирует белок PhcR, который является репрессором транскрипционного фактора PhcA, контролирующего экспрессию кворум-зависимых генов. Фосфорилирование PhcR приводит к его отсоединению от PhcA, что сопровождается активацией экспрессии кворум-зависимых генов, в том числе кодирующих ферменты биосинтеза экзополисахаридов и вторичных метаболитов ральфуранонов (Genin, Denny, 2012). Подобный принцип регуляции не подразумевает наличия положительной обратной связи между рецепцией аутоиндукторов и их биосинтезом, которая является характерной особенностью систем кворума. Однако недавно было обнаружено, что ральфураноны, продукция которых активируется системой кворума при высокой плотности бактериальной популяции, сами оказывают положительный эффект на кворум-зависимые фенотипы; у мутантов, не синтезирующих ральфураноны, снижен уровень экспрессии кворум-индуцируемых генов и повышено содержание транскриптов кворум-репрессорируемых генов (Mogi et al., 2017). В связи с этим существует предположение, что положительная обратная связь при регуляции 3-ОН MAME/3-ОН PAME-зависимого кворум сенсинга может определяться взаимным положительным эффектом этих аутоиндукторов и ральфуранонов на биосинтез друг друга.

Роль 3-ОН MAME/3-ОН PAME-зависимой системы кворума в регуляции продукции факторов вирулентности дуалистична. Эта система у ралстоний при высокой плотности популяции активирует экспрессию генов некоторых факторов вирулентности (экзополисахариды, ральфураноны, ферменты, разрушающие полимеры растительной клеточной стенки), но подавляет транскрипцию генов других детерминант патогенности (компонентов системы секреции третьего типа, а также генов, определяющих подвижность, — жгутиковый аппарат, хемотаксис) (Mogi et al., 2017). Вероятно, что разные факторы вирулентности используются этими фитопатогенами на разных стадиях взаимодействия с хозяином, то есть при неодинаковой плотности бактериальной популяции. Так, миграция по растению с помощью жгутикового аппарата и продукция сигнальных белков, транспортируемых в растительные клетки с помощью системы секреции третьего типа с целью подавления защитных ответов хозяина, по всей вероятности, необходимы микроорганизму на ранних стадиях инфекции, когда плотность бактериальной

популяции невысока. Когда плотность популяции достигает высокого уровня, микроорганизмы переходят к «оседлому» образу жизни в виде биопленок, в которых клетки объединяются экзополисахаридным матриксом в единую структуру. С этим согласуется принцип кворум-зависимой регуляции синтеза факторов вирулентности у ралстоний: система секреции третьего типа и жгутиковый аппарат подавляются 3-ОН МАМЕ/3-ОН РАМЕ-зависимым способом, а синтез ЭПС, наоборот, активируется (Mogi et al., 2017).

Еще одна система кворума, присущая в том числе фитопатогенным бактериям, опосредована так называемыми аутоиндукторами второго типа (АИ-2), предшественником которых является интермедиат метаболизма метионина 4,5-дигидрокси-2,3-пентадион (ДПД) (Bassler et al., 1997). ДПД может трансформироваться в разные соединения: например, у энтеробактерий, в том числе фитопатогенных, он преобразуется в 2-метил-2,3,3,4-тетрагидроокситетрагидрофуран (Pereira et al., 2013), который и выступает в качестве аутоиндуктора (АИ-2) (рис. 4.1.1). Роль АИ-2 в клетке двойственная: с одной стороны, он является продуктом первичного метаболизма, с другой стороны, может у некоторых микроорганизмов дополнительно служить сигналом межклеточной коммуникации. В связи с этим маркерами АИ-2-зависимой системы являются не ферменты биосинтеза ДПД (*LuxS*), которые есть практически у всех бактерий, а сенсоры и «передатчики» АИ-2-сигнала, встречающиеся только у определенных таксономических групп микроорганизмов (Rezzonico, Duffy, 2008). Среди фитопатогенов гены-маркеры АИ-2-зависимой системы кворума обнаружены у энтеробактерий родов *Pantoea*, *Pectobacterium* и *Erwinia* (Rezzonico et al., 2012).

При высокой плотности популяции легко диффундирующий АИ-2 накапливается как в окружающей среде, так и в клетках бактерий. Внутри клеток аутоиндуктор фосфорилируется при участии киназы *LsrK*, после чего связывается с *LsrR* — негативным регулятором транскрипции АИ-2-активируемых генов, что обеспечивает их дерепрессию. В их число входят гены, кодирующие компоненты АВС-транспортера, который осуществляет транспорт АИ-2 из окружающей среды в клетку. Это, в свою очередь, приводит к гипераккумуляции АИ-2 в клетке и способствует проявлению кворум-зависимых фенотипов. При этом в клетках также активируется биосинтез ферментов, разрушающих АИ-2. Таким образом, АИ-2, с одной стороны, индуцируют свою собственную транспортировку из окружающей среды в клетку (положительная обратная связь), с другой стороны, запускают процессы самодеградации (отрицательная обратная связь) (Pereira et al., 2013).

Регуляторное влияние АИ-2-зависимой системы кворума на вирулентность неоднозначное. Существуют примеры того, что «отключение» этой системы кворума (мутация в гене *luxS*) не влияет на стратегию взаимодействия фитопатогенных микроорганизмов (*Ralstonia solanacearum*, *Erwinia amylovora*) с растениями (Flavier et al., 1998; Gao et al., 2009). В то же время у некоторых бактерий эта система является позитивным регулятором их вирулентности (*Pectobacterium atrosepticum*, *Erwinia amylovora*) (Coulthurst et al., 2006; Laasik et al., 2006;

Gao et al., 2009). У *Erwinia amylovora* необходимость АИ-2 для взаимодействия с растением зависит от того, какой орган хозяина колонизирует микроорганизм: мутанты этой бактерии по гену *luxS* сохраняют способность вызывать симптомы заболевания на плодах (груша), но не на листьях (Gao et al., 2009). Следует, однако, отметить, что снижение вирулентности у *luxS*-мутантов нельзя однозначно связывать с дефектом межклеточной коммуникации, поскольку продукт каталитического действия фермента LuxS является не только медиатором системы кворума, но и интермедиатом основного метаболического пути (Winzer et al., 2002; Kendall et al., 2007).

Разные типы систем кворума у разных микроорганизмов обладают как универсальными, так и частными характеристиками. Индивидуальные особенности этих систем, по всей видимости, оптимизированы в зависимости от «образа жизни» конкретного микроорганизма. Схожесть разных систем кворума заключается в их основной роли — обеспечении «коллективизации» микроорганизмов, которая позволяет множеству индивидуальных клеток синхронно проявлять одинаковый фенотип. Согласованность действий отдельных клеток при этом обеспечивает возможность эффективного существования в естественных условиях, в том числе в рамках растительно-микробных патосистем.

В то же время систему кворума не совсем правильно рассматривать просто как «счетчик клеток». В действительности, эта система позволяет микроорганизмам оценивать не только плотность их популяции, но и целый ряд параметров окружающей их среды. Системы кворума в какой-то степени «интегрированы» с разными сенсорно-регуляторными системами бактерий, которые оптимизируют интенсивность межклеточной коммуникации в зависимости от комплекса факторов. К таким регуляторам, например, относится система регуляции синтеза вторичных метаболитов *RsmA/rsmB* (regulator of secondary metabolism) фитопатогенных пектобактерий. *RsmA/rsmB* «откликается» на разные внешние стимулы и регулирует многие физиологические процессы в клетке и в том числе влияет на экспрессию гена АГЛ-синтазы (Cui et al., 1995). Регуляторы, координирующие стрессовые ответы у бактерий, также работают согласованно с системами кворума, оптимизируя их сигнальную активность (Flavier et al., 1998; Van Delden et al., 2001; Xiao et al., 2009). В условиях *in planta* бактериальные системы кворума находятся под влиянием растения-хозяина, определенные метаболиты которого могут как активировать, так и репрессировать (см. главу 5.5) эти системы (Teplitski et al., 2000; Gao et al., 2003; Degrassi et al., 2007). Кроме того, растения способны воспринимать микробные сигналы межклеточной коммуникации и реагировать на них изменением характера экспрессии генов (Mathesius et al., 2003; von Rad et al., 2008). Правда, роль такого восприятия в рамках «междарственного сигналинга» (interkingdom signaling) в формировании патологической системы остается пока не выясненной.

Помимо плотности популяции, важным, особенно для патогенов, параметром, который позволяют отслеживать системы кворума, является скорость диффузии молекул в бактериальном микроокружении. Для взаимодействия с хозяином

микроорганизмам необходимо синтезировать «дорогостоящие» факторы вирулентности, которые должны какое-то время работать в непосредственной близости от микробных клеток. В том случае если скорость диффузии таких факторов вирулентности окажется слишком большой, их синтез окажется нецелесообразным. Поэтому бактерии «придумали» «дешевые» сигналы кворума, которые работают как «разведчики», определяющие целесообразность продукции экстраклеточных факторов вирулентности. В ряде работ термин «кворум сенсинг» иногда даже обозначают как *diffusion sensing* («чувство диффузии») (Redfield, 2002; Winzer et al., 2002). В пользу роли систем кворума в оценке интенсивности диффузии молекул свидетельствует возможность индукции этих систем у единичных клеток, в случае помещения их в малый замкнутый объем (100 пиколитров, т. е. 10^{-10} л) (Boedicker et al., 2009). Единичные клетки *Pseudomonas syringae*, формируя агрегаты на поверхности листьев, также способны достигать кворума; при этом образование конденсата на листьях негативно сказывается на кворум-зависимом фенотипе бактерий (Dulla, Lindow, 2008).

Таким образом, системы кворума, основная роль которых заключается в координировании действий отдельных клеток на популяционном уровне, регулируют поведение микробов в зависимости от комплекса факторов. Несмотря на то, что эти системы в рамках экспериментальных моделей рассматриваются как относительно автономные, в действительности они работают согласованно с другими регуляторными системами прокариот. Чувство кворума, в дополнение к «чувству диффузии», называют еще и «чувством эффективности» (*efficiency sensing*), что отражает способность систем кворума обеспечивать согласованность действий микробов в зависимости и от плотности их популяции, и от скорости диффузии экстраклеточных молекул, и от пространственного распределения клеток (кластеризации), а также от комплекса других факторов окружающей среды (Hense et al., 2007). Все эти параметры микроорганизмы должны «принимать во внимание» для успешного существования, в том числе при формировании взаимоотношений с растением-хозяином.

Литература:

An, S. Q., Febrer, M., McCarthy, Y., Tang, D. J., Clissold, L., Kaithakottil, G., ... & Ryan, R. P. (2013). High-resolution transcriptional analysis of the regulatory influence of cell-to-cell signalling reveals novel genes that contribute to *Xanthomonas* phytopathogenesis. *Molecular Microbiology*, 88(6), 1058–1069.

An, S. Q., Allan, J. H., McCarthy, Y., Febrer, M., Dow, J. M., & Ryan, R. P. (2014). The PAS domain-containing histidine kinase RpfS is a second sensor for the diffusible signal factor of *Xanthomonas campestris*. *Molecular Microbiology*, 92(3), 586–597.

Barber, C. E., Tang, J. L., Feng, J. X., Pan, M. Q., Wilson, T. J. G., Slater, H., ... & Daniels, M. J. (1997). A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas*

campestris is mediated by a small diffusible signal molecule. *Molecular Microbiology*, 24(3), 555–566.

Bassler, B. L., Greenberg, E. P., & Stevens, A. M. (1997). Cross-species induction of luminescence in the quorum-sensing bacterium *Vibrio harveyi*. *Journal of Bacteriology*, 179(12), 4043–4045.

Boedicker, J. Q., Vincent, M. E., & Ismagilov, R. F. (2009). Microfluidic confinement of single cells of bacteria in small volumes initiates high-density behavior of quorum sensing and growth and reveals its variability. *Angewandte Chemie International Edition*, 48(32), 5908–5911.

Burr, T., Barnard, A. M., Corbett, M. J., Pemberton, C. L., Simpson, N. J., & Salmond, G. P. (2006). Identification of the central quorum sensing regulator of virulence in the enteric phytopathogen, *Erwinia carotovora*: the VirR repressor. *Molecular Microbiology*, 59(1), 113–125.

Case, R. J., Labbate, M., & Kjelleberg, S. (2008). AHL-driven quorum-sensing circuits: their frequency and function among the Proteobacteria. *The ISME Journal*, 2(4), 345–349.

Chatterjee, S., Wistrom, C., & Lindow, S. E. (2008). A cell-cell signaling sensor is required for virulence and insect transmission of *Xylella fastidiosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(7), 2670–2675.

Coulthurst, S. J., Lilley, K. S., & Salmond, G. P. (2006). Genetic and proteomic analysis of the role of *luxS* in the enteric phytopathogen, *Erwinia carotovora*. *Molecular Plant Pathology*, 7(1), 31–45.

Cui, Y., Chatterjee, A., Liu, Y., Dumenyo, C. K., & Chatterjee, A. K. (1995). Identification of a global repressor gene, *rsmA*, of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* that controls extracellular enzymes, N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone, and pathogenicity in soft-rotting *Erwinia* spp. *Journal of Bacteriology*, 177(17), 5108–5115.

Degrassi, G., Devescovi, G., Solis, R., Steindler, L., & Venturi, V. (2007). *Oryza sativa* rice plants contain molecules that activate different quorum-sensing N-acyl homoserine lactone biosensors and are sensitive to the specific AiiA lactonase. *FEMS Microbiology Letters*, 269(2), 213–220.

Dow, J. M. (2017). Diffusible signal factor-dependent quorum sensing in pathogenic bacteria and its exploitation for disease control. *Journal of Applied Microbiology*, 122(1), 2–11.

Dulla, G., & Lindow, S. E. (2008). Quorum size of *Pseudomonas syringae* is small and dictated by water availability on the leaf surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(8), 3082–3087.

Flavier, A. B., Schell, M. A., & Denny, T. P. (1998). An RpoS (σ S) homologue regulates acylhomoserine lactone-dependent autoinduction in *Ralstonia solanacearum*. *Molecular Microbiology*, 28(3), 475–486.

Fuqua, W. C., & Winans, S. C. (1994). A LuxR-LuxI type regulatory system activates *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite. *Journal of Bacteriology*, 176(10), 2796–2806.

Gao, M., Teplitski, M., Robinson, J. B., & Bauer, W. D. (2003). Production of substances by *Medicago truncatula* that affect bacterial quorum sensing. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16(9), 827–834.

Gao, Y., Song, J., Hu, B., Zhang, L., Liu, Q., & Liu, F. (2009). The *luxS* gene is involved in AI-2 production, pathogenicity, and some phenotypes in *Erwinia amylovora*. *Current Microbiology*, 58(1), 1–10.

Genin, S., & Denny, T. P. (2012). Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Annual Review of Phytopathology*, 50, 67–89.

Han, S. W., Lee, S. W., & Ronald, P. C. (2011). Secretion, modification, and regulation of Ax21. *Current Opinion in Microbiology*, 14(1), 62–67.

He, Y. W., Wang, C., Zhou, L., Song, H., Dow, J. M., & Zhang, L. H. (2006a). Dual signaling functions of the hybrid sensor kinase RpfC of *Xanthomonas campestris* involve either phosphorelay or receiver domain-protein interaction. *Journal of Biological Chemistry*, 281(44), 33414–33421.

He, Y. W., Xu, M., Lin, K., Ng, Y. J. A., Wen, C. M., Wang, L. H., ... & Zhang, L. H. (2006b). Genome scale analysis of diffusible signal factor regulon in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: identification of novel cell — cell communication-dependent genes and functions. *Molecular Microbiology*, 59(2), 610–622.

Hense, B. A., Kuttler, C., Müller, J., Rothballer, M., Hartmann, A., & Kreft, J. U. (2007). Does efficiency sensing unify diffusion and quorum sensing? *Nature Reviews Microbiology*, 5(3), 230–239.

Hikichi, Y., Mori, Y., Ishikawa, S., Hayashi, K., Ohnishi, K., Kiba, A., & Kai, K. (2017). Regulation involved in colonization of intercellular spaces of host plants in *Ralstonia solanacearum*. *Frontiers in Plant Science*, 8, 967.

Ionescu, M., Baccari, C., Da Silva, A. M., Garcia, A., Yokota, K., & Lindow, S. E. (2013). Diffusible signal factor (DSF) synthase RpfF of *Xylella fastidiosa* is a multifunction protein also required for response to DSF. *Journal of Bacteriology*, 195(23), 5273–5284.

Kendall, M. M., Rasko, D. A., & Sperandio, V. (2007). Global effects of the cell-to-cell signaling molecules autoinducer-2, autoinducer-3, and epinephrine in a *luxS* mutant of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 75(10), 4875–4884.

Laasik, E., Andresen, L., & Mäe, A. (2006). Type II quorum sensing regulates virulence in *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*. *FEMS Microbiology Letters*, 258(2), 227–234.

Loh, J., Pierson, E. A., Pierson, L. S., Stacey, G., & Chatterjee, A. (2002). Quorum sensing in plant-associated bacteria. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(4), 285–290.

Mathesius, U., Mulders, S., Gao, M., Teplitski, M., Caetano-Anollés, G., Rolfe, B. G., & Bauer, W. D. (2003). Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum-sensing signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(3), 1444–1449.

Mori, Y., Ishikawa, S., Ohnishi, H., Shimatani, M., Morikawa, Y., Hayashi, K., ... & Hikichi, Y. (2017). Involvement of ralfuranones in the quorum sensing signalling pathway and virulence of *Ralstonia solanacearum* strain OE1-1. *Molecular Plant Pathology*, 19(2), 454–463.

Pereira, C. S., Thompson, J. A., & Xavier, K. B. (2013). AI-2-mediated signalling in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(2), 156–181.

Pierce, B. K., Voegel, T., & Kirkpatrick, B. C. (2014). The *Xylella fastidiosa* PD1063 protein is secreted in association with outer membrane vesicles. *PLoS ONE*, 9(11), e113504.

- Pirhonen, M., Flego, D., Heikinheimo, R., & Palva, E. T. (1993). A small diffusible signal molecule is responsible for the global control of virulence and exoenzyme production in the plant pathogen *Erwinia carotovora*. *The EMBO Journal*, 12(6), 2467.
- Potrykus, M., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., & Lojkowska, E. (2017). Interplay of classic Exp and specific Vfm quorum sensing systems on the phenotypic features of *Dickeya solani* strains exhibiting different virulence levels. *Molecular Plant Pathology*, in press.
- Quinones, B., Dulla, G., & Lindow, S. E. (2005). Quorum sensing regulates exopolysaccharide production, motility, and virulence in *Pseudomonas syringae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18(7), 682–693.
- Redfield, R. J. (2002). Is quorum sensing a side effect of diffusion sensing? *Trends in Microbiology*, 10(8), 365–370.
- Rezzonico, F., & Duffy, B. (2008). Lack of genomic evidence of AI-2 receptors suggests a non-quorum sensing role for *luxS* in most bacteria. *BMC Microbiology*, 8(1), 154.
- Rezzonico, F., Smits, T. H., & Duffy, B. (2012). Detection of AI-2 receptors in genomes of *Enterobacteriaceae* suggests a role of type-2 quorum sensing in closed ecosystems. *Sensors*, 12(5), 6645–6665.
- Srivastava, D., & Waters, C. M. (2012). A tangled web: regulatory connections between quorum sensing and cyclic di-GMP. *Journal of Bacteriology*, 194(17), 4485–4493.
- Subramoni, S., & Venturi, V. (2009). LuxR-family ‘solos’: bachelor sensors/regulators of signalling molecules. *Microbiology*, 155(5), 1377–1385.
- Tang, J. L., Liu, Y. N., Barber, C. E., Dow, J. M., Wootton, J. C., & Daniels, M. J. (1991). Genetic and molecular analysis of a cluster of *rpf* genes involved in positive regulation of synthesis of extracellular enzymes and polysaccharide in *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*. *Molecular and General Genetics*, 226(3), 409–417.
- Teplitski, M., Robinson, J. B., & Bauer, W. D. (2000). Plants secrete substances that mimic bacterial N-acyl homoserine lactone signal activities and affect population density-dependent behaviors in associated bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13(6), 637–648.
- Van Delden, C., Comte, R., & Bally, M. (2001). Stringent response activates quorum sensing and modulates cell density-dependent gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 183(18), 5376–5384.
- von Bodman, S. B., Majerczak, D. R., & Coplin, D. L. (1998). A negative regulator mediates quorum-sensing control of exopolysaccharide production in *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(13), 7687–7692.
- von Rad, U., Klein, I., Dobrev, P. I., Kottova, J., Zazimalova, E., Fekete, A., ... & Durner, J. (2008). Response of *Arabidopsis thaliana* to N-hexanoyl-DL-homoserine-lactone, a bacterial quorum sensing molecule produced in the rhizosphere. *Planta*, 229(1), 73–85.
- Waters, C. M., & Bassler, B. L. (2005). Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21, 319–346.
- Whitehead, N. A., Barnard, A. M., Slater, H., Simpson, N. J., & Salmond, G. P. (2001). Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 25(4), 365–404.

Winzer, K., Hardie, K. R., Burgess, N., Doherty, N., Kirke, D., Holden, M. T., ... & Williams, P. (2002). LuxS: its role in central metabolism and the *in vitro* synthesis of 4-hydroxy-5-methyl-3 (2H)-furanone. *Microbiology*, *148*(4), 909–922.

Withers, H., Swift, S., & Williams, P. (2001). Quorum sensing as an integral component of gene regulatory networks in Gram-negative bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, *4*(2), 186–193.

Xiao, J., Wang, Q., Liu, Q., Xu, L., Wang, X., Wu, H., & Zhang, Y. (2009). Characterization of *Edwardsiella tarda rpoS*: effect on serum resistance, chondroitinase activity, biofilm formation, and autoinducer synthetases expression. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *83*(1), 151–160.

4.2. Сенсоры метаболитов растения-хозяина

На сапрофитной стадии жизненного цикла, когда патогены находятся вне растения, синтез факторов вирулентности является нецелесообразным расходованием энергетического ресурса. Поэтому у микроорганизмов синтез детерминант патогенности находится под контролем особых регуляторных белков, которые активируют или дерепрессируют продукцию факторов вирулентности только при наличии определенных метаболитов растения; такие метаболиты рецептируются этими сенсорно-регуляторными белками, давая возможность микроорганизму «понять», что он находится в теле своего хозяина. Благодаря такому принципу регуляции запуск программы вирулентности осуществляется только при попадании фитопатогена в растение (или при экзогенном внесении в бактериальные культуры растительных метаболитов). Действительно, существует много экспериментальных работ, в которых показано, что добавление различных фракций (экстрактов) и метаболитов растений в среду культивирования фитопатогенных бактерий приводит к сверхпродукции факторов вирулентности (Brencic, Winans, 2005; Mattinen et al., 2007; Tarasova et al., 2013).

Большинство бактериальных регуляторных белков, воспринимающих растительные метаболиты и активирующих впоследствии продукцию факторов вирулентности, описано на примере пектолитических бактерий, вызывающих мокрые гнили растений (рода *Pectobacterium* и *Dickeya*). Наиболее известный из них белок KdgR. Этот белок, взаимодействуя с промоторными областями генов вирулентности, функционирует как репрессор их транскрипции. При появлении в клетке продукта разложения пектиновых веществ — 2-кето-3-дезоксиглюконата (КДГ) (Condemine, Robert-Baudouy, 1987), это соединение связывается с KdgR, что приводит к изменению его конформации, снижению сродства к промоторным областям целевых генов и аннулированию репрессорных функций (Liu et al., 1999). Вследствие этого активируется экспрессия генов, кодирующих ферменты, разрушающие компоненты растительных клеточных стенок, белки системы секреции третьего типа и другие факторы вирулентности. У мутантов по этому гену в отсутствие в среде культивирования пектиновых веществ уровень экстраклеточной пектацтиазной активности значительно выше, чем у исходной дикой формы, а сверхэкспрессия гена *kdgR* снижает уровень продукции факторов вирулентности (Liu et al., 1999). Помимо KdgR, еще целый ряд регуляторных белков (RsmC, RexZ, PecM/PecS, PecT, Aep, и Pir) пектолитических бактерий опосредует активацию экспрессии генов вирулентности при появлении метаболитов растений (Reverchon et al., 1994; Praillet et al., 1997; Nomura et al., 1998; Condemine et al., 1999; Shih et al., 1999; Thomson et al., 1999; Cui et al., 1999; Rouanet, Nasser, 2001).

Роль метаболитов растений в индукции экспрессии генов вирулентности показана не только на примере пектолитических бактерий. Так, у *Ralstonia solanacearum* активация системы секреции третьего типа происходит при физическом контакте бактериальной клетки с растительной. Оказалось, что индукторами этой системы являются водонерастворимые соединения, содержащиеся в растительной кле-

точной стенке. Восприятие этих соединений растением происходит при участии сенсорного белка PthA, расположенного на внешней мембране микроорганизма (Aldon et al., 2000). У разных штаммов *Pseudomonas syringae* синтез фитотоксинов (сирингомицин, сиринготоксин или сирингостатин) активируют некоторые растительные фенольные β -глюкозиды, например кверцетин-3-рутинол-4'-глюкозид, дигидровогонин-7-глюкозид и арбутин. Индуцирующее действие этих соединений опосредовано рецепторным белком SyrB, который связывает β -глюкозиды, что приводит к индукции экспрессии генов ферментов биосинтеза фитотоксинов (Mo et al., 1995).

Агробактерии, вызывающие опухоли и симптомы «бородатых корней» у растений (см. главу 3.7), «чувствуют» хозяина посредством рецепции фенольных соединений и сахаров, которые выделяются пораненными тканями растения в ризосферу. Рецепция и передача таких сигналов в клетках агробактерий осуществляется с помощью двухкомпонентной системы VirA/VirG и периплазматического белка ChvE. Система VirA/VirG состоит из сенсорной киназы VirA, которая непосредственно связывает фенольные соединения, такие как ацетосирингон; распознавание же сахаров этой системой происходит опосредованно при участии периплазматического углевод-связывающего белка ChvE. Активированная таким образом киназа VirA передает сигнал на регулятор ответа VirG (рис. 3.7.1), который индуцирует экспрессию генов вирулентности, в результате чего запускается процесс переноса генетического материала агробактерий (Т-ДНК) в хромосому растительной клетки (этот процесс подробно описан в главе 3.7) (Subramoni et al., 2014).

Для успешного развития в тканях растения агробактериям необходимо воспринимать еще и такие метаболиты растений, которые образуются только в инфицированных (трансформированных Т-ДНК) клетках хозяина. Основная суть переноса генетического материала агробактерий в хромосомы клеток растения заключается в использовании хозяина для биосинтеза опинов, гены биосинтеза которых локализованы в Т-ДНК. Эти модифицированные аминокислоты не метаболизируются растением из-за отсутствия соответствующих ферментов, но потребляются агробактериями, у которых есть специальная «машина для переваривания» опинов (см. главу 3.7). Биосинтез агробактериальных ферментов катаболизма опинов в отсутствие этих метаболитов — это нерациональная трата энергии; поэтому биосинтез этих ферментов осуществляется только тогда, когда трансформированные растительные клетки начинают синтезировать опины. Синхронизация процессов образования опинов в инфицированных тканях растения и активации биосинтеза ферментов, катализирующих их преобразование в клетках агробактерий, достигается благодаря рецепции опинов бактериальными сенсорными белками, которые после взаимодействия с лигандом активируют экспрессию генов катаболизма этих соединений. Причем, поскольку в трансформированных клетках растений могут синтезироваться разные типы опинов (октопины, маннопины, нопалины, агроцинопины), для каждого из них в клетках агробактерий существует специфичный рецептор, который контролирует продукцию ферментов катаболизма только определенного типа опиона (Dessaux et al., 1998).

Литература:

- Aldon, D., Brito, B., Boucher, C., & Genin, S. (2000). A bacterial sensor of plant cell contact controls the transcriptional induction of *Ralstonia solanacearum* pathogenicity genes. *The EMBO Journal*, 19(10), 2304–2314.
- Brencic, A., & Winans, S. C. (2005). Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69(1), 155–194.
- Condemine, G., & Robert-Baudouy, J. (1987). 2-keto-3-deoxygluconate transport system in *Erwinia chrysanthemi*. *Journal of Bacteriology*, 169(5), 1972–1978.
- Condemine, G., Castillo, A., Passeri, F., & Enard, C. (1999). The PecT repressor coregulates synthesis of exopolysaccharides and virulence factors in *Erwinia chrysanthemi*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12(1), 45–52.
- Cui, Y., Mukherjee, A., Dumenyo, C. K., Liu, Y., & Chatterjee, A. K. (1999). *rsmC* of the soft-rotting bacterium *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* negatively controls extracellular enzyme and harpin_{Ecc} production and virulence by modulating levels of regulatory RNA (*rsmB*) and RNA-binding protein (RsmA). *Journal of Bacteriology*, 181(19), 6042–6052.
- Dessaux, Y., Petit, A., Farrand, S. K., & Murphy, P. J. (1998). Opines and opine-like molecules involved in plant-*Rhizobiaceae* interactions. In: *The Rhizobiaceae*. Springer Netherlands, 173–197.
- Liu, Y., Jiang, G., Cui, Y., Mukherjee, A., Ma, W. L., & Chatterjee, A. K. (1999). *kdgR*_{Ecc} negatively regulates genes for pectinases, cellulase, protease, harpin_{Ecc}, and a global RNA regulator in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Journal of Bacteriology*, 181(8), 2411–2421.
- Mattinen, L., Nissinen, R., Riipi, T., Kalkkinen, N., & Pirhonen, M. (2007). Host-extract induced changes in the secretome of the plant pathogenic bacterium *Pectobacterium atrosepticum*. *Proteomics*, 7(19), 3527–3537.
- Mo, Y. Y., Geibel, M., Bonsall, R. F., & Gross, D. C. (1995). Analysis of sweet cherry (*Prunus avium* L.) leaves for plant signal molecules that activate the *syrB* gene required for synthesis of the phytotoxin, syringomycin, by *Pseudomonas syringae* pv *syringae*. *Plant Physiology*, 107(2), 603–612.
- Nomura, K., Nasser, W., Kawagishi, H., & Tsuyumu, S. (1998). The *pir* gene of *Erwinia chrysanthemi* EC16 regulates hyperinduction of pectate lyase virulence genes in response to plant signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(24), 14034–14039.
- Praillet, T., Reverchon, S., Robert-Baudouy, J., & Nasser, W. (1997). The PecM protein is necessary for the DNA-binding capacity of the PecS repressor, one of the regulators of virulence factor synthesis in *Erwinia chrysanthemi*. *FEMS Microbiology Letters*, 154(2), 265–270.
- Reverchon, S., Nasser, W., & Robert-Baudouy, J. (1994). *pecS*: a locus controlling pectinase, cellulase and blue pigment production in *Erwinia chrysanthemi*. *Molecular Microbiology*, 11(6), 1127–1139.
- Rouanet, C., & Nasser, W. (2001). The PecM protein of the phytopathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi*, membrane topology and possible involvement in the efflux of the blue pigment indigoidine. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 3(2), 309–318.

Shih, Y. L., Harris, S. J., Borner, G., Rivet, M. M., & Salmond, G. P. (1999). The *hexY* genes of *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* and ssp. *atroseptica* encode novel proteins that regulate virulence and motility co-ordinately. *Environmental Microbiology*, 1(6), 535–547.

Subramoni, S., Nathoo, N., Klimov, E., & Yuan, Z. C. (2014). *Agrobacterium tumefaciens* responses to plant-derived signaling molecules. *Frontiers in Plant Science*, 5, 322.

Tarasova, N., Gorshkov, V., Petrova, O., & Gogolev, Y. (2013). Potato signal molecules that activate pectate lyase synthesis in *Pectobacterium atrosepticum*SCRI1043. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(7), 1189–1196.

Thomson, N. R., Nasser, W., McGowan, S., Sebaihia, M., & Salmond, G. P. (1999). *Erwinia carotovora* has two KdgR-like proteins belonging to the IclR family of transcriptional regulators: identification and characterization of the RexZ activator and the KdgR repressor of pathogenesis. *Microbiology*, 145(7), 1531–1545.

4.3. Двухкомпонентные регуляторные системы

Помимо популяционного фактора и наличия метаболитов растения-хозяина, продукция факторов вирулентности контролируется в зависимости от физико-химических условий: кислотности, осмотичности, температуры, влажности, концентрации ионов и т. д. (Thomas, Wigneshweraraj, 2014). Это, во-первых, дает возможность патогену синхронизировать время «атаки» с оптимальными для этого погодными условиями. В пользу этого свидетельствует то, что развитие тех или иных заболеваний растений часто бывает приурочено к определенному температурному режиму, влажности почвы и воздуха (Agrios, 2005). Кроме того, поскольку многие микроорганизмы в ходе взаимодействия с хозяином колонизируют разные его компартменты, физико-химические параметры которых значительно различаются, возможность оптимизировать продукцию факторов вирулентности в зависимости от этих параметров может обеспечить эффективное заселение разных типов клеток и тканей растений.

Часто регуляция продукции факторов вирулентности в зависимости от физико-химических условий среды осуществляется при участии двухкомпонентных регуляторных систем (Тиганова с соавт., 2014). Как следует из названия, эти системы состоят из двух основных компонентов: сенсорной гистидинкиназы, воспринимающей внешний стимул, и регулятора ответа (*response regulator*), который оптимизирует уровни экспрессии определенных групп генов (Mitrophanov, Groisman, 2008).

Сенсорные гистидинкиназы — это трансмембранные белки, имеющие по крайней мере два домена: переменный экстраклеточный сенсорный домен и консервативный цитоплазматический киназный (трансмисмиттерный) домен. Внешние стимулы, обычно связанные с воздействием на мембрану, воспринимаются сенсорным доменом. Распознавание сигнала приводит к образованию димера из двух мономеров гистидинкиназы, что сопровождается аутофосфорилированием киназных доменов (Mascher et al., 2006).

Регуляторы ответа состоят из двух ключевых доменов: регуляторного и ДНК-связывающего. Регуляторный домен необходим для активации регулятора ответа, которая заключается в его фосфорилировании при участии активированной сенсорной киназы. Фосфорилированный регулятор ответа благодаря наличию специфического ДНК-связывающего домена способен контролировать экспрессию определенных групп генов. Некоторые сенсорные гистидинкиназы могут, помимо фосфорилирования, осуществлять дефосфорилирование регулятора ответа, то есть проявлять фосфатазную активность. Такая активность обычно проявляется в отсутствие внешнего стимула, что позволяет «затормозить» работу системы, если тот или иной фактор перестает действовать на клетку (Тойменцева, Шарипова, 2013).

Роль двухкомпонентных регуляторных систем во взаимодействии фитопатогенов с растениями была неоднократно продемонстрирована (табл. 4.3.1).

Таблица 4.3.1. Двухкомпонентные регуляторные системы фитопатогенных бактерий, контролирующие продукцию факторов вирулентности.

Двухкомпонентные системы	Микроорганизмы	Контролируемые критерии вирулентности	Источники
GacS/GacA и их гомологи	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> AH2552b	Экзопротеаза, целлюлаза	Frederick et al., 1997
	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> SCC3193b	Пектагилаза, полигалактуроназа, целлюлаза	Eriksson et al., 1998
	<i>Pseudomonas marginalis</i> CY091	Пектагилаза, экзопротеаза, леван, пиовердин	Liao et al., 1997
	<i>Pseudomonas syringae</i> BR2R; Pc27R	Экзопротеаза, табтоксин	Barta et al., 1992
	<i>Pseudomonas tolaasii</i> NCPPB1116	Толассин, экзопротеаза	Sinha et al., 2000
	<i>Pseudomonas viridiflava</i> PJ-08-6A; SF312A	Пектагилаза, экзопротеаза, сидерофор, альгинат	Liao et al., 1996
	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> PXO99A	Подвижность	Xu et al., 2010
	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i> RsGD42	Хемотаксис	Yang et al., 2007
	<i>Dickeya dadantii</i>	Пектагилаза, система секреции 3-го типа	Li et al., 2009
	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> B728a	Экзопротеаза, сирингомидин, сиринголин, альгинат, N-ацил-гомосеринлактон	Kitten et al., 1998
VirA/VirG	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Система секреции 4-го типа	Christie, Gordon, 2014
RcsC/RcsB	<i>Erwinia amylovora</i>	Экзополисахариды, капсула	Wang et al., 2009
	<i>Pantoea stewartii</i>	Экзополисахариды	Cartier, 2008
	<i>Dickeya dadantii</i>	Экзополисахариды, репрессия флагеллярных генов	Bouchart et al., 2010
RpfC/RpfG	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	Гидролазы растительной клеточной стенки	Andresen et al., 2007
CpxA/CpxR	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	Амилаза, эндоглюканаза, экзопротеаза, полигалактуронаг-лиаза, ксантан	Tang et al., 1991
RavA/RavR	<i>Dickeya dadantii</i>	Гидролазы полимеров растительной клеточной стенки, подвижность	Bontemps-Gallo et al., 2015
RaxH/RaxR	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	Подвижность, биопленкообразование	Tao et al., 2014
HrpX/HrpY	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	Система секреции 1-го типа	Burdman et al., 2004
	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	Система секреции 3-го типа	Li et al., 2009
	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	Система секреции 3-го типа, подвижность	Haque et al., 2017

Системы EnvZ/OmpR и PhoQ/PhoP реагируют на изменение осмотичности среды и концентрацию ионов магния соответственно; при этом обе системы участвуют в регуляции образования биопленок, контролируют образование пилей и фимбрий, а также продукцию экзополисахаридов у таких фитопатогенов, как *Dickeya dadantii* и *Erwinia carotovora* (Llama-Palacios et al., 2003; Haque, Tsuyumu, 2010; Тиганова с соавт., 2014). У этих же патогенов система HrpX/HrpY активирует экспрессию генов белков системы секреции третьего типа в зависимости от физико-химических условий среды (Yang et al., 2008; Khokhani et al., 2013). У *Agrobacterium tumefaciens* двухкомпонентная регуляторная система VirA/VirG является и рецептором метаболитов растений, и сенсором, воспринимающим низкую кислотность. Для активации вирулентности этих бактерий, а именно процесса переноса T-ДНК в растительную клетку, необходимо соблюдение как минимум двух условий: pH в районе 5,0–5,8 и присутствие особых фенольных соединений, синтезируемых в тканях растений при поранении, — ацетосирингонов. Система VirA/VirG позволяет отслеживать эти параметры и запускать машину для трансформации только при соблюдении этих условий (Christie, Gordon, 2014). Для многих фитопатогенов продемонстрирована роль системы GacS/GacA в регуляции вирулентности. Эта система контролирует продукцию экстраклеточных ферментов, подвижность и процесс образования биопленок. Многообразие GacS/GacA-зависимых фенотипов (табл. 4.3.1) охватывает различные аспекты взаимоотношений патогена и хозяина и указывает на важную роль этой системы в становлении растительно-микробных патосистем.

Литература:

Тиганова, И. Г., Ильина, Т. С., & Романова, Ю. М. (2014). Двухкомпонентные системы регуляции бактерий — мишени для поиска новых антибактериальных препаратов. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*, 3, 3–18.

Тойменцева, А. А., & Шарипова, М. Р. (2013). Генетические механизмы адаптации бацилл. *Микробиология*, 82(3), 259–259.

Agrios, G. N. (2005). Plant Pathology. 5th eds. Department of Plant Pathology. University of Florida. United States of America.

Andresen, L., Kõiv, V., Alamäe, T., & Mäe, A. (2007). The Rcs phosphorelay modulates the expression of plant cell wall degrading enzymes and virulence in *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum*. *FEMS Microbiology Letters*, 273(2), 229–238.

Barta, T. M., Kinscherf, T. G., & Willis, D. K. (1992). Regulation of tabtoxin production by the *lemA* gene in *Pseudomonas syringae*. *Journal of Bacteriology*, 174(9), 3021–3029.

Bontemps-Gallo, S., Madec, E., & Lacroix, J. M. (2015). The two-component system CpxAR is essential for virulence in the phytopathogen bacteria *Dickeya dadantii* EC3937. *Environmental Microbiology*, 17(11), 4415–4428.

Bouchart, F., Boussemart, G., Prouvost, A. F., Cogez, V., Madec, E., Vidal, O., ... & Lacroix, J. M. (2010). The virulence of a *Dickeya dadantii* 3937 mutant devoid of osmoregulated periplasmic glucans is restored by inactivation of the RcsCD-RcsB phosphorelay. *Journal of Bacteriology*, 192(13), 3484–3490.

Burdman, S., Shen, Y., Lee, S. W., Xue, Q., & Ronald, P. (2004). RaxH/RaxR: a two-component regulatory system in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* required for AvrXa21 activity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17(6), 602–612.

Carlier, A. L. (2008). Regulation of surface polysaccharides in *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. Retrieved from University of Connecticut, ProQuest Dissertation Publishing (Accession No. 3308228).

Christie, P. J., & Gordon, J. E. (2014). The *Agrobacterium* Ti plasmids. *Microbiology Spectrum*, 2(6), 1–29.

Eriksson, A. R., Andersson, R. A., Pirhonen, M., & Palva, E. T. (1998). Two-component regulators involved in the global control of virulence in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11(8), 743–752.

Frederick, R. D., Chiu, J., Bennetzen, J. L., & Handa, A. K. (1997). Identification of a pathogenicity locus, *rpfA*, in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* that encodes a two-component sensor-regulator protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 10(3), 407–415.

Haque, M. M., & Tsuyumu, S. (2010). Role of PhoP-PhoQ two-component system in biofilm formation of the phytopathogen *Dickeya dadantii* Strain 3937. *The Agriculturists*, 6(1), 108–117.

Haque, M. M., Oliver, M. M. H., Nahar, K., Alam, M. Z., Hirata, H., & Tsuyumu, S. (2017). CytR homolog of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* controls air-liquid biofilm formation by regulating multiple genes involved in cellulose production, c-di-GMP signaling, motility, and type III secretion system in response to nutritional and environmental signals. *Frontiers in Microbiology*, 8, 972.

Khokhani, D., Zhang, C., Li, Y., Wang, Q., Zeng, Q., Yamazaki, A., ... & Yang, C. H. (2013). Discovery of plant phenolic compounds that act as type III secretion system inhibitors or inducers of the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(18), 5424–5436.

Kitten, T., Kinscherf, T. G., McEvoy, J. L., & Willis, D. K. (1998). A newly identified regulator is required for virulence and toxin production in *Pseudomonas syringae*. *Molecular Microbiology*, 28(5), 917–929.

Li, Y., Peng, Q., Selimi, D., Wang, Q., Charkowski, A. O., Chen, X., & Yang, C. H. (2009). The plant phenolic compound p-coumaric acid represses gene expression in the *Dickeya dadantii* type III secretion system. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(5), 1223–1228.

Liao, C. H., McCallus, D. E., Wells, J. M., Tzean, S. S., & Kang, G. Y. (1996). The *repB* gene required for production of extracellular enzymes and fluorescent siderophores in *Pseudomonas viridiflava* is an analog of the *gacA* gene of *Pseudomonas syringae*. *Canadian Journal of Microbiology*, 42(2), 177–182.

Liao, C. H., McCallus, D. E., Fett, W. F., & Kang, Y. G. (1997). Identification of gene loci controlling pectate lyase production and soft-rot pathogenicity in *Pseudomonas marginalis*. *Canadian Journal of Microbiology*, 43(5), 425–431.

Llama-Palacios, A., López-Solanilla, E., Poza-Carrión, C., García-Olmedo, F., & Rodríguez-Palenzuela, P. (2003). The *Erwinia chrysanthemi* *phoP-phoQ* operon plays an important role in growth at low pH, virulence and bacterial survival in plant tissue. *Molecular Microbiology*, 49(2), 347–357.

Mascher, T., Helmann, J. D., & Uden, G. (2006). Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(4), 910–938.

Mitrophanov, A. Y., & Groisman, E. A. (2008). Signal integration in bacterial two-component regulatory systems. *Genes & Development*, 22(19), 2601–2611.

Sinha, H., Pain, A., & Johnstone, K. (2000). Analysis of the role of *recA* in phenotypic switching of *Pseudomonas tolaasii*. *Journal of Bacteriology*, 182(22), 6532–6535.

Tang, J. L., Liu, Y. N., Barber, C. E., Dow, J. M., Wootton, J. C., & Daniels, M. J. (1991). Genetic and molecular analysis of a cluster of *rpf* genes involved in positive regulation of synthesis of extracellular enzymes and polysaccharide in *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*. *Molecular and General Genetics*, 226(3), 409–417.

Tao, J., Li, C., Luo, C., & He, C. (2014). RavA/RavR two-component system regulates *Xanthomonas campestris* pathogenesis and c-di-GMP turnover. *FEMS Microbiology Letters*, 358(1), 81–90.

Thomas, M. S., & Wigneshweraraj, S. (2014). Regulation of virulence gene expression. *Virulence*, 5(8), 832–834.

Wang, D., Korban, S. S., & Zhao, Y. (2009). The Rcs phosphorelay system is essential for pathogenicity in *Erwinia amylovora*. *Molecular Plant Pathology*, 10(2), 277–290.

Xu, J., Wu, M., & He, C. (2010). Functional characterization of *gacA_{oxo}*, the gene encoding a response regulator of two-component regulatory system in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Acta Phytopathologica Sinica*, 40(3), 282–289.

Yang, S., Peng, Q., San Francisco, M., Wang, Y., Zeng, Q., & Yang, C. H. (2008). Type III secretion system genes of *Dickeya dadantii* 3937 are induced by plant phenolic acids. *PLoS ONE*, 3(8), e2973.

Yang, W. F., Chen, L., Liu, H. X., Hu, B. S., & Liu, F. Q. (2007). Cloning, sequencing and functional study of *gacA* gene from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. *Acta Microbiologica Sinica*, 47(2), 208–212.

4.4. Вторичные посредники (вторичные мессенджеры)

Зачастую ответ на внешний стимул контролируется в клетках специальными посредниками — вторичными мессенджерами. Это низкомолекулярные соединения, которые являются глобальными регуляторами большого набора физиологических процессов. Восприятие первичного сигнала может приводить к увеличению в клетке уровня того или иного посредника, который, в свою очередь, оказывает регуляторный эффект на экспрессию генов и активность белков (Camilli, Bassler, 2006). В бактериальных клетках, наиболее хорошо исследованными вторичными посредниками, в том числе регулируемыми синтез факторов вирулентности фитопатогенов, являются циклический аденозинмонофосфат (цАМФ), циклический дигуанозинмонофосфат (ц-ди-ГМФ) и гуанозинтетрафосфат (ppGpp) (Hengge et al., 2016).

За синтез цАМФ отвечают ферменты аденилатциклазы, многие из которых являются мембранными белками и способны непосредственно воспринимать внешние сигналы (Tian et al., 2012). Действие цАМФ, в том числе контроль продукции детерминант патогенности, осуществляется в комплексе с фактором регуляции транскрипции Vfr (virulence factor regulator) (Serate et al., 2011). У псевдомонад (*Pseudomonas syringae*) и дикей (*Dickeya dadantii*) этот комплекс контролирует продукцию сидерофоров (Franza et al., 2005; Taguchi, Ichinose, 2013). При этом у дикей цАМФ дифференциально регулирует синтез двух продуцируемых бактерией сидерофоров (ахромобактин и хризобактин) в зависимости от стадии инфекции: ахромобактин производится на ранней, а хризобактин — на острой стадии инфекции (Franza et al., 2005).

Циклический ди-ГМФ образуется в клетках при участии дигуанилатциклаз — мембраносвязанных ферментов, работа которых может регулироваться в зависимости от содержания кислорода, оксида азота и других факторов (Basu Roy, Sauer, 2014). Как и цАМФ, ц-ди-ГМФ работает в тандеме с фактором регуляции транскрипции — белком BrlR (Biofilm resistance locus regulator) (Chambers et al., 2014). Одной из наиболее известных реакций, контролируемых ц-ди-ГМФ, является переход бактерий от подвижного, планктонного образа жизни к «оседлому», прикрепленному, который реализуется, например, при формировании биопленок. Помимо этого, ц-ди-ГМФ является регулятором таких процессов, как формирование устойчивости к антимикробным агентам, синтез адгезинов и экзополисахаридов, продукция антибиотиков (Pérez-Mendoza et al., 2014; Chen et al., 2016). У бактерий, вызывающих мокрые гнили растений (*Dickeya dadantii*, *Pectobacterium atrosepticum*), этот вторичный посредник регулирует «социальное поведение» и продукцию факторов адгезии соответственно (Yi et al., 2010; Pérez-Mendoza et al., 2011). Циклический ди-ГМФ является компонентом системы кворум сенсинга у ксантомонад и ксилелл; этим вторичным мессенджером опосредована цепочка передачи кворум-зависимого сигнала (DSF), контролирующая экспрессию целевых генов (см. главу 4.1). У возбудителей бактериального ожога плодовых деревьев *Erwinia amylovora* ц-ди-ГМФ активирует продукцию экзополисахарида амиловорана и репрессировывает подвижность, реализуемую посредством жгутикового аппарата (Edmunds et al., 2013).

Гуанозинтетрафосфат (p)ppGpp — хорошо известный регулятор, который служит в качестве медиатора так называемого «строгого ответа» (stringent response). Такое название этот ответ получил из-за очень быстрой активации при стрессовом воздействии, и в первую очередь при лимите субстрата. Биосинтез (p)ppGpp осуществляют синтаза RelA, связывающаяся с рибосомой, а также бифункциональная синтаза/гидролаза SpoT. Активация RelA-синтазы происходит, когда не нагруженная аминокислотой тРНК (доля которых при голодании в клетке увеличивается) связывается с рибосомой (Hauryluk et al., 2015). Это и является триггером образования (p)ppGpp, который, в свою очередь, может регулировать работу РНК-полимеразы, контролируя таким образом экспрессию определенных групп генов стрессового ответа (Hirsch, Elliott, 2002; Dalebroux, Swanson, 2012). Синтаза/гидролаза SpoT является мембраносвязанным белком и, предположительно, может воспринимать внешние сигналы и оптимизировать уровень (p)ppGpp за счет как биосинтеза этого посредника, так и его гидролиза.

(p)ppGpp, помимо генов стрессового ответа, контролирует экспрессию генов вирулентности, в том числе у фитопатогенных бактерий. Система переноса тДНК агробактерий и система секреции третьего типа псевдомонад регулируются этим вторичным мессенджером (Zhang et al., 2004; Chatnaparat et al., 2015). Под контролем строгого ответа находятся и ферменты, разрушающие полисахариды растительной клеточной стенки, секретируемые пектобактериями. Пектатлиазную активность *Pectobacterium carotovorum* (*Erwinia carotovora*) можно индуцировать гуанозинтетрафосфатом на синтетических средах, а у мутантных форм этой бактерии по гену *relA* снижена активность экстраклеточных ферментов и, как следствие, способность мацерировать ткани растений (Wang et al., 2007).

Положительный эффект (p)ppGpp на продукцию факторов вирулентности может быть связан, по крайней мере отчасти, с интерференцией системы строгого ответа с системой кворум сенсинга. Показано, что сверхэкспрессия гена *relA* активирует экспрессию генов системы кворума и способствует более интенсивному накоплению в среде аутоиндукторов межклеточной коммуникации (Van Delden et al., 2001). (p)ppGpp-зависимый способ регуляции синтеза факторов вирулентности, по всей видимости, позволяет оптимизировать продукцию детерминант патогенности таким образом, чтобы не тратить лишние ресурсы на избыточный их синтез. При достаточном уровне питательного субстрата отсутствует необходимость в сверхпроизводстве факторов вирулентности, и низкий уровень (p)ppGpp в клетках позволяет сдерживать их чрезмерную продукцию. Но в случае, если бактерии начинают «чувствовать» недостаток субстрата, в частности через повышение уровня (p)ppGpp, активация строгого ответа ведет к увеличению уровня продукции факторов вирулентности для высвобождения дополнительного растительного субстрата из растительных тканей.

Таким образом, у фитопатогенных бактерий функционирует разветвленная рецепторно-эффекторная сеть контроля уровня продукции факторов вирулентности в зависимости от плотности бактериальной популяции, присутствия характерных

«паттернов» растения-хозяина, а также комплекса физико-химических факторов. Это, с одной стороны, позволяет микроорганизмам экономить ресурсы, избегая «ненужной» или избыточной продукции детерминант патогенности и, с другой стороны, «разрабатывать» замысловатую стратегию нападения на своего хозяина и эффективно с ним взаимодействовать.

Литература:

Basu Roy, A., & Sauer, K. (2014). Diguanylate cyclase NicD-based signalling mechanism of nutrient-induced dispersion by *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 94(4), 771–793.

Camilli, A., & Bassler, B. L. (2006). Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science*, 311(5764), 1113–1116.

Chambers, J. R., Liao, J., Schurr, M. J., & Sauer, K. (2014). BrIR from *Pseudomonas aeruginosa* is a c-di-GMP-responsive transcription factor. *Molecular Microbiology*, 92(3), 471–487.

Chatnaparat, T., Li, Z., Korban, S. S., & Zhao, Y. (2015). The bacterial alarmone (p)ppGpp is required for virulence and controls cell size and survival of *Pseudomonas syringae* on plants. *Environmental Microbiology*, 17(11), 4253–4270.

Chen, Y., Lv, M., Liao, L., Gu, Y., Liang, Z., Shi, Z., ... & Zhang, L. (2016). Genetic modulation of c-di-GMP turnover affects multiple virulence traits and bacterial virulence in rice pathogen *Dickeya zeae*. *PLoS ONE*, 11(11), e0165979.

Dalebroux, Z. D., & Swanson, M. S. (2012). ppGpp: magic beyond RNA polymerase. *Nature Reviews Microbiology*, 10(3), 203–212.

Edmunds, A. C., Castiblanco, L. F., Sundin, G. W., & Waters, C. M. (2013). Cyclic di-GMP modulates the disease progression of *Erwinia amylovora*. *Journal of Bacteriology*, 195(10), 2155–2165.

Franza, T., Mahé, B., & Expert, D. (2005). *Erwinia chrysanthemi* requires a second iron transport route dependent of the siderophore achromobactin for extracellular growth and plant infection. *Molecular Microbiology*, 55(1), 261–275.

Hauryliuk, V., Atkinson, G. C., Murakami, K. S., Tenson, T., & Gerdes, K. (2015). Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology. *Nature Reviews Microbiology*, 13(5), 298–309.

Hengge, R., Gründling, A., Jenal, U., Ryan, R., & Yildiz, F. (2016). Bacterial signal transduction by cyclic di-GMP and other nucleotide second messengers. *Journal of Bacteriology*, 198(1), 15–26.

Hirsch, M., & Elliott, T. (2002). Role of ppGpp in *rpoS* stationary-phase regulation in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 184(18), 5077–5087.

Pérez-Mendoza, D., Coulthurst, S. J., Humphris, S., Campbell, E., Welch, M., Toth, I. K., & Salmond, G. P. (2011). A multi-repeat adhesin of the phytopathogen, *Pectobacterium atrosepticum*, is secreted by a Type I pathway and is subject to complex regulation involving a non-canonical diguanylate cyclase. *Molecular Microbiology*, 82(3), 719–733.

Pérez-Mendoza, D., Aragón, I. M., Prada-Ramírez, H. A., Romero-Jiménez, L., Ramos, C., Gallegos, M. T., & Sanjuán, J. (2014). Responses to elevated c-di-GMP levels in mutualistic and pathogenic plant-interacting bacteria. *PLoS ONE*, 9(3), e91645.

Serate, J., Roberts, G. P., Berg, O., & Youn, H. (2011). Ligand responses of Vfr, the virulence factor regulator from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 193(18), 4859–4868.

Taguchi, F., & Ichinose, Y. (2013). Virulence factor regulator (Vfr) controls virulence-associated phenotypes in *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605 by a quorum sensing-independent mechanism. *Molecular Plant Pathology*, 14(3), 279–292.

Tian, L., Wang, R. E., Fei, Y., & Chang, Y. H. (2012). A homogeneous fluorescent assay for cAMP-phosphodiesterase enzyme activity. *Journal of Biomolecular Screening*, 17(3), 409–414.

Van Delden, C., Comte, R., & Bally, M. (2001). Stringent response activates quorum sensing and modulates cell density-dependent gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 183(18), 5376–5384.

Wang, J., Gardiol, N., Burr, T., Salmond, G. P., & Welch, M. (2007). RelA-dependent (p)ppGpp production controls exoenzyme synthesis in *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Journal of Bacteriology*, 189(21), 7643–7652.

Yi, X., Yamazaki, A., Biddle, E., Zeng, Q., & Yang, C. H. (2010). Genetic analysis of two phosphodiesterases reveals cyclic diguanylate regulation of virulence factors in *Dickeya dadantii*. *Molecular Microbiology*, 77(3), 787–800.

Zhang, H. B., Wang, C., & Zhang, L. H. (2004). The quorumone degradation system of *Agrobacterium tumefaciens* is regulated by starvation signal and stress alarmone (p)ppGpp. *Molecular Microbiology*, 52(5), 1389–1401.

ОСНОВНЫЕ ФАКТОРЫ ФИТОИММУНИТЕТА

5.1. Растительная клеточная стенка

Растительная клеточная стенка (РКС) выполняет множество функций и, в частности, является фактором конститутивной устойчивости растений к биотическим стрессовым факторам. Формируемый этой структурой покров непреодолим для многих микроорганизмов, потенциально способных жить в теле растения. Этот барьер формируется вследствие ряда причин. Во-первых, поры между микрофибриллами целлюлозы слишком малы (около 10 нм) (Горшкова, 2007) для прохождения через них бактериальных клеток, имеющих поперечный размер около 500 нм. Во-вторых, различные компоненты РКС, такие как лигнин, кутин и суберин, откладываются в толще или на поверхности стенки, формируют гидрофобный, трудно поддающийся разрушению слой, препятствующий проникновению микроорганизмов. В-третьих, микрофибриллы целлюлозы — основной компонент стенки любой растительной клетки — очень устойчивы к деградации.

Тем не менее многие бактерии «научились» преодолевать этот барьер, разрушая полимеры РКС с помощью специальных ферментов, секретируемых за пределы клеток микроорганизмов (см. главу 3.1). В свою очередь, для противостояния специализированным патогенам растения приобрели способность укреплять РКС в рамках индуцируемых защитных реакций. При этом усиление барьерных функций РКС может быть связано: с 1) дополнительной лигнификацией и/или суберинизацией, 2) формированием прочных сшивок между отдельными полимерами, 3) отложением каллозы. Кроме того, в РКС может накапливаться целый ряд антипатогенных так называемых PR-белков (pathogenesis-related), а также активных форм кислорода (АФК). Об этих белках и АФК пойдет речь в следующих главах. Помимо этого, в рамках своей защитной функции РКС играет роль сенсора, который воспринимает патогенный организм или последствия его жизнедеятельности, и это, в свою очередь, способствует активации защитных систем растения.

Укрепление РКС при атаке патогенов во многом связано с усилением биосинтеза лигнина (Ride, 1975; Ride, Pearce, 1979; Vance et al., 1980). Этот очень сложно устроенный полимер состоит из трех основных мономеров, относящихся к фенолпропаноидам, — оксикоричных спиртов (или монолигнолов): *n*-кумарового, кониферилового и синапового спиртов (Vaucher et al., 1998) (рис. 5.1.1). Биосинтез лигнина осуществляется неферментативным способом. Окисление монолигнолов при участии фенолпероксидаз или лакказ приводит к образованию между ними связи по свободнорадикальному механизму. Причем образование свободных радикалов в молекулах монолигнолов может происходить в различных положениях,

в результате чего два мономера потенциально способны образовывать несколько типов связей друг с другом. Благодаря этому формируется основа для широкого разнообразия типов связей между мономерами в молекуле лигнина, вследствие чего в составе лигнина невозможно выделить повторяющееся звено (рис. 5.1.1).

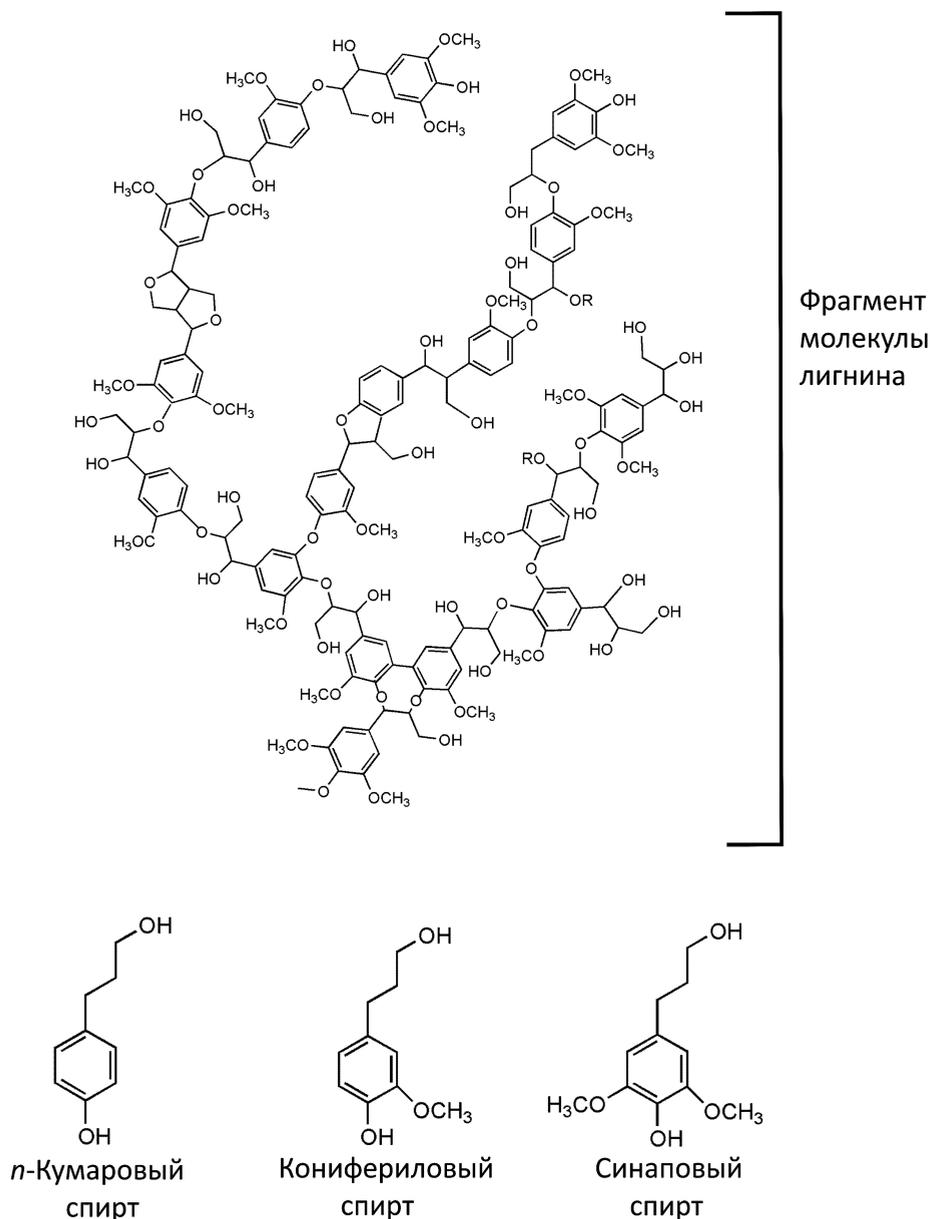


Рис. 5.1.1. Структура фрагмента лигнина и мономеров этого полимера (по: Горшкова, 2007).

Лигнин способствует значительному увеличению прочности РКС, поскольку этот полимер очень сложно поддается деструкции. Ферменты его деградации при- сущи лишь грибам, в первую очередь сапрофитным. Кроме того, лигнификация увеличивает гидрофобность РКС, что, во-первых, дополнительно усиливает ее барьерные свойства, во-вторых, препятствует распространению бактериальных ферментов и токсинов, в-третьих, ограничивает приток к месту инфекции воды и питательных веществ, необходимых патогену для развития (Albersheim et al., 2010). Образование лигнина может также экранировать молекулы полисахаридов от действия бактериальных ферментов, что осложняет процесс разрушения сложных углеводов РКС. Помимо этого, на примере фитопатогенных грибов было продемонстрировано, что оболочка паразита может служить матрицей для отложения лигнина, в результате чего мицелий гриба теряет пластичность, необходимую для роста (Rhodes, 1985).

Во многих случаях показана тесная взаимосвязь между лигнификацией и устойчивостью к фитопатогенам. Так, устойчивые растения после инфицирования патогеном откладывают лигнин быстрее, чем восприимчивые (Ride, 1975; Ride, Pearce, 1979; Vance et al., 1980; Nicholson, Hammerschmidt, 1992; Walter, 1992; Campbell, Ellis, 1992). Причем синтезируемый при атаке паразитом лигнин может отличаться по соотношению монолигнолов от лигнина, присутствующего в клеточной стенке до воздействия патогенов (Niemann et al., 1990). Ингибирование лигнификации, в свою очередь, приводит к повышению восприимчивости растений к биотическим стрессорам (Moershbacher et al., 1988).

Помимо лигнина, гидрофобность РКС определяется такими ее компонентами, как кутин и суберин. Это сложные компоненты нерегулярного строения; в состав кутина входят алифатические соединения, а в состав суберина — ароматические и алифатические. Алифатические компоненты кутина и суберина представлены в основном полиэфирами жирных кислот, среди которых преобладают насыщенные жирные кислоты C_{16} и C_{18} . В состав суберина также входят α , ω -дикарбоновые жирные кислоты и глицерин (Граца, 2015). Ароматический компонент суберина отчасти напоминает лигнин, однако, помимо монолигнолов, в него могут входить оксикоричные кислоты и их производные (Bernards et al., 2004). Кутин и суберин, так же как и лигнин, синтезируются в самой клеточной стенке без непосредственного участия мембраносвязанных ферментов (Fry, 2004).

Кутин играет важную роль в предотвращении инвазии многих патогенов и развитии инфекционного процесса. При «отключении» генов, кодирующих ферменты биосинтеза кутина, растения становятся восприимчивыми к биотическим стрессорам (Li et al., 2007; Lee et al., 2009; Serrano et al., 2014). На сегодняшний день кутин принято рассматривать скорее как критерий конститутивной, но не индуцируемой устойчивости, поскольку усиление биосинтеза этого компонента при инфекции не продемонстрировано. Образование суберина, наоборот, может являться патоген-индуцируемым процессом. Причем в устойчивых сортах интенсивность биосинтеза суберина выше, чем в восприимчивых сортах (Ranathunge et al., 2008). Как правило, наличие кутина и суберина характерно для покровных тканей, хотя

последний может откладываться и во внутренних тканях, в том числе в сосудах ксилемы (Robb et al., 1991). При отложении в сосудах суберин, по-видимому, создает преграду для системного распространения патогенов с транспирационным током.

Полимеры, находящиеся в РКС, могут по-разному взаимодействовать друг с другом, что во многом определяет механические свойства клеточных стенок. Особую роль при этом играют ароматические соединения, которые способны сшиваться неферментативным способом по свободнорадикальному механизму. Такая сшивка делает РКС менее «доступной» для бактериальных ферментов. В подобного рода укреплении РКС важную роль играют белки экстенсины, в составе которых широко представлены ароматические аминокислоты, в первую очередь тирозин (Lamport, 1986). С их помощью экстенсины взаимодействуют с лигнином и полисахаридами и благодаря этому ковалентно связывают разные группы полимеров (Cooper et al., 1987). Известно, что при инвазии патогенов в растениях индуцируется синтез экстенсинов и увеличивается число образуемых ими сшивок (Bradley et al., 1992; Brisson et al., 1994; Mellersh et al., 2002).

Сшивка полимеров в РКС может осуществляться также при участии фенольных соединений, которые ковалентно присоединяются в качестве модифицирующих групп к матричным полисахаридам (связующие гликаны, пектины) на этапе биосинтеза этих полимеров в аппарате Гольджи. Окисление полисахарид-связанных фенольных соединений уже в клеточной стенке (*in muro*) может способствовать образованию «дифенольных мостиков» между отдельными молекулами полисахаридов, что придает жесткость РКС и увеличивает ее барьерные свойства против патогенов (Fry, 1983).

Хорошо известная модификация РКС, направленная на подавление патогенных организмов *in planta*, связана с активацией биосинтеза полисахарида каллозы. Отложение каллозы — настолько характерный процесс при воздействии патогенов, что оценка изменений содержания этого полимера предложена в качестве теста для выявления элиситоров (McCann et al., 2012). Этот линейный гомополимер представляет собой β -1,3-глюкан. Каллозу можно выделить в особый тип полимеров РКС. Она не является ни пектином, поскольку не содержит в составе уроновых кислот, ни связующим гликаном, так как не образует водородных связей с целлюлозой. Кроме того, каллоза, в отличие от вышеперечисленных полисахаридов, не всегда присутствует в составе РКС. Это своего рода «пожарный» полимер, который образуется при формировании срединной пластинки в ходе деления клеток (после деления каллоза разрушается), а также при инвазии патогенных организмов, то есть тогда, когда необходимо быстро заделать «дыры» в РКС (Горшкова, 2007). Именно каллоза хорошо подходит на эту роль, поскольку, во-первых, процесс ее биосинтеза осуществляется гораздо быстрее по сравнению с другими нецеллюлозными полисахаридами и, во-вторых, «пленки» из этого полимера обладают свойством полупроницаемости. Высокая скорость биосинтеза каллозы определяется двумя основными причинами. Во-первых, активация отложения каллозы при биотическом стрессе базируется, прежде всего, не на регуляции транскрипции

генов, кодирующих каллозосинтазы, а на посттрансляционных модификациях этих белков (фосфорилирование) или на этапах сборки молекул фермента в функциональные комплексы за счет взаимодействия со вспомогательными белками (Ellinger, Voigt, 2014). Наличие прецедентов транскриптов или уже синтезированных белков — одна из причин очень быстрой активации синтеза каллозы при инфицировании. Во-вторых, локализация синтеза непосредственно на плазмалемме исключает значительные временные затраты на секрецию полимера через аппарат Гольджи, как это происходит со всеми остальными полисахаридами матрикса клеточной стенки (связующие гликаны и пектиновые вещества).

При патогенезе каллоза обычно откладывается в виде папилл — сложных структур, содержащих, помимо каллозы, некоторые другие полимеры РКС, а также белки и фенольные соединения. Папиллы образуются между плазмалеммой и РКС и иногда внедряются в РКС, обволакивая микрофибриллы целлюлозы (Voigt, 2014) (рис. 5.1.2). Отложение каллозы и формирование папилл является критерием устойчивости растений; в восприимчивых растениях эти структуры обычно образуются менее интенсивно, чем в устойчивых (Lazarovits, Higgins, 1976; Hinch, Clarke, 1982; Allen, Friend, 1983; Nachler, Hohl, 1984).

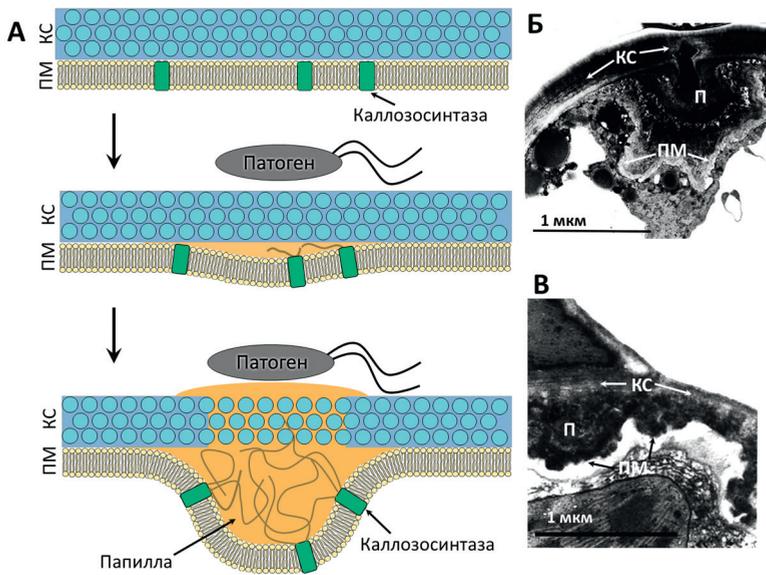


Рис. 5.1.2. Схема образования папилл в клеточных стенках инфицированных патогенами растений (А) и микрофотографии папилл (Б, В) (O'Connell et al., 1990). КС — клеточная стенка; ПМ — плазматическая мембрана; П — папилла.

Процессы, происходящие в РКС, могут препятствовать системному распространению фитопатогенов по сосудам ксилемы, которые служат главной магистралью для перемещения микроорганизмов *in planta*. Препятствие при этом создается благодаря вращанию клеток ксилемной паренхимы через

окаймленные поры в полость сосудов (рис. 5.1.3). Эти выросты, называемые тиллами, могут полностью перекрывать просвет сосуда и блокировать водный транспорт, препятствуя таким образом системному распространению микроорганизмов (Wallis, Truter, 1978; Vaccari, Lindow, 2011) (рис. 5.1.3). Помимо образования тилл, передвижение бактерий по сосудам может блокироваться за счет высвобождения из РКС в полость сосуда желирующих соединений, в первую очередь пектинов, что позволяет локализовать место инфекции (VanderMolen et al., 1977; Boher et al., 1995; Hilaire et al., 2001). Иногда формирование таких препятствий бывает сопряжено с агглютинацией (склеивание и последующий лизис) клеток патогена в месте их иммобилизации. В этом процессе принимают участие белки РКС — лектины и гидроксипролин-богатые белки (Leach et al., 1982; Mellon, Helgeson, 1982; Swords, Staehelin, 1993; Davies et al., 1997; Jebor, Jalil, 2013).

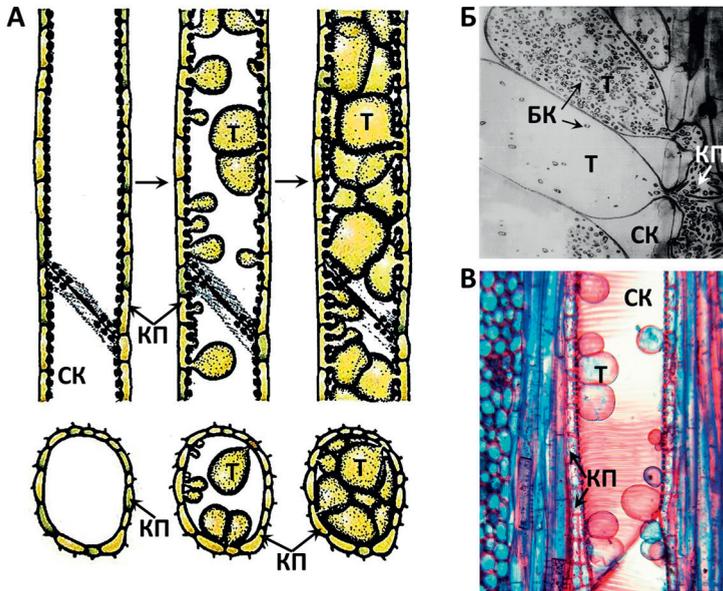


Рис. 5.1.3. Схема образования тилл в сосудах ксилемы инфицированных растений (по: Agrios, 2005) (А) и фотографии тилл, полученные с помощью электронной (Wallis, Truter, 1978) (Б) и световой (В) (Sun et al., 2006) микроскопии. СК — сосуд ксилемы; БК — бактериальные клетки; Т — тиллы; КП — клетка паренхимы.

Защитная роль РКС также тесно связана с сигнальной функцией этого компартмента. Во-первых, РКС содержит сенсоры, воспринимающие различные сигналы опасности, появляющиеся при инвазии патогенов. Во-вторых, РКС является «хранилищем» ионов кальция, вброс которых из апопласта в цитоплазму является одним из ключевых звеньев цепи передачи сигнала, индуцирующего фитоиммунитет. О роли этих сенсоров и кальция в активации защитных реакций растений на биогенные стрессоры подробно написано в главе 6.1. И, в-третьих, в составе РКС «законсервированы» сигналы опасности, кото-

рые «высвобождаются» при инвазии патогена и индуцируют защитный ответ (Basic et al., 1988).

При разрушении полисахаридов РКС, в том числе при участии бактериальных ферментов, образуются олигомерные продукты; некоторые из них обладают физиологической активностью; такие продукты называются олигосахаридами (физиологически активные олигосахариды). Для некоторых продуктов распада целого ряда полисахаридов РКС (ксилоглюкан, ксилан, арабиногалактан, целлюлоза, полигалактуроновая кислота, рамногалактуронан I, рамногалактуронан II) показана способность активировать различные ответные реакции. При этом регуляторные свойства выявлены лишь у небольшого числа фрагментов, образующихся при разрушении любого из этих полимеров. Олигосахарины могут вызывать разнообразные эффекты, связанные с ростом и развитием, адаптацией к абиотическим стрессорам, а также противостоянием патогенным микроорганизмам (Ларская, Горшкова, 2015).

Среди олигосахаринов, образующихся при инфекции из полисахаридов РКС и вызывающих иммунный ответ, описаны «обломки» полигалактуроносовой кислоты — олигогалактурониды. Олигогалактурониды могут активировать синтез активных форм кислорода, лигнина, разнообразных защитных белков и фитогормона этилена, повышая таким образом устойчивость растений к патогенам (Aziz et al., 2004; Allegre et al., 2009). Физиологические эффекты таких олигогалактуронидов могут различаться в зависимости от количества в их составе мономеров (от 2 до 20) (Bishop et al., 1981; Hahn et al., 1981). Самые маленькие фрагменты (2–3 мономера) активируют синтез ингибитора протеиназ патогенов (Bishop et al., 1981). Фрагменты из 4–6 мономеров индуцируют образование этилена — фитогормона, принимающего участие в защитном ответе (Simpson et al., 1998). Наибольшей физиологической активностью обладают олигомеры длиной от 10 до 16 остатков галактуроносовой кислоты (Cote, Hahn, 1994; Ridley et al., 2001). Это связывают с тем, что олигоурониды при степени полимеризации ниже 10 не могут принять конформацию, узнаваемую рецептором, а при значениях выше 16 — теряют возможность достичь рецептора или поместиться в нем (Marfa et al., 1991). Структура фрагментов, наиболее активных у разных видов растений, не всегда универсальна; например, для наибольшей индукции образования фитоалексинов степень полимеризации олигогалактуронидов составляет 12 галактуроновых остатков для сои (*Glycine max* L.), 9 — для фасоли (*Phaseolus vulgaris* L.) и 13 — для клещевины (*Ricinus communis* L.) (Nothnagel et al., 1983; Dixon et al., 1989).

Поскольку при инвазии патогенного организма происходит интенсивное разрушение РКС, весьма вероятно, что существуют и другие еще не выявленные олигосахарины растительного происхождения, помимо олигоуронидов, которые обладают свойствами индукторов иммунного ответа. Сложность их обнаружения и характеристики связана с очень низкими физиологическими концентрациями олигосахаринов. Эффект олигогалактуронидов, например, проявляется при концентрациях всего 10^{-9} – 10^{-8} М, что даже ниже, чем физиологическая концентрация фитогормонов (Marfa et al., 1991).

Таким образом, растительная клеточная стенка служит фактором конститутивной устойчивости растений ко многим потенциальным патогенам. В то же время благодаря разнообразию полимеров, входящих в ее состав, и возможности их взаимодействия формируется основа для динамичного преобразования этого компартмента, которое, в частности, направлено на угнетение патогенного микроорганизма.

Литература:

Горшкова, Т. А. (2007). Растительная клеточная стенка как динамичная система. Москва. Изд-во Наука.

Ларская, И. А., & Горшкова, Т. А. (2015). Растительные олигосахариды: аутсайдеры среди элиситоров? *Биохимия*, 80(7), 1049–1071.

Agrios, G. N. (2005). Plant Pathology. 5th eds. Department of Plant Pathology. University of Florida. United States of America.

Albersheim, P., Darvill, A., Roberts, K., Sederoff, R., & Staehelin, A. (2010). Plant cell walls. Garland Science.

Allegre, M., Heloir, M. C., Trouvelot, S., Daire, X., Pugin, A., Wendehenne, D., & Adrian, M. (2009). Are grapevine stomata involved in the elicitor-induced protection against downy mildew? *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22, 977–986.

Allen, F. H., & Friend, J. (1983). Resistance of potato tubers to infection by *Phytophthora infestans*: a structural study of haustorial encasement. *Physiological Plant Pathology*, 22(3), 285IN1–292IN4.

Aziz, A., Heyraud, A., & Lambert B. (2004). Oligogalacturonide signal transduction, induction of defense-related responses and protection of grapevine against *Botrytis cinerea*. *Planta*, 218, 767–774.

Baccari, C., & Lindow, S. E. (2011). Assessment of the process of movement of *Xylella fastidiosa* within susceptible and resistant grape cultivars. *Phytopathology*, 101, 77–84.

Bacic, A., Harris, P. J., & Stone, B. A. (1988). Structure and function of plant cell walls. *The Biochemistry of Plants*, 14, 297–371.

Baucher, M., Monties, B., Montagu, M. V., & Boerjan, W. (1998). Biosynthesis and genetic engineering of lignin. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 17(2), 125–197.

Bernards, M. A., Summerhurst, D. K., & Razem, F. A. (2004). Oxidases, peroxidases and hydrogen peroxide: the suberin connection. *Phytochemistry Reviews*, 3(1), 113–126.

Bishop, P. D., Makus, D. J., Pearce, G., & Ryan, C. (1981). Proteinase inhibitor inducing factor activity in tomato leaves resides in oligosaccharides enzymically released from cell walls, *Proceedings of National Academy of Sciences*, 78, 3536–3540.

Boher, B., Kpemoua, K., Nicole, M., Luisetti, J., & Geiger, J. P. (1995). Ultrastructure of interactions between cassava and *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*: Cytochemistry of cellulose and pectin degradation in a susceptible cultivar. *Phytopathology*, 85(7), 777–788.

- Bradley, D. J., Kjellbont, P., & Lamb, C. J. (1992). Elicitor- and wound-inducible oxidative cross-linking of a protein-rich plant cell wall protein a novel and rapid defense response. *Cell*, 70, 21–30.
- Brisson, L. F., Tenhaken, R., & Lamb, C. (1994). Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. *The Plant Cell*, 6(12), 1703–1712.
- Campbell, M. M., & Ellis, B. E. (1992). Fungal elicitor-mediated responses in pine cell cultures: cell wall-bound phenolics. *Phytochemistry*, 31(3), 737–742.
- Cooper, J. B., Chen, J. A., & Varner, J. E. (1987). Hydroxyproline-rich glycoproteins of plant cell walls. *Trends in Biochemical Sciences*, 12, 24–27.
- Côté F., Hahn M. G. (1994). Oligosaccharins: structures and signal transduction. *Plant Molecular Biology*, 26, 1379–1411.
- Davies, H. A., Daniels, M. J., & Dow, J. M. (1997). Induction of extracellular matrix glycoproteins in *Brassica petioles* by wounding and in response to *Xanthomonas campestris*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 10(7), 812–820.
- Dixon, R. A., Jennings, A. C., Davies, L. A., Gerrish, C., & Murphy, D. L. (1989). Elicitor-active components from French bean hypocotyls. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 34(2), 99–115.
- Ellinger, D., & Voigt, C. A. (2014). Callose biosynthesis in arabidopsis with a focus on pathogen response: what we have learned within the last decade. *Annals of Botany*, 114(6), 1349–1358.
- Fry, S. C. (1983). Feruloylated pectins from the primary cell wall: their structure and possible functions. *Planta*, 157(2), 111–123.
- Fry, S. C. (2004). Primary cell wall metabolism: tracking the careers of wall polymers in living plant cells. *New Phytologist*, 161(3), 641–675.
- Graça, J. (2015). Suberin: the biopolyester at the frontier of plants. *Frontiers in Chemistry*, 3, 62.
- Hächler, H., & Hohl, H. R. (1984). Temporal and spatial distribution patterns of collar and papillae wall appositions in resistant and susceptible tuber tissue of *Solanum tuberosum* infected by *Phytophthora infestans*. *Physiological Plant Pathology*, 24(1), 107–118.
- Hahn, M. G., Darvill, A. G., & Albersheim, P. (1981). Host-pathogen interactions. XIX. The endogenous elicitor, a fragment of a plant cell wall polysaccharide that elicits phytoalexin accumulation in soybeans. *Plant Physiology*, 68, 1161–1169.
- Hilaire, E., Young, S. A., Willard, L. H., McGee, J. D., Sweat, T., Chittoor, J. M., ... & Leach, J. E. (2001). Vascular defense responses in rice: peroxidase accumulation in xylem parenchyma cells and xylem wall thickening. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14(12), 1411–1419.
- Hinch, J. M., & Clarke, A. E. (1982). Callose formation in *Zea mays* as a response to infection with *Phytophthora cinnamomi*. *Physiological Plant Pathology*, 21(1), 113–124.
- Jebor, M. A., & Jalil, Y. H. (2013). Interaction of some pathogenic bacteria with *Phaseolus vulgaris* L. seeds lectin (as Biosensor). *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, 3(3), 239.

Lamport, D. T. A. (1986). Roles for peroxidases in cell wall genesis, molecular and physiology aspects of plant peroxidases. Greppin, H., Penel, C., and Gaspar TH, eds. University of Geneve, Switzerland.

Lazarovits, G., & Higgins, V. J. (1976). Histological comparison of *Cladosporium fulvum* race 1 on immune, resistant, and susceptible tomato varieties. *Canadian Journal of Botany*, 54(3–4), 224–234.

Leach, J. E., Cantrell, M. A., & Sequeira, L. (1982). Hydroxyproline-rich bacterial agglutinin from potato extraction, purification, and characterization. *Plant Physiology*, 70(5), 1353–1358.

Lee, S. B., Go, Y. S., Bae, H. J., Park, J. H., Cho, S. H., Cho, H. J., ... & Suh, M. C. (2009). Disruption of glycosylphosphatidylinositol-anchored lipid transfer protein gene altered cuticular lipid composition, increased plastoglobules, and enhanced susceptibility to infection by the fungal pathogen *Alternaria brassicicola*. *Plant Physiology*, 150(1), 42–54.

Li, Y., Beisson, F., Koo, A. J., Molina, I., Pollard, M., & Ohlrogge, J. (2007). Identification of acyltransferases required for cutin biosynthesis and production of cutin with suberin-like monomers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(46), 18339–18344.

Marfa, V., Gollin, D. J., Eberhard, S., Mohnen, D., Danill, A., & Albersheim, P. (1991). Oligogalacturonides are able to induce flowers to form on tobacco explants. *The Plant Journal*, 1, 217–225.

McCann, H. C., Nahal, H., Thakur, S., & Guttman, D. S. (2012). Identification of innate immunity elicitors using molecular signatures of natural selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(11), 4215–4220.

Mellersh, D. G., Foulds, I. V., Higgins, V. J., & Heath, M. C. (2002). H₂O₂ plays different roles in determining penetration failure in three diverse plant-fungal interactions. *The Plant Journal*, 29(3), 257–268.

Mellon, J. E., & Helgeson, J. P. (1982). Interaction of a hydroxyproline-rich glycoprotein from tobacco callus with potential pathogens. *Plant Physiology*, 70(2), 401–405.

Moerschbacher, B. M., Noll, U. M., Flott, B. E., & Reisener, H. J. (1988). Lignin biosynthetic enzymes in stem rust infected, resistant and susceptible near-isogenic wheat lines. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 33(1), 33–46.

Nicholson, R. L., & Hammerschmidt, R. (1992). Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 30(1), 369–389.

Niemann, G. J., Baayen, R. P., & Boon, J. J. (1990). Localization of phytoalexin accumulation and determination of changes in lignin and carbohydrate composition in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) xylem as a consequence of infection with *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, by pyrolysis-mass spectrometry. *European Journal of Plant Pathology*, 96(3), 133–153.

Nothnagel, E.A., McNeil, M., Ahbersheim, P., & Dell, A. (1983). Host-pathogen interactions. XXII. A galacturonic acid oligosaccharide from plant cell walls elicits phytoalexins, *Plant Physiology*, 71, 916–926.

O'Connell, R. I., Brown, I. R., Mansfield, J. W., Bailey, J. A., Mazau, D., Rumeau, D., & Esquerré-Tugayé, M. T. (1990). Immunocytochemical localization of hydroxyproline-rich

glycoproteins accumulating in melon and bean at sites of resistance to bacteria and fungi. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 3, 33–40.

Ranathunge, K., Thomas, R. H., Fang, X., Peterson, C. A., Gijzen, M., & Bernards, M. A. (2008). Soybean root suberin and partial resistance to root rot caused by *Phytophthora sojae*. *Phytopathology*, 98 (11), 1179–1189.

Rhodes, M. J. C. (1985). Physiological significance of plant phenolic compounds. Biochemistry of plant phenolics. *Annual Proceedings of the Phytochemical Society of Europe*, 25, 99–117.

Ride, J. P. (1975). Lignification in wounded wheat leaves in response to fungi and its possible role in resistance. *Physiological Plant Pathology*, 5(2), 125–134.

Ride, J. P., & Pearce, R. B. (1979). Lignification and papilla formation at sites of attempted penetration of wheat leaves by non-pathogenic fungi. *Physiological Plant Pathology*, 15(1), 2687–2992.

Ridley, B. L., O'Neill, M. A., & Mohnen, D. (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, 57, 929–967.

Robb, J., Lee, S. W., Mohan, R., & Kolattukudy, P. E. (1991). Chemical characterization of stress-induced vascular coating in tomato. *Plant Physiology*, 97(2), 528–536.

Serrano, M., Coluccia, F., Torres, M., L'Haridon, F., & Métraux, J. P. (2014). The cuticle and plant defense to pathogens. *Frontiers in Plant Science*, 5, 274.

Simpson, S. D., Ashford, D. A., Harvey, D. J., & Bowles, D. J. (1998). Short chain oligogalacturonides induce ethylene production and expression of the gene encoding aminocyclopropane 1-carboxylic acid oxidase in tomato plants. *Glycobiology*, 8, 579–583.

Sun, Q., Rost, T. L., & Matthews, M. A. (2006). Pruning-induced tylose development in stems of current-year shoots of *Vitis vinifera* (Vitaceae). *American Journal of Botany*, 93(11), 1567–1576.

Swords, K. M., & Staehelin, L. A. (1993). Complementary immunolocalization patterns of cell wall hydroxyproline-rich glycoproteins studied with the use of antibodies directed against different carbohydrate epitopes. *Plant Physiology*, 102(3), 891–901.

Vance, C. P., Kirk, T. K., & Sherwood, R. T. (1980). Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 18(1), 259–288.

VanderMolen, G. E., Beckman, C. H., & Rodehorst, E. (1977). Vascular gelation: a general response phenomenon following infection. *Physiological Plant Pathology*, 11(1), 14–19.

Voigt, C. A. (2014). Callose-mediated resistance to pathogenic intruders in plant defenserelated papillae. *Frontiers in Plant Science*, 5, 168.

Wallis, F. M., & Truter, S. J. (1978). Histopathology of tomato plants infected with *Pseudomonas solanacearum*, with emphasis on ultrastructure. *Physiological Plant Pathology*, 13(3), 307IN9311-310IN16317.

Walter, M. H. (1992). Regulation of lignification in defense. In: *Plant Gene Research. Genes Involved in Plant Defense* (Boller, T. and Meins, F., eds.). Vienna: Springer, 327–352.

5.2. Вторичные метаболиты

Важными факторами фитои́ммунитета служат так называемые вторичные метаболиты растений. Обычно вторичными называют те соединения, которые не участвуют в основном клеточном обмене. Долгое время их ошибочно причисляли к случайным, ненужным компонентам клетки. В действительности роль вторичных метаболитов многоплановая: они вовлечены во многие (если не во все) базовые клеточные процессы, например в качестве регуляторов. Вторичными можно назвать те метаболиты, которые, в отличие от первичных (белки, жиры, углеводы, нуклеиновые кислоты и их компоненты), присутствуют не во всех живых клетках. Поэтому вторичные метаболиты имеют функциональное значение не на уровне клетки, а на уровне целого организма, выполняя разные «экологические» функции: защиту от паразитов, размножение, взаимодействие с другими организмами и т. д. Критериями вторичных метаболитов также служат их биологическая активность, небольшая молекулярная масса и ограниченное число предшественников их биосинтеза (Алехина с соавт., 2007; Хелдт, 2011).

Хотя вторичные метаболиты продуцируются всеми живыми организмами, растения являются безусловными «чемпионами» в их производстве, синтезируя десятки, а то и сотни тысяч разных по структуре вторичных метаболитов. Некоторые из этих растительных соединений принимают участие во взаимодействии растений с фитопатогенами (Paiva et al., 2010). Вторичные метаболиты, проявляющие антимикробную активность, разделяют на две или три группы. К первой группе — **фитоантиципины**, или **фитонциды**, — относятся соединения, конститутивно (постоянно) синтезируемые в клетке (Лутова, Шумилина, 2003). Ко второй группе антимикробных вторичных метаболитов принадлежат **фитоалексины** — соединения, которые в норме не производятся в растении, а образуются только при атаке патогенов (Prost et al., 2005; Хелдт, 2011). Иногда, помимо фитоантиципинов и фитоалексинов, выделяют еще группу **полуиндуцибельных вторичных метаболитов** (Алехина с соавт., 2007). К этой группе относят такие антимикробные соединения, которые синтезируются в растениях в норме и «хранятся» в клетках в виде неактивных предшественников (чаще всего гликозидов — конъюгатов с углеводными остатками), а их «активация» происходит при инвазии патогена. При этом формирование активного соединения из неактивного обычно основано на дифференциальной компартиментализации предшественника и преобразующего его фермента. Неактивные предшественники часто локализируются в вакуоли или апопласте, а ферменты, осуществляющие их «активацию», — в цитоплазме. Типичными представителями этой группы вторичных метаболитов являются тиогликозиды, цианогенные и стероидные гликозиды (Zeng et al., 2013; Борисова с соавт., 2014).

Все вторичные метаболиты растений разделяют на несколько (около десятка) групп. Среди них наиболее обширными и исследованными являются три: **фенольные соединения**, **алкалоиды** и **изопреноиды (терпеноиды)** (Носов, 2005). Среди этих групп соединений есть такие, которые обладают антипатогенным эф-

фектом, в том числе угнетающие фитопатогенные бактерии (табл. 5.2.1). Обычно в плане антимикробного эффекта вторичные метаболиты обладают неспецифичным действием, то есть эффективны против большой группы патогенов. Мишенями вторичных метаболитов в бактериальной клетке являются мембраны, белки (в том числе ферменты общего метаболизма) и нуклеиновые кислоты.

Фенольные соединения, представляющие собой вещества ароматической природы и содержащие одну или несколько гидроксильных групп, синтезируются по двум основным путям: шикиматному и ацетатно-малонатному. В первом случае предшественниками фенольных соединений являются фосфоенолпировиноградная кислота (ФЕП) и эритрозо-4-фосфат; во втором случае — ацетил-СоА. Большое разнообразие фенольных соединений в растениях формируется вследствие разнообразных модификаций молекул (гликозилирование, метилирование, метоксилирование) и образования конъюгатов с остатками углеводов, органических кислот, аминов и др. (Борисова с соавт., 2014). Бактерицидное действие фенольных соединений может определяться их способностью, во-первых, инактивировать белки благодаря связыванию с SH-, NH₂-группами и формированию таким образом замещенных продуктов, во-вторых, служить в качестве акцепторов электронов и окислять разные группы соединений, в-третьих, влиять на работу электрон-транспортных цепей, действуя как разобщители при формировании протонного градиента, в-четвертых, встраиваться в мембраны, приводя к их разрыву, и, в-пятых, сшивать различные полимеры растительной клеточной стенки, создавая физический барьер на пути патогена (Дьяков, 2012; Rempe et al., 2017) (табл. 5.2.1).

К бактерицидным фенольным соединениям в том числе относятся такие окисленные формы фенолов, как *хиноны* и *флавоноиды*, а также полифенолы — *танины*. Флавоноиды и хиноны содержат по одной и две карбонильные группы соответственно. Антибактериальные хиноны в первую очередь отвечают за инактивацию белков. Основными мишенями хинонов в клетках фитопатогенов считаются микробные адгезины, полипептиды бактериальной оболочки и мембраносвязанные белки (Cowan, 1999). Кроме того, хиноны способны к неферментативной аутополимеризации, а также к ковалентной гетероконденсации с белками и углеводами, что приводит к образованию окрашенных нерастворимых комплексов, которые могут формировать тяжело преодолеваемый барьер для фитопатогенов (Wang et al., 2015).

Антибактериальную активность флавоноидов связывают с их мембранотропным действием. В пользу этого свидетельствует больший бактерицидный эффект более гидрофобных флавоноидов, чем более гидрофильных (Cowan, 1999). Как и хиноны, флавоноиды могут обеспечивать сшивку компонентов растительной клеточной стенки (Beckman, 2000). Способность хелатировать ионы металлов, которые необходимы для работы бактериальных экстраклеточных ферментов, позволяет отнести флавоноиды и к ингибиторам факторов вирулентности фитопатогенов (Treutter, 2005; Mierziak et al., 2014). Кроме того, флавоноиды могут связываться с нуклеотидами и таким образом приводить к нарушениям метаболизма нуклеиновых кислот у бактерий (Wu et al., 2013).

Таблица 5.2.1. Вторичные метаболиты растений и их антибактериальные свойства.

Тип вторичных метаболитов	Растения-продуценты (род)	Соединение (группа соединений)	Бактерии-мишени	Принцип действия	Ссылки
Фенольные соединения	<i>Solanum</i>	Гликозилированные флавоноиды	<i>Erwinia carotovora</i>	Ингибирование литических ферментов микроорганизмов; ингибирование синтеза нуклеиновых кислот; дестабилизация бактериальных мембран	Lorenc-Kukula et al., 2005 Padmavati et al., 1997
	<i>Oryza</i>	Нарингенин, кемферол, кверцетин, гироксикверцетин	<i>Xanthomonas oryzae</i>		
Танины	<i>Brassica</i>	Гликозид кемферола	<i>Xanthomonas campestris</i>	Связывание микробных адгезинов, ферментов, полисахаридов	Velasco et al., 2013 Song et al., 2013
	<i>Nicotiana, Arabidopsis</i>	Физетин	<i>Pectobacterium carotovorum, Pseudomonas syringae</i>		
	<i>Lycopersicon</i>	Флавоноиды	<i>Pseudomonas syringae</i>		
	<i>Citrus</i>	Гликозилированные флавоноиды; полиметоксилированные флавоны	<i>Candidatus Liberibacter</i>		
Хиноны	<i>Sapintum</i>	Галловая, чебулагоя и чебулиновая кислоты, корилагин	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Связывание микробных адгезинов, полисахаридов	Vu et al., 2017
	<i>Cassia</i>	Антрахинон	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
Терпеноиды	<i>Origanum, Artemisia, Tagetes</i>	Гераниол, цитралиол	<i>Erwinia amylovora, Pseudomonas syringae, Xanthomonas axonopodis</i>	Дестабилизация бактериальных мембран	Scottichini, Rossi, 1991; Badawy, Abdelgaleil, 2014; Gakuubi et al., 2016
Алкалоиды	<i>Berberis, Amaryllis, Pergularia</i>	Берберин, фенантридиновые алкалоиды, пергуларинин	<i>Xanthomonas vesicatoria, Xanthomonas oryzae, Ralstonia solanacearum</i>	Нарушение клеточного деления; ингибирование синтеза аминокислот и метаболизма фолатов	Sukanya et al., 2009; Monika, Preeti, 2013

Танины (дубильные вещества), относящиеся к полифенолам, содержат большое количество ОН-групп. Эти группы обеспечивают образование прочных связей танинов с белками, полисахаридами и другими биополимерами бактерий, что и определяет антипатогенный эффект этих вторичных метаболитов (Scalbert, 1991).

Алкалоиды — это большая и структурно неоднородная группа биологически активных азотсодержащих вторичных метаболитов, синтезируемых из аминокислот. Эти соединения разделяют на типичные (гетероциклические) алкалоиды, содержащие азот в гетероцикле, и атипичные (негетероциклические или протоалкалоиды), у которых атом азота располагается в боковой цепи (Cushnie et al., 2014). Антимикробная активность алкалоидов наиболее широко продемонстрирована в отношении патогенов человека (Okwu, Igara, 2009; Burgos et al., 2015; Gurgaru, Mamidala, 2017). При этом было показано негативное влияние этих соединений и на фитопатогенные бактерии (*Xanthomonas vesicatoria*, *Xanthomonas oryzae*, *Ralstonia solanacearum*) (Sukanya et al., 2009; Monika, Preeti, 2013). Бактерицидный эффект алкалоидов может быть связан с разными механизмами их действия. Эти соединения способны нарушать образование септального кольца и препятствовать таким образом размножению бактерий. Кроме того, алкалоиды могут выступать в качестве ингибиторов синтеза аминокислот. Показан также негативный эффект алкалоидов на синтез нуклеиновых кислот и репарацию ДНК, которые связаны с ингибированием дигидрофолатредуктазы — одного из ключевых ферментов метаболизма фолатов (Rao, Venkatachalam, 2000; Cushnie et al., 2014).

К **терпеноидам (изопреноидам)** относят обширную группу соединений с общей формулой $(C_{10}H_{16})_n$, которые состоят из нескольких единиц ненасыщенного диенового углеводорода изопрена и синтезируются из ацетил-СоА с образованием изопентенилпирофосфата и его последующей полимеризацией (Пономарев, Федорова, 2014). Принцип действия терпеноидов выяснен не до конца, но считается, что он связан с нарушением структуры и функций мембран, поскольку эти соединения являются липофильными. Повышение гидрофильности терпеноидов путем добавления гидроксильной группы резко снижает их антимикробную активность (Mendoza et al., 1997). Терпеноиды проявляют антимикробную активность в отношении многих бактерий, в том числе фитопатогенных (Scortichin, Rossi, 1991). Особенно широко продемонстрирован антимикробный эффект эфирных масел — субстанций, в состав которых преимущественно входят терпеноиды и их кислородсодержащие производные (Vasinauskiene et al., 2006; Badawy, Abdelgaleil, 2014; Gakuubi et al., 2016).

Таким образом, огромное разнообразие вторичных метаболитов и многообразные механизмы их действия позволяют растениям эффективно противостоять фитопатогенным микроорганизмам. Эти метаболиты способны «выводить из строя» жизненно важные системы микроорганизмов, а также способствовать укреплению барьеров растительной клетки.

Литература:

Алехина, Н. Д., Балнокин, Ю. В., Гавриленко, В. Ф. (2007). Физиология растений. Москва. Изд-во Академия.

Борисова, Г. Г., Еромошин, А. А., Малева, М. Г., Чукина, Н. В. (2014). Основы биохимии вторичного обмена растений. Екатеринбург. Изд-во Уральского университета.

Дьяков, Ю. Т. (2012). Фундаментальная фитопатология. Москва. Изд-во Красанд.

Лутова, Л. А., & Шумилина, Г. М. (2003). Метаболиты растений и их роль в устойчивости к фитопатогенам. *Экологическая генетика*, 1 (Спецвыпуск), 47–58.

Носов, А. М. (2005). Вторичный метаболизм. В книге: Физиология растений. Москва. Изд. центр Академия.

Пономарев, Д. А., Федорова, Э. И. (2014). Основы химии терпенов. Сыктывкар. Изд-во С.-Петербургский государственный лесотехнический университет.

Хелдт Г.-В. (2011). Биохимия растений. Москва. Изд-во Бинوم. Лаборатория знаний.

Badawy, M. E., & Abdelgaleil, S. A. (2014). Composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Egyptian plants against plant pathogenic bacteria and fungi. *Industrial Crops and Products*, 52, 776–782.

Beckman, C. H. (2000). Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 57(3), 101–110.

Burgos, A., Barua, J., Flores-Giubi, M. E., Bazan, D., Ferro, E., & Alvarenga, N. (2015). Antibacterial activity of the alkaloid extract and isolated compounds from *Croton bonplandianum* Baill. (*Euphorbiaceae*). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 17(4), 922–927.

Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564–582.

Cushnie, T. T., Cushnie, B., & Lamb, A. J. (2014). Alkaloids: an overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 44(5), 377–386.

Gakuubi, M. M., Wagacha, J. M., Dossaji, S. F., & Wanzala, W. (2016). Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of *Tagetes minuta* (*Asteraceae*) against selected plant pathogenic bacteria. *International Journal of Microbiology*. 2016.

Gurrapu, S., & Mamidala, E. (2017). *In vitro* antibacterial activity of alkaloids isolated from leaves of *Eclipta alba* against human pathogenic bacteria. *Pharmacognosy Journal*, 9(4), 573–577.

Hijaz, F. M., Manthey, J. A., Folimonova, S. Y., Davis, C. L., Jones, S. E., & Reyes-De-Corcuera, J. I. (2013). An HPLC-MS characterization of the changes in sweet orange leaf metabolite profile following infection by the bacterial pathogen *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *PLoS ONE*, 8(11), e79485.

Kazmi, M. H., Malik, A., Hameed, S., Akhtar, N., & Ali, S. N. (1994). An anthraquinone derivative from *Cassia italica*. *Phytochemistry*, 36(3), 761–763.

Lorenc-Kukula, K., Jafra, S., Oszmiański, J., & Szopa, J. (2005). Ectopic expression of anthocyanin 5-O-glucosyltransferase in potato tuber causes increased resistance to bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(2), 272–281.

Mendoza, L., Wilkens, M., & Urzúa, A. (1997). Antimicrobial study of the resinous exudates and of diterpenoids and flavonoids isolated from some Chilean *Pseudognaphalium* (*Asteraceae*). *Journal of Ethnopharmacology*, 58(2), 85–88.

Mierziak, J., Kostyn, K., & Kulma, A. (2014). Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. *Molecules*, 19(10), 16240–16265.

Monika, G., & Preeti, C. (2013). Antimicrobial activity of crude alkaloid extract of *Aconitum balfourii* Stapf. *Pantnagar Journal of Research*, 11(3), 417–420.

Okwu, D. E., & Igara, E. C. (2009). Isolation, characterization and antibacterial activity of alkaloid from *Datura metel* Linn leaves. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 3(5), 277–281.

Padmavati, M., Sakthivel, N., Thara, K. V., & Reddy, A. R. (1997). Differential sensitivity of rice pathogens to growth inhibition by flavonoids. *Phytochemistry*, 46(3), 499–502.

Paiva, P. M. G., Gomes, F. S., Napoleão, T. H., Sá, R. A., Correia, M. T. S., & Coelho, L. C. B. B. (2010). Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 1, 396–406.

Prost, I., Dhondt, S., Rothe, G., Vicente, J., Rodriguez, M. J., Kift, N., ... & Castresana, C. (2005). Evaluation of the antimicrobial activities of plant oxylipins supports their involvement in defense against pathogens. *Plant Physiology*, 139(4), 1902–1913.

Rao, K. N., & Venkatachalam, S. R. (2000). Inhibition of dihydrofolate reductase and cell growth activity by the phenanthroindolizidine alkaloids pergularinine and tylophorinidine: the *in vitro* cytotoxicity of these plant alkaloids and their potential as antimicrobial and anticancer agents. *Toxicology in vitro*, 14(1), 53–59.

Rempe, C. S., Burris, K. P., Lenaghan, S. C., & Stewart Jr, C. N. (2017). The potential of systems biology to discover antibacterial mechanisms of plant phenolics. *Frontiers in Microbiology*, 8, 422.

Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30(12), 3875–3883.

Scortichini, M., & Rossi, M. P. (1991). Preliminary *in vitro* evaluation of the antimicrobial activity of terpenes and terpenoids towards *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. *Journal of Applied Microbiology*, 71(2), 109–112.

Song, G. C., Ryu, S. Y., Kim, Y. S., Lee, J. Y., Choi, J. S., & Ryu, C. M. (2013). Elicitation of induced resistance against *Pectobacterium carotovorum* and *Pseudomonas syringae* by specific individual compounds derived from native Korean plant species. *Molecules*, 18(10), 12877–12895.

Sukanya, S. L., Sudisha, J., Hariprasad, P., Niranjana, S. R., Prakash, H. S., & Fathima, S. K. (2009). Antimicrobial activity of leaf extracts of Indian medicinal plants against clinical and phytopathogenic bacteria. *African Journal of Biotechnology*, 8(23), 6677–6682.

Treutter, D. (2005). Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. *Plant Biology*, 7(06), 581–591.

Vargas, P., Farias, G. A., Nogales, J., Prada, H., Carvajal, V., Barón, M., ... & Gallegos, M. T. (2013). Plant flavonoids target *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 flagella and type III secretion system. *Environmental Microbiology Reports*, 5(6), 841–850.

Vasinauskiene, M., Radusiene, J., Zitikaite, I., & Surviliene, E. (2006). Antibacterial activities of essential oils from aromatic and medicinal plants against growth of phytopathogenic bacteria. *Agronomy Research*, 4, 437–440.

Velasco, P., Lema, M., Francisco, M., Soengas, P., & Cartea, M. E. (2013). *In vivo* and *in vitro* effects of secondary metabolites against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Molecules*, 18(9), 11131–11143.

Vu, T. T., Kim, H., Tran, V. K., Vu, H. D., Hoang, T. X., Han, J. W., ... & Kim, J. C. (2017). Antibacterial activity of tannins isolated from *Sapium baccatum* extract and use for control of tomato bacterial wilt. *PLoS ONE*, 12(7), e0181499.

Wang, M., Wu, C., Cheng, Z., & Meng, H. (2015). Growth and physiological changes in continuously cropped eggplant (*Solanum melongena* L.) upon relay intercropping with garlic (*Allium sativum* L.). *Frontiers in Plant Science*, 6, 262.

Wu, T., Zang, X., He, M., Pan, S., & Xu, X. (2013). Structure-activity relationship of flavonoids on their anti-*Escherichia coli* activity and inhibition of DNA gyrase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(34), 8185–8190.

Zeng, X., Smith, R., & Zhu, X. (2013). Synthesis of thioglycoside analogues of maradolipid. *The Journal of Organic Chemistry*, 78(8), 4165–4170.

5.3. Активные формы кислорода и программируемая клеточная смерть

Критерием устойчивости растений к фитопатогенным организмам является интенсификация процессов образования активных форм кислорода (АФК). Эти соединения обладают высокой реактивностью, обусловленной наличием неспаренного электрона на внешнем электронном уровне. Защитные свойства этих молекул могут быть связаны с несколькими основными принципами их действия. Во-первых, АФК могут оказывать прямой бактерицидный и бактериостатический эффект (Togres et al., 2006; Guo et al., 2012; Petrova et al., 2014; Tondo et al., 2016). Во-вторых, эти соединения могут усиливать барьерные свойства клеточных стенок благодаря способности окислять некоторые ее компоненты (некоторые белки, фенольные соединения), что способствует их сшивке (Bradley et al., 1992). В-третьих, АФК являются регуляторами разных форм программируемой клеточной смерти, которые, в свою очередь, могут препятствовать развитию инфекционного процесса, приводя к репрессии или элиминации патогенного организма (Pontier et al., 1998). В-четвертых, АФК являются компонентами сигнальных каскадов, регулирующих множество защитных ответов растений, таких, например, как закрывание устьиц, индукция экспрессии защитных генов, синтез салициловой кислоты (Melotto et al., 2017). За счет окисления липидов мембран АФК также способствуют образованию оксилипинов — физиологически активных соединений, которые могут как оказывать прямое токсическое действие на клетки патогенов, так и служить в качестве активаторов защитных реакций растений (Prost et al., 2005).

Основными представителями АФК являются супероксидный анион-радикал ($O_2^{\bullet-}$), гидроксильный радикал ($\bullet OH$), синглетный кислород (1O_2) и перекись водорода (H_2O_2) (Tripathy, Oelmüller, 2012). Разные формы АФК характеризуются разной реакционной способностью, временем жизни и радиусом диффузии. Наиболее короткоживущей и самой реакционноспособной формой АФК является гидроксильный радикал, время жизни которого составляет 1 нс. К короткоживущим АФК также относятся синглетный кислород и супероксид-анион (время жизни до миллисекунды). Как правило, короткоживущие АФК не успевают распространиться по клетке и сразу же окисляют близлежащие молекулы или преобразуются в результате ферментативных или неферментативных реакций. Самой стабильной формой АФК является перекись водорода; она представляет собой «мобильную форму» АФК, которая может диффундировать на относительно большие расстояния, в том числе проходя через плазмалемму (Креславский с соавт., 2012).

Первым этапом образования АФК в клетке может быть либо попадание электрона на молекулярный кислород, в результате чего образуется супероксид-анион, либо поглощение энергии молекулярным кислородом и его превращение в синглетный кислород (рис. 5.3.1).

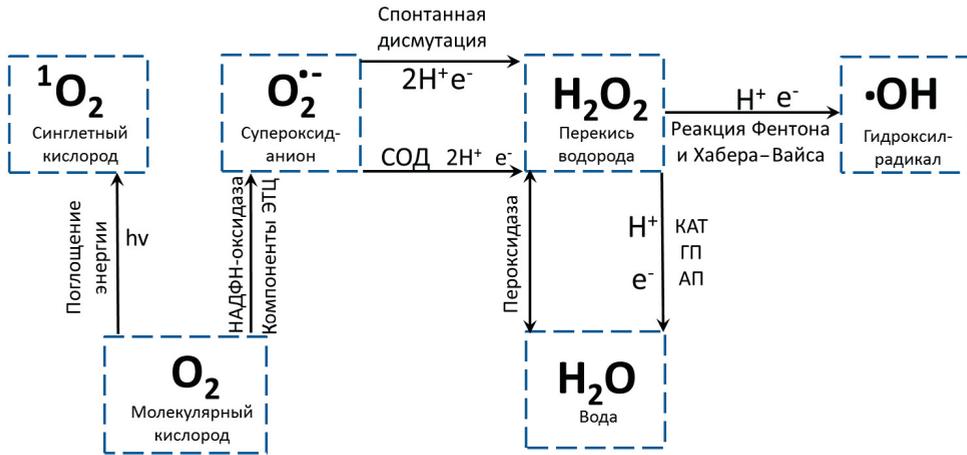


Рис. 5.3.1. Схема образования АФК в клетке. Ферменты, осуществляющие трансформацию активных форм кислорода: супероксиддисмутаза (СОД), каталаза (КАТ), аскорбатпероксидаза (АП), глутатионпероксидаза (ГП).

Образование супероксид-аниона происходит при участии компонентов электрон-транспортных цепей, а также ферментов, локализованных в апопласте. Затем супероксид-анион может превращаться в долгоживущую перекись водорода в результате реакции дисмутации, осуществляемой супероксиддисмутазой, которые относятся к классу оксидоредуктаз. Образование перекиси водорода может происходить также при участии пероксидаз, аминоксидаз или оксалат оксидаз. Перекись водорода, в свою очередь, может преобразовываться в результате реакции Фентона или Хабера — Вайса в гидроксильный радикал или восстанавливаться до воды при участии различных антиоксидантных ферментов (например, аскорбат-, глутатионпероксидаз или каталаз) (Foyer, Noctor, 2005).

АФК образуются как при патологиях, так и в норме в различных клеточных компартаментах (хлоропласты, митохондрии, пероксисомы, апопласт) (рис. 5.3.2). Генерация АФК в хлоропластах и митохондриях происходит из-за нарушения транспорта электронов по электрон-транспортной цепи и их попадания на молекулярный кислород. В пероксисомах перекись водорода образуется как побочный продукт окисления гликолевой кислоты гликолатоксидазой при фотодыхании, а также при β -окислении жирных кислот. В апопласте АФК генерируются в основном пероксидазами клеточной стенки и мембранными НАДФН-оксидазами (Tripathy, Oelmüller, 2012). При фитопатогенезе основными «производителями» АФК считаются мембраносвязанные НАДФН-оксидазы с основной субъединицей Rboh (Respiratory burst oxidase homolog). Эти ферменты окисляют НАДФН на внутренней поверхности плазмалеммы и переносят электрон на молекулярный кислород на ее внешней поверхности, в результате чего в апопласте образуется супероксидный анион-радикал (Bolwell et al., 2002).

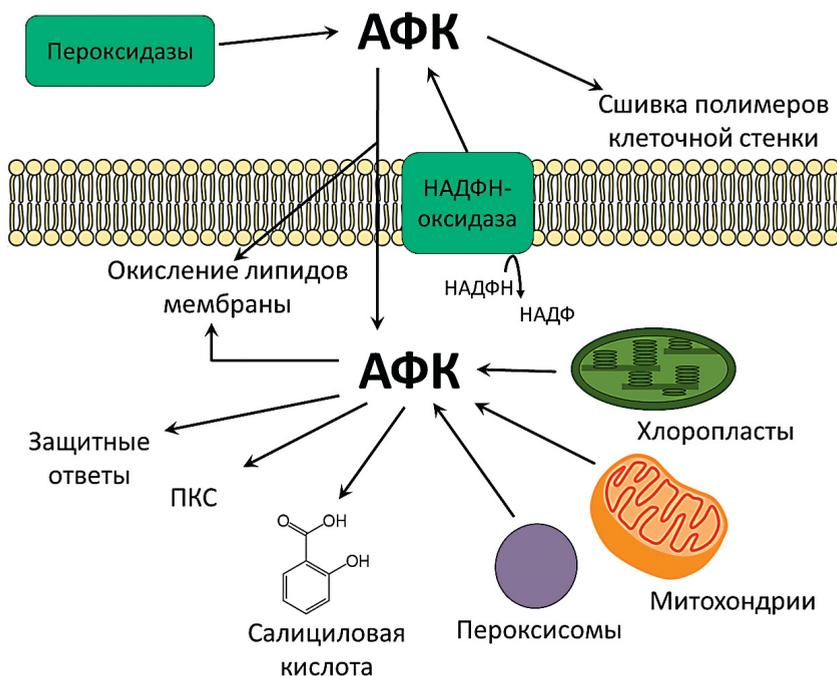


Рис. 5.3.2. Источники и мишени АФК при растительно-микробных взаимодействиях. ПКС — программируемая клеточная смерть.

АФК служат регуляторами и непосредственными участниками процессов программируемой клеточной смерти (ПКС), которые принято разделять на три основных типа: 1) ПКС по принципу аутофагии; 2) апоптозоподобная ПКС и 3) реакция гиперчувствительности (РГЧ). Аутофагия — это процесс «самопереваривания», который необходим для детоксикации вредных веществ и разрушения поврежденных органоидов в клетке; при развитии предельной формы аутофагии клетка «переваривает» саму себя полностью. Ключевые роли в этих процессах играют АТG-белки (autophagosome-related proteins) и вакуоль. АТG-белки отвечают за образование особых клеточных структур — аутофагосом, осуществляющих «захват» компонентов цитоплазмы. В дальнейшем эти структуры сливаются с вакуолью, где и происходит расщепление содержимого аутофагосом (Pérez-Pérez et al., 2012; Рябовол, Минибаева, 2016).

Апоптозоподобная гибель растительных клеток названа по аналогии с истинным апоптозом клеток животных. Действительно, у этих форм клеточной смерти есть некоторые сходные характеристики: ключевая роль митохондрий в их реализации, конденсация протопласта, фрагментирование хромосом, деградация клеточного содержимого при участии специфических протеаз — каспаз (в случае растений — метакаспаз, фитоспаз или каспазоподобных ферментов), а также генерация АФК при участии цитохрома С, который высвобождается из мембран митохондрий. В то же время апоптоз животных клеток значительно отличается от апоптозо-

подобной гибели клеток растений. В случае истинного апоптоза «останки» клеток утилизируются специальными клетками — фагоцитами, которых нет в растительном организме. Кроме того, полностью переварить свою клетку растительный организм не в состоянии: клеточная стенка сохраняется даже в случае полного уничтожения протопласта (Vanyushin et al., 2004).

ПКС по принципу аутофагии и апоптозоподобная ПКС — это нормальные физиологические реакции, которые протекают в ходе онтогенеза растения и отвечают за такие витальные для организма процессы, как образование ксилемы, зародыша, прорастание пыльцевой трубки, формирование листовой пластинки и многие другие (Reare, McCabe, 2010; Liu, Bassham, 2012). В то же время обе эти формы клеточной смерти рассматриваются и как процессы, повышающие устойчивость растений к фитопатогенам (Yao et al., 2002; Lai et al., 2011). Возможно, что эти формы ПКС могут приводить к «перевариванию» клеток патогена и/или формировать на пути микроорганизма «мертвую зону» с низким содержанием питательного субстрата. Однако этого пока продемонстрировано не было.

В отличие от аутофагии и апоптозоподобной ПКС, реакция гиперчувствительности развивается только при инвазии патогенного микроорганизма, но не в интактном растении. Это наиболее «быстрая» форма ПКС, которая характеризуется мощнейшим «окислительным взрывом», приводящим к формированию «мертвой зоны» вокруг патогена. Активация РГЧ происходит строго в месте инвазии патогена, что, как правило, приводит к его полной элиминации. Источниками АФК при РГЧ служат патоген-индуцируемые НАДФН-оксидазы, а также апопластные пероксидазы; то есть генерирование АФК при РГЧ происходит в апопласте. Однако АФК, производимые в митохондриях и хлоропластах, как оказалось, тоже вносят вклад в развитие РГЧ (Vidal et al., 2007; Zurbriggen et al., 2010). Подробно про механизмы активации РГЧ написано в разделе 6.2.

Таким образом, несмотря на то, что и образование активных форм кислорода, и программируемая клеточная смерть происходят и в отсутствие биотических стрессоров (за исключением реакции гиперчувствительности), интенсификация этих процессов при инвазии патогенов повышает устойчивость растений. При этом многообразии механизмов действия АФК позволяет растениям одновременно применять несколько оборонительных подходов для предотвращения системного развития инфекционного процесса.

Литература:

Креславский, В. Д., Лось, Д. А., Аллахвердиев, С. И., & Кузнецов, В. В. (2012). Сигнальная роль активных форм кислорода при стрессе у растений. *Физиология растений*, 59(2), 163–163.

Рябовол, В., & Минибаева, Ф. (2016). Молекулярные механизмы аутофагии в растениях: роль белка ATG8 в формировании и функционировании аутофагосом. *Биохимия*, 81(4), 487–505.

Bolwell, G. P., Bindschedler, L. V., Blee, K. A., Butt, V. S., Davies, D. R., Gardner, S. L., ... & Minibayeva, F. (2002). The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *Journal of Experimental Botany*, *53*(372), 1367–1376.

Bradley, D. J., Kjellbom, P., & Lamb, C. J. (1992). Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell*, *70*(1), 21–30.

Foyer, C. H., & Noctor, G. (2005). Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The Plant Cell*, *17*(7), 1866–1875.

Guo, M., Block, A., Bryan, C. D., Becker, D. F., & Alfano, J. R. (2012). *Pseudomonas syringae* catalases are collectively required for plant pathogenesis. *Journal of Bacteriology*, *194*(18), 5054–5064.

Lai, Z., Wang, F., Zheng, Z., Fan, B., & Chen, Z. (2011). A critical role of autophagy in plant resistance to necrotrophic fungal pathogens. *The Plant Journal*, *66*(6), 953–968.

Liu, Y., & Bassham, D. C. (2012). Autophagy: pathways for self-eating in plant cells. *Annual Review of Plant Biology*, *63*, 215–237.

Melotto, M., Zhang, L., Oblessuc, P. R., & He, S. Y. (2017). Stomatal defense a decade later. *Plant Physiology*, *174*(2), 561–571.

Pérez-Pérez, M. E., Lemaire, S. D., & Crespo, J. L. (2012). Reactive oxygen species and autophagy in plants and algae. *Plant Physiology*, *160*(1), 156–164.

Petrova, O., Gorshkov, V., Daminova, A., Ageeva, M., Moleleki, L. N., & Gogolev, Y. (2014). Stress response in *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 under starvation conditions: adaptive reactions at a low population density. *Research in Microbiology*, *165*(2), 119–127.

Pontier, D., Balagué, C., & Roby, D. (1998). The hypersensitive response. A programmed cell death associated with plant resistance. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series III-Sciences de la Vie*, *321*(9), 721–734.

Prost, I., Dhondt, S., Rothe, G., Vicente, J., Rodriguez, M. J., Kift, N., ... & Castresana, C. (2005). Evaluation of the antimicrobial activities of plant oxylipins supports their involvement in defense against pathogens. *Plant Physiology*, *139*(4), 1902–1913.

Reape, T. J., & McCabe, P. F. (2010). Apoptotic-like regulation of programmed cell death in plants. *Apoptosis*, *15*(3), 249–256.

Tondo, M. L., Delprato, M. L., Kraiselburd, I., Zenoff, M. V. F., Fariás, M. E., & Orellano, E. G. (2016). KatG, the bifunctional catalase of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, responds to hydrogen peroxide and contributes to epiphytic survival on citrus leaves. *PLoS ONE*, *11*(3), e0151657.

Torres, M. A., Jones, J. D., & Dangl, J. L. (2006). Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiology*, *141*(2), 373–378.

Tripathy, B. C., & Oelmüller, R. (2012). Reactive oxygen species generation and signaling in plants. *Plant Signaling & Behavior*, *7*(12), 1621–1633.

Vanyushin, B. F., Bakeeva, L. E., Zamyatnina, V. A., & Aleksandrushkina, N. I. (2004). Apoptosis in plants: specific features of plant apoptotic cells and effect of various factors and agents. *International Review of Cytology*, 233, 135–179.

Vidal, G., Ribas-Carbo, M., Garmier, M., Dubertret, G., Rasmusson, A. G., Mathieu, C., ... & De Paepe, R. (2007). Lack of respiratory chain complex I impairs alternative oxidase engagement and modulates redox signaling during elicitor-induced cell death in tobacco. *The Plant Cell*, 19(2), 640–655.

Yao, N., Imai, S., Tada, Y., Nakayashiki, H., Tosa, Y., Park, P., & Mayama, S. (2002). Apoptotic cell death is a common response to pathogen attack in oats. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15(10), 1000–1007.

Zurbriggen, M. D., Carrillo, N., & Hajirezaei, M. R. (2010). ROS signaling in the hypersensitive response: when, where and what for? *Plant Signaling & Behavior*, 5(4), 393–396.

5.4. PR-белки

Для угнетения патогенных микроорганизмов растения синтезируют целый набор защитных белков, которые называются PR-белки (pathogenesis-related). Эти белки разделяются на 17 разных групп (PR-1 — PR-17) в зависимости от их функций и/или структурных особенностей. Общим для этих белков является патоген-индуцируемая экспрессия кодирующих их генов, а также негативный эффект на патогенные организмы. Большинство PR-белков (хотя и не все) транспортируется в клеточную стенку растений, благодаря чему они способны напрямую действовать на клетки патогенов. Многие PR-белки участвуют в физиологических процессах, не относящихся к стрессовым ответам; при этом в противостоянии патогенной микрофлоре эти белки играют очень важную роль (Van Loon et al., 1994).

Одни из наиболее известных патоген-индуцируемых белков относятся к группе **PR-1**. Эти белки и кодирующие их гены часто используют как наиболее надежные маркеры инфекционного процесса (Datta, Muthukrishnan, 1999). PR-1-белки могут быть кислыми и щелочными, и их локализация в клетке зависит от этих свойств. Кислые PR-1-белки локализованы в апопласте, а щелочные — в вакуоли. Впервые PR-1-белки были охарактеризованы на примере растений табака, инфицированных вирусом табачной мозаики (Alexander et al., 1993). Сверхэкспрессия генов, кодирующих белки этого семейства, приводит к повышению устойчивости растений к фитопатогенным бактериям (Shin et al., 2014). Несмотря на широкую известность PR-1-белков, принцип их действия как факторов устойчивости остается загадкой. Недавно было обнаружено, что они способны связываться с молекулами стерина (эргостерин грибов, стигмастерин растений, холестерин) (Choudhary, Schreiber, 2012); однако, как эта способность связана с их защитными свойствами, не выяснено. Кроме того, у PR-1-белков был обнаружен киназоподобный домен, что, вероятно, предполагает их участие в передаче сигнала при связывании со стеринами (Teixeira et al., 2013; Lu et al., 2017).

К белкам **PR-2** относятся β -1,3-глюканазы. Как и белки PR-1, PR-2-белки могут быть локализованы в апопласте (кислые) и в вакуоли (щелочные). Считается, что эти белки действуют в тандеме с хитиназами, гидролизуя полимеры клеточных оболочек патогенов. Продукция PR-2-белков увеличивается при фитопатогенезе (Kauffmann et al., 1987), а сверхэкспрессия кодирующих их генов повышает устойчивость растений к патогенам (Yoshikawa et al., 1993).

Эндохитиназы, гидролизующие β -1,4-гликозидные связи, которые соединяют остатки *N*-ацетилглюкозамина в молекулах хитина грибов и пептидогликана бактерий, представлены четырьмя группами PR-белков: **PR-3**, **PR-4**, **PR-8**, **PR-11**. Несмотря на то, что все эти белки относятся к хитиназам, их все же разделяют на разные семейства PR-белков. Критериями при этом служат принадлежность к тому или иному классу гликозил-гидролаз и/или структурные характеристики, такие как сходство аминокислотных последовательностей и положение хитин-связывающего домена (CBD) (Datta, Muthukrishnan, 1999). Защитное действие хитиназ связано с двумя основными последствиями их активности: во-первых, эти

ферменты разрушают оболочку патогенов, что может приводить к лизису клеток микроорганизмов; во-вторых, некоторые продукты каталитического действия хитиназ обладают сигнальной активностью, которая приводит к активации защитных систем растений. Продукция этих белков усиливается после инвазии патогенов (Van Loon, Antoniwi, 1982; Mettraux et al., 1988; Melchers et al., 1994).

Белки **PR-5**, имеющие функциональные цистеин-насыщенные домены, называют перматинами, или тауматин-подобными белками. Они объединены в отдельную группу по структурным характеристикам. Эти белки обладают мембранотропным действием: они связываются с мембранами, в том числе ионными каналами, и изменяют их проницаемость, приводя к лизису клеток патогена. Индукция экспрессии генов PR-5 происходит при инфекции (Van Loon, Antoniwi, 1982), а продукты этих генов обладают сильным антипатогенным действием (Roberts, Selitrennikoff, 1990).

К мембранотропным относятся также белки **PR-12** (дефензины) и **PR-13** (тионины). Эти белки имеют небольшую молекулярную массу (около 5 кДа). Дефензины связываются со сфинголипидами и блокируют ионные каналы мембран, а тионины взаимодействуют с фосфолипидами. Оба типа белков, влияя на проницаемость мембран, вызывают лизис клеток патогена. Дефензины и тионины накапливаются в клетках растений при инфекции. Гетерологичная сверхэкспрессия генов PR-12 и PR-13 повышает устойчивость растений к фитопатогенам (Sels et al., 2008).

Белки **PR-6** — это ингибиторы сериновых и цистеиновых протеиназ патогенов (Sels et al., 2008). Многие паразиты секретируют протеолитические ферменты для разрушения белков растительной клеточной стенки, которые обладают структурной или сигнальной активностью, а также способностью вызывать агглютинацию бактериальных клеток (Dow et al., 1998; Marits et al., 1999). Растения, в свою очередь, продуцируя PR-6-белки, способны инактивировать эти ферменты патогенов, что является важным критерием устойчивости макроорганизма. Уровень экспрессии генов, кодирующих ингибиторы протеиназ, увеличивается после проникновения в тело растения патогенного организма (Sels et al., 2008), а симптомы заболевания при инфекции у сверхпродуцентов PR-6-белков выражены значительно слабее, чем у растений дикого типа (Christeller, Laing, 2005).

Необходимо отметить, что растения производят ингибиторы не только протеиназ паразитов, но и других ферментов микроорганизмов, в том числе гликозилгидролаз, разрушающих полисахариды клеточной стенки. Такие ингибиторы являются важными факторами устойчивости растения: сверхэкспрессия в растениях генов ингибиторов полигалактуроназ подавляет развитие патологического процесса (De Lorenzo et al., 2001). Некоторые патогены, в свою очередь, в ходе эволюции модифицировали структуру ферментов, деполимеризующих полисахариды, что привело к неэффективности действия на них ингибиторов растительного происхождения. Таким образом, взаимодействие деполимераз патогенов и соответствующих им ингибиторов растений можно рассматривать как своего рода «гонку вооружения» макро- и микроорганизмов (Juge, 2006).

К группе **PR-7**-белков относятся цистеин-обогащенные эндопротеиназы, называемые также субтилизин-подобными. Эти ферменты являются внутриклеточными и локализируются либо в цитоплазме, либо хлоропластах. Предполагают, что роль этих ферментов в защитном ответе заключается в участии в программируемой клеточной смерти — процессе, который часто вызывает элиминацию патогенного организма в теле хозяина. Продукция PR-7-белков увеличивается при взаимодействии растений с патогенами, что сопряжено с повышением устойчивости хозяев (Vera, Conejero, 1988).

Белки **PR-9** представляют собой пероксидазы, которые, в частности, окисляют ароматические соединения в растительной клеточной стенке (Datta, Muthukrishnan, 1999). Это, в свою очередь, приводит к сшивке отдельных полимеров и увеличению барьерных свойств клеточных стенок (Albersheim et al., 2010). В устойчивых растениях пероксидазы PR-9 интенсивно синтезируются в области инвазии фитопатогенных псевдомонад (*Pseudomonas syringae*), что приводит к уплотнению клеточных стенок; у восприимчивых растений подобные уплотнения не образуются (Datta, Muthukrishnan, 1999).

PR-10-белки, называемые также как RIP (ribosome inactivating protein), являются РНКазами. Сверхэкспрессия генов PR-10 повышает устойчивость растений к патогенным организмам. Предполагают, что эти белки, как и PR-7-белки, принимают участие в программируемой смерти растительных клеток (Liu, Ekramoddoullah, 2006). Вероятно также, что PR-10-белки являются факторами защиты от вирусов. В то же время был продемонстрирован и прямой антимикробный эффект PR-10-белков в системах *in vitro*, связанный с репрессией процессов трансляции в клетках патогенов (Datta, Muthukrishnan, 1999); однако принцип действия PR-10-белков в этом случае остается пока не понятным.

К **PR-14**-белкам относятся неспецифические липид-переносящие белки (lipid transfer proteins, LTP). Эти мембраносвязанные белки переносят различные гидрофобные соединения за пределы плазмалеммы; в частности, предполагается их участие в отложении кутина и других гидрофобных компонентов в растительной клеточной стенке. Важность этих белков как факторов устойчивости растений к фитопатогенным бактериям была продемонстрирована в экспериментах со сверхэкспрессией кодирующих их генов (Sels et al., 2008).

PR-15-белки, или гермин-подобные белки, проявляют оксидазную активность *in vitro*. *In vivo* эти белки образуют гексамерные ассоциаты молекулярной массой более 100 кДа. PR-15-белки являются прооксидантами и ответственны за образование активных форм кислорода при инфекционном процессе. Это, в свою очередь, может как оказывать прямой антипатогенный эффект, так и способствовать укреплению растительных клеточных стенок. Экспрессия PR-15-генов активируется при инфекции, что выражается накоплением перекиси водорода и формированием устойчивости (Zhang et al., 1995).

Белки **PR-16**, так же как и PR-15, имеют сходство в структуре с оксидазными, однако оксидазная активность этих белков *in vitro* не выявлена. Интенсификация продукции PR-16-белков повышает устойчивость растений к фито-

патогенам. Накопление этих белков при инфекции происходит в месте инвазии патогенов и приурочено к формированию папилл («заплаток» в растительной клеточной стенке, преимущественно состоящих из каллозы) (Wei et al., 1998).

Группа **PR-17** объединяет разнообразные по структуре и предполагаемым функциям белки. Фактически эта группа включает PR-белки, не вошедшие в первые шестнадцать групп. Гены, кодирующие PR-17-белки, схожи по нуклеотидным последовательностям с генами пероксидаз, глюканиз и пептидаз растений. Важность этих белков в индукции устойчивости была продемонстрирована при помощи вирус-индуцируемого сайленсинга генов, а также их сверхэкспрессии (Zhang et al., 2012).

Таким образом, формирование устойчивости у растений сопряжено с активацией биосинтеза большого набора белков, обладающих антипатогенным эффектом, — PR-белков. Эти белки относятся к разнообразным функциональным группам, что, по-видимому, обеспечивает разностороннюю защиту растений от паразитических организмов.

Литература:

Albersheim P., Darvill A., Roberts K., Sederoff R., & Staehelin A. (2010). Plant cell walls. From Chemistry to Biology. New York: Garland Science, 227–272.

Alexander, D., Goodman, R. M., Gut-Rella, M., Glascock, C., Weymann, K., Friedrich, L., Maddox, D., Ahl-Goy, P., Luntz, T., & Ward, E. (1993). Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(15), 7327–7331.

Choudhary, V., & Schneider, R. (2012). Pathogen-related yeast (PRY) proteins and members of the CAP superfamily are secreted sterol-binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(42), 16882–16887.

Christeller, J., & Laing, W. (2005). Plant serine proteinase inhibitors. *Protein and Peptide Letters*, 12(5), 439–447.

Datta, S. K., & Muthukrishnan, S. (Eds.). (1999). Pathogenesis-related proteins in plants. CRC press.

De Lorenzo, G., D'Ovidio, R., & Cervone, F. (2001). The role of polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) in defense against pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 39(1), 313–335.

Dow, J. M., Davies, H. A., & Daniels, M. J. (1998). A metalloprotease from *Xanthomonas campestris* that specifically degrades proline/hydroxyproline-rich glycoproteins of the plant extracellular matrix. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11(11), 1085–1093.

Juge, N. (2006). Plant protein inhibitors of cell wall degrading enzymes. *Trends in Plant Science*, 11 (7), 359–367.

- Kauffmann, S., Legrand, M., Geoffroy, P., & Fritig, B. (1987). Biological function of 'pathogenesis-related' proteins: four PR proteins of tobacco have 1,3- β -glucanase activity. *The EMBO Journal*, 6(11), 3209–3212.
- Liu, J. J., & Ekramoddoullah, A. K. (2006). The family 10 of plant pathogenesis-related proteins: their structure, regulation, and function in response to biotic and abiotic stresses. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 68(1), 3–13.
- Lu, S., Faris, J. D., & Edwards, M. C. (2017). Molecular cloning and characterization of two novel genes from hexaploid wheat that encode double PR-1 domains coupled with a receptor-like protein kinase. *Molecular Genetics and Genomics*, 292(2), 435–452.
- Marits, R., Kõiv, V., Laasik, E., & Mäe, A. (1999). Isolation of an extracellular protease gene of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* strain SCC3193 by transposon mutagenesis and the role of protease in phytopathogenicity. *Microbiology*, 145(8), 1959–1966.
- Melchers, L. S., Groot, M. A. D., Knaap, J. A., Ponstein, A. S., Sela-Buurlage, M. B., Bol, J. F., Cornelissen, B. J. C., Van Den Elzen, P. J. M., & Linthorst, H. J. (1994). A new class of tobacco chitinases homologous to bacterial exo-chitinases displays antifungal activity. *The Plant Journal*, 5(4), 469–480.
- Metraux, J. P., Streit, L., & Staub, T. H. (1988). A pathogenesis-related protein in cucumber is a chitinase. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 33(1), 1–9.
- Roberts, W. K., & Selitrennikoff, C. P. (1990). Zeamatin, an antifungal protein from maize with membrane-permeabilizing activity. *Microbiology*, 136(9), 1771–1778.
- Sels, J., Mathys, J., De Coninck, B. M., Cammue, B. P., & De Bolle, M. F. (2008). Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(11), 941–950.
- Shin, S. H., Pak, J. H., Kim, M. J., Kim, H. J., Oh, J. S., Choi, H. K., Jung, H. W., & Chung, Y. S. (2014). An acidic pathogenesis-related1 gene of *Oryza grandiglumis* is involved in disease resistance response against bacterial infection. *The Plant Pathology Journal*, 30(2), 208.
- Teixeira, P. J. P. L., Costa, G. G. L., Fiorin, G. L., Pereira, G. A. G., & Mondego, J. M. C. (2013). Novel receptor-like kinases in cacao contain PR-1 extracellular domains. *Molecular Plant Pathology*, 14(6), 602–609.
- Van Loon, L. C., & Antoniw, J. F. (1982). Comparison of the effects of salicylic acid and ethephon with virus-induced hypersensitivity and acquired resistance in tobacco. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 88(6), 237–256.
- Van Loon, L. C., Pierpoint, W. S., Boller, T. H., & Conejero, V. (1994). Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology Reporter*, 12(3), 245–264.
- Vera, P., & Conejero, V. (1988). Pathogenesis-related proteins of tomato P-69 as an alkaline endoproteinase. *Plant Physiology*, 87(1), 58–63.
- Wei, Y., Zhang, Z., Andersen, C. H., Schmelzer, E., Gregersen, P. L., Collinge, D. B., Smedegaard-Petersen, V., & Thordal-Christensen, H. (1998). An epidermis/papilla-specific oxalate oxidase-like protein in the defence response of barley attacked by the powdery mildew fungus. *Plant Molecular Biology*, 36(1), 101–112.

Yoshikawa, M., Tsuda, M., & Takeuchi, Y. (1993). Resistance to fungal diseases in transgenic tobacco plants expressing the phytoalexin elicitor-releasing factor, β -1,3-endoglucanase, from soybean. *Naturwissenschaften*, 80(9), 417–420.

Zhang, Z., Collinge, D. B., & Thordal-Christensen, H. (1995). Germin-like oxalate oxidase, a H₂O₂-producing enzyme, accumulates in barley attacked by the powdery mildew fungus. *The Plant Journal*, 8(1), 139–145.

Zhang, W. J., Pedersen, C., Kwaaitaal, M., Gregersen, P. L., Mørch, S. M., Hanisch, S., Kristensen, A., Fuglsang, A. T., Collinge, D. B., & Thordal-Christensen, H. (2012). Interaction of barley powdery mildew effector candidate CSEP0055 with the defence protein PR17c. *Molecular Plant Pathology*, 13(9), 1110–1119.

5.5. Репрессоры «чувства кворума» (кворум квенчинг, quorum quenching)

Стратегия обороны растений, как было описано в четырех предыдущих главах, включает два основных подхода: продукцию токсичных для бактерий соединений и усиление барьерных свойств клеточных стенок. В дополнение к этому растения способны препятствовать развитию патогена в своем теле посредством «информационной дезориентации» микроорганизма. Поскольку для проявления вирулентности бактериям необходимо обмениваться друг с другом информационными сигналами чувства кворума (см. главу 4.1), эта система представляет собой рациональную мишень, правильное воздействие на которую может подавить агрессивное поведение патогена. Подавление работы системы кворума одного организма другим — достаточно широко описанное явление, которое называется «кворум квенчинг» (quorum quenching; от англ. quenching — «гашение») (Kalia, 2015; Vacha et al., 2016; El-Hamid, 2016). Растения тоже способны репрессировать работу этой бактериальной системы с использованием двух основных подходов.

Один из таких подходов связан с продукцией растениями соединений, которые интерферируют с сигнальными медиаторами систем кворума и репрессировать работу этих систем. Такая интерференция, продемонстрированная на примере ацил-гомосеринлактон-(АГЛ)-зависимых систем кворума, была названа АГЛ-мимикрией (Teplitski et al., 2000). Репрессия системы кворума АГЛ-мимикрирующими соединениями достигается благодаря их связыванию с АГЛ-сенсорными белками, что приводит к блокировке их регуляторных функций. Первыми из идентифицированных АГЛ-мимикрирующих соединений были галогенированные бромсодержащие фураноны (рис. 5.5.1), продуцируемые красной морской водорослью *Delisea pulchra* (Givskov et al., 1996; Manefield et al., 2002). Причем показано, что эти соединения способны репрессировать разные системы кворума: опосредуемые АГЛ и аутоиндукторами второго типа (АИ-2) (Pérez-Montaño et al., 2013). Фураноны, инактивируя АГЛ-сенсорные белки, репрессировать кворум-зависимые признаки, не влияя при этом на ростовые характеристики бактериальных культур.

Среди хорошо известных блокаторов бактериального кворума известны также соединения, которые при определенных концентрациях проявляют бактерицидную или бактериостатическую активность, то есть влияют на рост бактерий, однако в концентрациях ниже рост-ингибирующих эти соединения являются репрессорами систем кворума. К таким соединениям относятся ахоен (Овчинников, 1987; Jakobsen et al., 2012a) (рис. 5.5.1) — фитоантиципин, содержащийся в луке, и салициловая кислота (Yedidia, неопубликованные данные).

К обнаруженным репрессорам систем кворума относится достаточно большая группа разных по структуре соединений, принадлежащих в том числе к моно- и полифенолам, серосодержащим соединениям и терпеноидам (табл. 5.5.1). Для некоторых из них описаны принципы кворум-ингибирующего действия. Так,

иберин и патулин инактивируют АГЛ-сенсорные белки (Helman, Chernin, 2015), а карвакрол подавляет экспрессию гена АГЛ-синтазы (Burt et al., 2014).

Необходимо отметить, что кворум-ингибирующее действие растительных метаболитов в основном тестируется на патогенных для человека бактериях, а не на фитопатогенах (Kalia, 2013). Это связано с тем, что выявление таких соединений нацелено в первую очередь на решение задач медицины: поиск природных соединений, способных увеличить эффективность антибактериальных препаратов. Однако, учитывая то, что принцип организации системы кворума у патогенов животных и патогенов растений сходный, логично предположить, что производство этих соединений растениями нацелено, по крайней мере отчасти, на противостояние фитопатогенной микрофлоре. Это подтверждается, например, негативным влиянием галогенированных фуранонов на кворум-зависимые процессы (продукция экстраклеточных ферментов и антибиотика карбапенема) в клетках фитопатогена *Pectobacterium carotovorum* (*Erwinia carotovora*) (Manefield et al., 2001). Для фенольных соединений (карвакрол, эвгенол и салициловая кислота) было продемонстрировано кворум-ингибирующее действие на примере *P. carotovorum*. Эти соединения репрессируют синтез АГЛ и кворум-зависимые признаки, связываясь как с АГЛ-синтазами, так и с АГЛ-сенсорами, блокируя их работу (Joshi et al., 2015; Joshi et al., 2016; Yedidia, неопубликованные данные). Кроме того, описан целый ряд фракций (экстрактов) растений (но не конкретных соединений), которые подавляют кворум-зависимые факторы вирулентности фитопатогенных пектобактерий. Среди этих фракций — метанольные или этанольные экстракты растений эстрагона (*Artemisia dracunculus*), алтея лекарственного (*Althaea officinalis*), редиса (*Raphanus sativus*) и шлемника байкальского (*Scutellaria baicalensis*) (Mahmoudi et al., 2014). Однако ни структура действующих соединений в этих фракциях, ни механизмы их действия пока не были расшифрованы.

Еще одна стратегия, применяемая растениями для борьбы с микробным кворумом, связана с привлечением в ризосферу таких микроорганизмов (в частности, представителей рода *Bacillus* и *Rhodococcus*), которые способны разрушать медиаторы этой сигнальной системы. Эти микроорганизмы используют для межклеточной коммуникации отличные от АГЛ соединения и синтезируют ферменты ацилазы и лактоназы, которые гидролизуют АГЛ (Kalia, 2015; Helman, Chernin, 2015). АГЛ-лактоназы катализируют расщепление лактонового кольца АГЛ, тогда как АГЛ-ацилазы разрушают амидную связь между остатком жирной кислоты и лактоновым кольцом (Dong et al., 2000; Lin et al., 2003). Эффективность использования микроорганизмов, разрушающих АГЛ, для снижения вирулентности фитопатогенных бактерий была продемонстрирована на примере пектобактерий — возбудителей мокрых гнилей растений. Было показано, что бактерии, которые продуцируют АГЛ-разрушающие ферменты, сдерживают развитие гнилостных процессов у инфицированных пектобактериями растений (Molina et al., 2003).

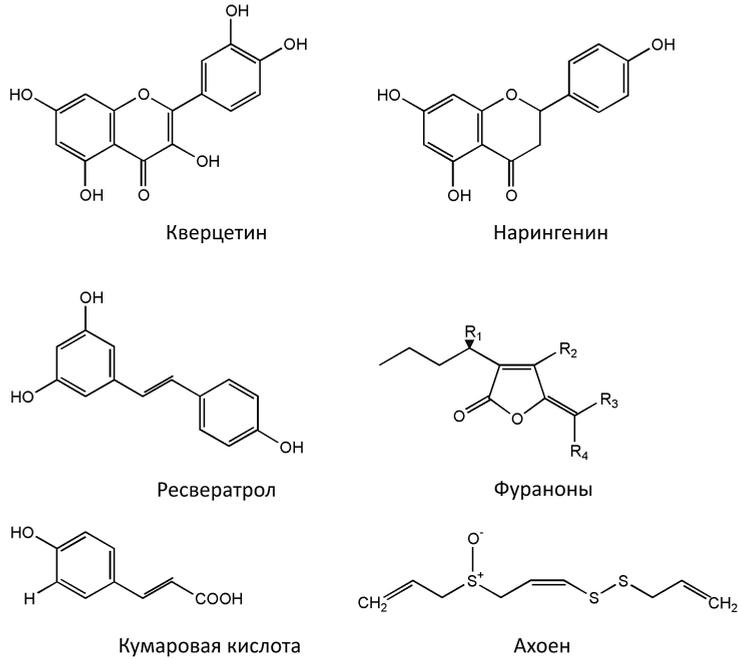


Рис. 5.5.1. Структурные формулы некоторых растительных метаболитов, репрессирующих бактериальные системы кворум сенсинга.

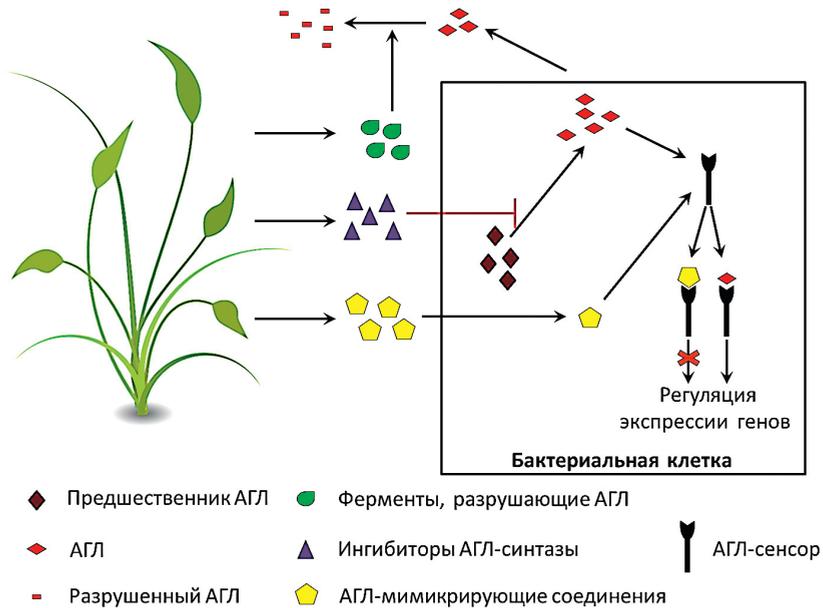


Рис. 5.5.2. Разные способы подавления бактериальных систем кворум сенсинга растением-хозяином (по: Viswanathan et al., 2015).

Таблица 5.5.1.

Растительные метаболиты, репрессирующие бактериальные системы кворума.

Растение	Соединение	Ссылка
Красная морская водоросль (<i>Delisea pulchra</i>)	Галогенированные фураноны	Givskov et al., 1996; Manefield et al., 2002
Чеснок (<i>Allium sativum</i>)	Ахоен	Bjarnsholt et al., 2005; Rasmussen et al., 2005; Jakobsen et al., 2012a
	<i>p</i> -кумаровая кислота	Schaeffer et al., 2008; Bodini et al., 2009
Хрен (<i>Armoracia rusticana</i>)	Иберин изотиоцианат	Jakobsen et al., 2012b
Брокколи (<i>Brassica oleracea</i>)	Изотиоцианаты сульфорафана и их предшественник эруцин, аналоги иберина	Ganin et al., 2013
Осока малорослая (<i>Carex pumila</i>)	Ресвератрол, димер ϵ -виниферин	Cho et al., 2013
Цитрус (<i>Citrus spp.</i>)	Нарингенин, неогесперидин, гесперидин	Vikram et al., 2010; Truchado et al., 2012
Грейпфрут (<i>Citrus paradisi</i>)	Фуранокумарин, окисленный тритерпеноид обакунон	Girenavar et al., 2008; Vikram et al., 2010
Куркума длинная (<i>Curcuma longa</i>)	Куркумин	Rudrappa, Bais, 2008
Кардамон настоящий (<i>Elettaria cardamomun</i>)	Цинеол	Jaramillo-Colorado et al., 2012
Яблоня, груша, персик, банан, ананас, виноград	Патулин	Rasmussen et al., 2005
Липпия белая (<i>Lippia alba</i>)	Лимонен, карвон и цитраль	Jaramillo-Colorado et al., 2012
Люцерна посевная (<i>Medicago sativa</i>)	L-канаванин	Keshavan et al., 2005
Мунья (<i>Minthostachys mollis</i>)	Пулегон	Jaramillo-Colorado et al., 2012
Мускатный орех (<i>Myristica cinnamomea</i>)	Малабарикон С	Chong et al., 2011
Базилик душистый (<i>Ocimum basilicum</i>)	Розмариновая кислота	Walker et al., 2004
Окотея (<i>Ocotea sp.</i>)	α -пинен	Jaramillo-Colorado et al., 2012
Душица обыкновенная (<i>Origanum vulgare</i>)	Карвакрол	Burt et al., 2014
Гуава (<i>Psidium guajava</i>)	Кверцетин, кверцетин-3- <i>O</i> -арабинозид	Vasavi et al., 2014
Свинглейя клейкая (<i>Swinglea glutinosa</i>)	β -пинен	Jaramillo-Colorado et al., 2012
Имбирь (<i>Zingiber officinale</i>)	α -zingiberен	Jaramillo-Colorado et al., 2012
Разные растения	Карвакрол, эвгенол, салициловая кислота	Joshi et al., 2016; Yedidia, неопубликованные данные

Эффективность АГЛ-разрушающих ферментов для подавления вирулентности фитопатогенных бактерий была также продемонстрирована с помощью гетерологичной экспрессии кодирующих их генов в растениях (Dong et al., 2000; Molina et al., 2003; Van et al., 2009). Растения, производящие эти ферменты, оказывались устойчивыми к патогенам. Такой биотехнологический прием однозначно подтвердил, что система кворума представляет собой эффективную мишень для целенаправленного снижения вирулентности фитопатогенных микроорганизмов.

Помимо использования АГЛ-разрушающих ферментов ризосферных микроорганизмов для борьбы с фитопатогенами, растения сами производят ферменты, катализирующие расщепление бактериальных АГЛ. Экспериментально продемонстрировано, что у резуховидки гидролаза амидов жирных кислот *AtFAAH* способна разрушать АГЛ (Palmer et al., 2014). Однако, является ли этот фермент фактором устойчивости растений к фитопатогенным бактериям, пока не выяснено.

Таким образом, растения способны устраивать своего рода «информационную блокаду» фитопатогенным бактериям, репрессировав работу системы кворума — одного из ключевых регуляторов продукции факторов вирулентности. Для такой блокады растения могут использовать разные стратегии: производить АГЛ-мимикрирующие соединения, блокирующие рецепторы АГЛ, угнетать процесс биосинтеза медиаторов систем кворума, способствовать разрушению АГЛ ризосферными микроорганизмами, а также, возможно, своими собственными ферментами (рис. 5.5.2).

Литература:

- Овчинников, Ю. А. (1987). Биоорганическая химия. Москва. Изд-во Просвещение.
- Bacha, K., Tariku, Y., Gebreyesus, F., Zerihun, S., Mohammed, A., Weiland-Bräuer, N., ... & Mulat, M. (2016). Antimicrobial and anti-quorum sensing activities of selected medicinal plants of Ethiopia: Implication for development of potent antimicrobial agents. *BMC Microbiology*, 16(1), 139.
- Ban, H., Chai, X., Lin, Y., Zhou, Y., Peng, D., Zhou, Y., ... & Sun, M. (2009). Transgenic *Amorphophallus konjac* expressing synthesized acyl-homoserine lactonase (*aihA*) gene exhibit enhanced resistance to soft rot disease. *Plant Cell Reports*, 28(12), 1847–1855.
- Bjarnsholt, T., Jensen, P. Ø., Rasmussen, T. B., Christophersen, L., Calum, H., Hentzer, M., ... & Høiby, N. (2005). Garlic blocks quorum sensing and promotes rapid clearing of pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Microbiology*, 151(12), 3873–3880.
- Bodini, S. F., Manfredini, S., Epp, M., Valentini, S., & Santori, F. (2009). Quorum sensing inhibition activity of garlic extract and p-coumaric acid. *Letters in Applied Microbiology*, 49(5), 551–555.
- Burt, S. A., Ojo-Fakunle, V. T., Woertman, J., & Veldhuizen, E. J. (2014). The natural antimicrobial carvacrol inhibits quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* and reduces bacterial biofilm formation at sub-lethal concentrations. *PLoS ONE*, 9(4), e93414.

Cho, H. S., Lee, J. H., Ryu, S. Y., Joo, S. W., Cho, M. H., & Lee, J. (2013). Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* O157: H7 biofilm formation by plant metabolite *ε*-viniferin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(29), 7120–7126.

Chong, Y. M., Yin, W. F., Ho, C. Y., Mustafa, M. R., Hadi, A. H. A., Awang, K., ... & Chan, K. G. (2011). Malabaricone C from *Myristica cinnamomea* exhibits anti-quorum sensing activity. *Journal of Natural Products*, 74(10), 2261–2264.

Dong, Y. H., Xu, J. L., Li, X. Z., & Zhang, L. H. (2000). AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(7), 3526–3531.

El-Hamid, M. I. A. (2016). A new promising target for plant extracts: Inhibition of bacterial quorum sensing. *Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 1(1).

Ganin, H., Rayo, J., Amara, N., Levy, N., Krief, P., & Meijler, M. M. (2013). Sulforaphane and erucin, natural isothiocyanates from broccoli, inhibit bacterial quorum sensing. *MedChemComm*, 4(1), 175–179.

Girenavar, B., Cepeda, M. L., Soni, K. A., Vikram, A., Jesudhasan, P., Jayaprakasha, G. K., ... & Patil, B. S. (2008). Grapefruit juice and its furocoumarins inhibits autoinducer signaling and biofilm formation in bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 125(2), 204–208.

Givskov, M., de Nys, R., Manefield, M., Gram, L., Maximilien, R. I. A., Eberl, L. E. O., ... & Kjelleberg, S. (1996). Eukaryotic interference with homoserine lactone-mediated prokaryotic signalling. *Journal of Bacteriology*, 178(22), 6618–6622.

Helman, Y., & Chermis, L. (2015). Silencing the mob: disrupting quorum sensing as a means to fight plant disease. *Molecular Plant Pathology*, 16(3), 316–329.

Jakobsen, T. H., van Gennip, M., Phipps, R. K., Shanmugham, M. S., Christensen, L. D., Alhede, M., ... & Jensen, P. O. (2012a). Ajoene, a sulfur-rich molecule from garlic, inhibits genes controlled by quorum sensing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(5), 2314–2325.

Jakobsen, T. H., Bragason, S. K., Phipps, R. K., Christensen, L. D., van Gennip, M., Alhede, M., ... & Givskov, M. (2012b). Food as a source for QS inhibitors: iberin from horseradish revealed as a quorum sensing inhibitor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(7), 2410–2421.

Jaramillo-Colorado, B., Olivero-Verbel, J., Stashenko, E. E., Wagner-Döbler, I., & Kunze, B. (2012). Anti-quorum sensing activity of essential oils from Colombian plants. *Natural Product Research*, 26(12), 1075–1086.

Joshi, J. R., Burdman, S., Lipsky, A., & Yedidia, I. (2015). Effects of plant antimicrobial phenolic compounds on virulence of the genus *Pectobacterium*. *Research in Microbiology*, 166(6), 535–545.

Joshi, J. R., Khazanov, N., Senderowitz, H., Burdman, S., Lipsky, A., & Yedidia, I. (2016). Plant phenolic volatiles inhibit quorum sensing in pectobacteria and reduce their virulence by potential binding to ExpI and ExpR proteins. *Scientific Reports*, 6, 38126.

Kalia, V. C. (2013). Quorum sensing inhibitors: an overview. *Biotechnology Advances*, 31(2), 224–245.

Kalia, V. C. (Ed.). (2015). Quorum sensing vs quorum quenching: a battle with no end in sight. India: Springer.

Keshavan, N. D., Chowdhary, P. K., Haines, D. C., & González, J. E. (2005). L-Canavanine made by *Medicago sativa* interferes with quorum sensing in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*, 187(24), 8427–8436.

Lin, Y. H., Xu, J. L., Hu, J., Wang, L. H., Ong, S. L., Leadbetter, J. R., & Zhang, L. H. (2003). Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. *Molecular Microbiology*, 47(3), 849–860.

Mahmoudi, E., Tarzaban, S., & Khodaygan, P. (2014). Dual behaviour of plants against bacterial quorum sensing: inhibition or excitation. *Journal of Plant Pathology*, 96(2), 295–301.

Manefield, M., Welch, M., Givskov, M., Salmond, G. P., & Kjelleberg, S. (2001). Halogenated furanones from the red alga, *Delisea pulchra*, inhibit carbapenem antibiotic synthesis and exoenzyme virulence factor production in the phytopathogen *Erwinia carotovora*. *FEMS Microbiology Letters*, 205(1), 131–138.

Manefield, M., Rasmussen, T. B., Hentzer, M., Andersen, J. B., Steinberg, P., Kjelleberg, S., & Givskov, M. (2002). Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover. *Microbiology*, 148(4), 1119–1127.

Molina, L., Constantinescu, F., Michel, L., Reimmann, C., Duffy, B., & Défago, G. (2003). Degradation of pathogen quorum-sensing molecules by soil bacteria: a preventive and curative biological control mechanism. *FEMS Microbiology Ecology*, 45(1), 71–81.

Palmer, A. G., Senechal, A. C., Mukherjee, A., Ané, J. M., & Blackwell, H. E. (2014). Plant responses to bacterial N-acyl L-homoserine lactones are dependent on enzymatic degradation to L-homoserine. *ACS Chemical Biology*, 9(8), 1834–1845.

Pérez-Montañó, F., Jiménez-Guerrero, I., Sánchez-Matamoros, R. C., López-Baena, F. J., Ollero, F. J., Rodríguez-Carvajal, M. A., ... & Espuny, M. R. (2013). Rice and bean AHL-mimic quorum-sensing signals specifically interfere with the capacity to form biofilms by plant-associated bacteria. *Research in Microbiology*, 164(7), 749–760.

Rasmussen, T. B., Bjarnsholt, T., Skindersoe, M. E., Hentzer, M., Kristoffersen, P., Kôte, M., ... & Givskov, M. (2005). Screening for quorum-sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector. *Journal of Bacteriology*, 187(5), 1799–1814.

Rudrappa, T., & Bais, H. P. (2008). Curcumin, a known phenolic from *Curcuma longa*, attenuates the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in whole plant and animal pathogenicity models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(6), 1955–1962.

Schaefer, A. L., Greenberg, E. P., Oliver, C. M., Oda, Y., Huang, J. J., Bittan-Banin, G., ... & Harwood, C. S. (2008). A new class of homoserine lactone quorum-sensing signals. *Nature*, 454(7204), 595–599.

Teplitski, M., Robinson, J. B., & Bauer, W. D. (2000). Plants secrete substances that mimic bacterial N-acyl homoserine lactone signal activities and affect population density-dependent behaviors in associated bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13(6), 637–648.

Truchado, P., Giménez-Bastida, J. A., Larrosa, M., Castro-Ibáñez, I., Espín, J. C., Tomás-Barberán, F. A., ... & Allende, A. (2012). Inhibition of quorum sensing (QS) in *Yersinia enterocolitica* by an orange extract rich in glycosylated flavanones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(36), 8885–8894.

Vasavi, H. S., Arun, A. B., & Rekha, P. D. (2014). Anti-quorum sensing activity of *Psidium guajava* L. flavonoids against *Chromobacterium violaceum* and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology and Immunology*, 58(5), 286–293.

Vikram, A., Jayaprakasha, G. K., Jesudhasan, P. R., Pillai, S. D., & Patil, B. S. (2010). Suppression of bacterial cell-cell signalling, biofilm formation and type III secretion system by citrus flavonoids. *Journal of Applied Microbiology*, 109(2), 515–527.

Viswanathan, P., Rathinam, P., & Suneeva, S. C. (2015). Plant quorum sensing inhibitors: food, medicinal plants, and others. In: *Quorum Sensing vs Quorum Quenching: a Battle with No End in Sight*. Springer India, 269–281.

Walker, T. S., Bais, H. P., Déziel, E., Schweizer, H. P., Rahme, L. G., Fall, R., & Vivanco, J. M. (2004). *Pseudomonas aeruginosa*-plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formation, and root exudation. *Plant Physiology*, 134(1), 320–331.

Глава 6

РЕГУЛЯЦИЯ ИНДУЦИРУЕМОГО ФИТОИММУНИТЕТА

В отличие от животных организмов, у растений нет гуморального иммунитета и специализированных иммунных клеток для противостояния патогенной микрофлоре (Staskawicz et al., 2001). Тем не менее растения способны защищать себя от фитопатогенов благодаря конститутивным и индуцируемым факторам устойчивости, о которых было сказано выше (главы 5.1–5.5). К конститутивным факторам относятся, например, барьерные структуры растительных клеток — клеточная стенка, в том числе кутикулярный слой на поверхности покровных тканей, а также конститутивно продуцируемые вторичные метаболиты (фитоантиципины, или фитонциды). Хотя конститутивная устойчивость способна препятствовать проникновению в растение большинства потенциальных патогенов, ряд микроорганизмов может преодолевать подобные преграды. Для борьбы с такими патогенами у растений выработались механизмы индуцируемого иммунитета, который активируется только при инвазии микроорганизма, что позволяет растениям экономить энергетические ресурсы на обеспечение роста и развития в отсутствие паразита (da Cunha et al., 2006).

Большинство клеток растительного организма способно генерировать защитные ответы. Ключевым этапом реализации иммунного ответа является способность растения распознавать сигналы опасности, которые активируют защитные системы. Такими сигналами, названными элиситорами, могут служить как метаболиты патогенов (экзогенные элиситоры), так и фрагменты (обломки) собственных полимеров, которые разрушаются под действием бактериальных ферментов (эндогенные элиситоры) (Тарчевский, 2002; Henry et al., 2013). Распознавание элиситоров осуществляется специальными рецепторными белками. В зависимости от элиситора, распознающего его рецептора, а также фенотипического проявления иммунного ответа, индуцируемую устойчивость разделяют на два основных типа: 1) количественная устойчивость (горизонтальная, ПАМП-индуцируемая) и 2) качественная устойчивость (вертикальная, эффектор-индуцируемая) (Zhang, Zhou, 2010; Henry et al., 2013).

6.1. Количественная (горизонтальная, ПАМП-индуцируемая) устойчивость

Количественная устойчивость, называемая также горизонтальной, ПАМП-индуцируемой или базовой, считается древним типом индуцируемой устойчивости (Chisholm et al., 2006; Jones, Dangl, 2006; Boller, Felix, 2009). Молекулярно-генетические детерминанты этой устойчивости характерны для всех клад семенных растений. В то же время системы, определяющие количественную устойчивость, нельзя рассматривать как эволюционно «ветхие» и неразвивающиеся. Во-первых, несмотря на древность, они действительно эффективны в борьбе

со многими патогенами. Во-вторых, отдельные элементы этих систем могут иметь различия у разных таксонов растений и присутствовать только у определенных семейств; и это, как предполагают, свидетельствует об относительно недавнем возникновении этих элементов, а также о продолжающихся метаморфозах систем горизонтальной устойчивости в процессе коэволюции патогенов и хозяев (Boller, Felix, 2009; Thomma et al., 2011).

Существует ряд характеристик (четыре), присущих количественной устойчивости. **Во-первых**, как следует из названия, признак такой устойчивости при ее индукции выражается количественно: то есть патологии могут либо проявляться в большей или меньшей степени, либо не развиваться вовсе, и растения могут быть как полностью, так и частично устойчивыми к фитопатогенному организму (Zhang, Zhou, 2010). **Во-вторых**, количественная устойчивость, по сравнению с качественной (о которой пойдет речь ниже), характеризуется меньшей специфичностью: количественная устойчивость индуцируется в ответ на широкий круг патогенных микроорганизмов (French et al., 2016).

В-третьих, индукторами количественной устойчивости являются определенные (две) группы метаболитов. Одна группа индукторов количественной устойчивости включает консервативные метаболиты патогенных организмов, которые принято обозначать как патоген-ассоциированный молекулярный паттерн (ПАМП), или микроорганизм-ассоциированный молекулярный паттерн (МАМП) (PAMP — pathogen-associated molecular pattern; MAMP — microbe-associated molecular pattern). Эти метаболиты, представляющие собой неспецифичные экзогенные элиситоры, не характерны для растений, но есть у всех или большинства патогенов, что как раз и определяет неспецифичность и универсальность количественной устойчивости. «Избавиться» от ПАМП в процессе эволюции патогены не способны, поскольку эти метаболиты являются витальными для жизни микроорганизмов в естественных условиях. Поэтому гены белков, задействованных в распознавании ПАМП и МАМП-индуцируемом иммунитете, надежно закрепились в геномах растений (Zipfel, Robatzek, 2010).

К МАМП относят такие метаболиты (или, точнее, их физиологически активные фрагменты), как флагеллин, липополисахариды, пептидогликан, хитин, бактериальный фактор элонгации EF-Tu. Согласно концепции количественной устойчивости, ПАМП включает универсальные индукторы иммунитета, то есть те, которые активируют защитный ответ у всех (или большинства) видов растений. Однако у этого правила могут быть исключения. Так, бактериальный фактор элонгации EF-Tu активирует количественную устойчивость только у представителей крестоцветных. По всей вероятности, это свидетельствует об эволюционной молодости EF-Tu-распознающей системы у растений (Kunze et al., 2004). К МАМП потенциально можно также отнести еще целый ряд метаболитов патогенов, таких как арахидоновая кислота, бактериальные белки теплового шока, ряд олигосахаридных фрагментов оболочки патогенов, сидерофоры, поскольку эти соединения вызывают у растений реакции, сходные с ПАМП-индуцируемым иммунным ответом. Однако для этих метаболитов, в отличие от истинных пред-

ставителей ПАМП, пока не идентифицированы рецепторы, осуществляющие их распознавание в растительных клетках (Kaufmann, 1990; Walley et al., 2013).

Ко второй группе индукторов количественной устойчивости относятся продукты распада растительных полимеров; некоторые из этих продуктов обладают свойствами эндогенных элиситоров, сигнализирующих растению о разрушении его тканей патогенным организмом. Такие элиситоры принято называть DAMP (damage-associated molecular pattern, молекулярный паттерн, ассоциированный с повреждением) (Boller, Felix, 2009). В качестве эндогенных элиситоров могут выступать некоторые олигосахариды (Darvill, Albersheim, 1984), мономеры кутина (Kauss et al., 1999), пептиды (Boller, 2005; Huffaker et al., 2006). Их образование и рецепция происходят в апопласте (в клеточной стенке) (Muthamilarasan, Prasad, 2013). Наиболее исследованными среди таких эндогенных элиситоров являются продукты разложения полисахаридов растительной клеточной стенки, которые называются олигосахаридами (физиологически активные олигосахариды) (см. главу 5.1). Но не все олигосахарины представляют собой эндогенные элиситоры; некоторые олигосахарины образуются в результате расщепления клеточных стенок бактерий и грибов и являются, таким образом, экзогенными элиситорами (Shibuya, Minami, 2001).

В-четвертых, характерная особенность количественной устойчивости заключается в типе рецепторных белков, задействованных в ее индукции, которые служат в качестве своеобразных «радаров», отслеживающих ПАМП или эндогенные элиситоры. К таким рецепторам относятся PRR-(pattern-recognition receptors)-белки, а также некоторые киназы, ассоциированные с растительной клеточной стенкой (wall-associated kinase, WAK). PRR-белки включают рецептор-подобные киназы (receptor-like kinases, RLKs) и рецептор-подобные белки (receptor-like proteins, RLPs) (Monaghan, Zipfel, 2012). Для обоих этих типов PRR-белков характерно наличие внеклеточного сенсорного домена, который воспринимает ПАМП или эндогенный элиситор, и домена, интегрированного в мембрану. Различие в RLK- и RLP-белках заключается в наличии у первых внутриклеточного сигнального (киназного) домена, передающего сигнал на следующее звено сигнальной цепи; у RLP-белков киназный домен отсутствует, и его функцию выполняют дополнительные вспомогательные киназы (Muthamilarasan, Prasad, 2013).

Среди многообразия PRR-белков (у резуховидки, например, согласно аннотации генома, их около 200) наиболее хорошо изученными являются четыре: FLS2, EFR, XA21, CERK1; первые два описаны у резуховидки, третий — у риса, а последний — у обоих растений (Monaghan, Zipfel, 2012). XA21 риса — это первый из идентифицированных PRR-белков. Он является рецептором бактериального пептида Ax21, секретируемого ксантомонадами (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) через систему секреции первого типа и служащего в качестве медиатора системы межклеточной коммуникации этих микроорганизмов (Lee et al., 2009; Han et al., 2011).

FLS2 (flagellin sensitive2) — это наиболее известный PRR-рецептор. Он стал своего рода модельным объектом при описании молекулярных механиз-

мов ПАМПИ-индуцируемого иммунитета (описано ниже). FLS2 является сенсором консервативных N-концевых олигомеров флагеллина (flg22), состоящих из 22 аминокислотных остатков (Felix et al., 1999). FLS2 — это белок, описанный у резуховидки; гомологи кодирующего его гена обнаружены у большинства исследованных видов растений. При этом FLS2-подобные белки разных растений могут различаться по специфичности к разным эпитомам флагеллина, то есть распознавать разные участки этого белка (Gómez-Gómez, Boller, 2000).

EFR (elongation factor Tu) — это рецептор бактериального фактора элонгации (точнее его N-концевого участка). Отличительной особенностью этого белка является его неконсервативность: до настоящего времени он обнаружен только у представителей крестоцветных; следовательно, фрагмент бактериального фактора элонгации является элиситором только для растений этого семейства (Zipfel et al., 2006).

Описанные CERK1-белки (chitin elicitor receptor kinase1) могут являться как непосредственными рецепторами хитина грибов, так и компонентами гетерогенного рецепторного комплекса для хитина, а также пептидогликана бактериальной оболочки. CERK1-белки исследованы на примере резуховидки (*AtCERK1*) и риса (*OsCERK1*) и имеют особенности в структурно-функциональных характеристиках. *AtCERK1* резуховидки, являющийся рецептором хитина, имеет экстраклеточный домен для связывания фрагментов хитина и внутриклеточный киназный домен, необходимый для передачи сигнала. Фрагменты хитина выполняют функцию «молекулярного клея», который способствует взаимодействию двух молекул *AtCERK1* с образованием гомодимера. В результате этого происходит фосфорилирование киназных доменов *AtCERK1*, что и является первым этапом передачи сигнала (Nayaafune et al., 2014) (рис. 6.1.1).

OsCERK1 риса не способен связывать хитин, но участвует в его рецепции, образуя комплекс со вспомогательным белком CEBiP, лигандом для которого является хитин. Образование комплекса хитин-CEBiP-*OsCERK1* способствует фосфорилированию сигнального домена *OsCERK1* и дальнейшей передаче сигнала. *OsCERK1* может также образовывать гетеродимеры с пептидогликан-связывающими белками *OsLYP4* и *OsLYP6* (lysine motif-containing receptor proteins), благодаря чему *OsCERK1* может участвовать в рецепции не только хитина, но и пептидогликана (Shimizu et al., 2010). *AtCERK1* резуховидки, помимо образования функциональных гомодимеров при участии хитина, также способен образовывать гетеродимеры с белками *AtLYM1* и *AtLYM3* (lysine motif), связывающими пептидогликан, и таким образом входит в состав гетерогенного рецепторного комплекса, распознающего этот элиситор (Macho, Zipfel, 2014).

Существуют примеры восприятия PRR-белками не только экзогенных (ПАМП), но и эндогенных элиситоров. Так, рецептор резуховидки PEP receptor 1 (PEPR1) распознает пептид Pep1, который представляет собой C-концевой участок растительного белка PROPEP1 (Krol et al., 2010). Рецепция наиболее изученных эндогенных олигосахаридов — олигоуронидов, индуцирующих фитоиммунитет, осуществляется киназами, ассоциированными с клеточными стенками.

Такие рецепторы содержат цитоплазматический домен серин/треониновых киназ, трансмембранный домен и экстраклеточную область, связанную с клеточной стенкой (Ferrari et al., 2013).

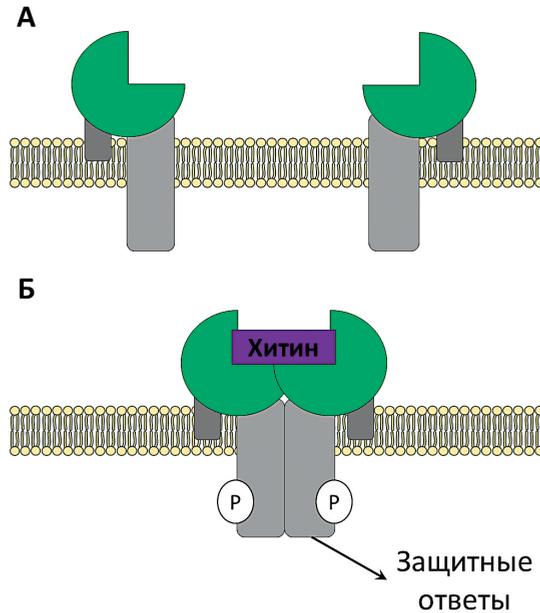


Рис. 6.1.1. Схема рецепции фрагментов хитина в клетках растений. Рецепторы хитина в отсутствие лиганда находятся в мономерной форме (А); фрагменты хитина приводят к димеризации рецепторных белков и фосфорилированию их киназных доменов (Б).

Передача сигнала опасности при активации количественной устойчивости

Большое разнообразие экзогенных (ПАМП) и эндогенных элиситоров, а также рецепторов, их распознающих, свидетельствует о сложнейшем устройстве системы, передающей сигналы опасности при активации количественной устойчивости. Несмотря на то, что глобальная картина ПАМП-индуцируемого сигналинга далека до понимания, отдельные звенья этой сложной регуляторной сети описаны.

Действие многих PRR-белков опосредовано особыми мембраносвязанными киназами, названными ВАК1 (brassinosteroid insensitive 1-associated kinase 1). ВАК1-киназа не связывает элиситоры, но может играть роль корецептора, взаимодействуя с активированными элиситорами PRR-белками. Это взаимодействие приводит к фосфорилированию обеих киназ (PRR-белка и ВАК1), а также еще одной цитоплазматической киназы ВІК1 (botrytis-induced kinase 1) (Lin et al., 2014) (рис. 6.1.2). Некоторые ПАМП-рецепторы и ПАМП-рецепторные комплексы не взаимодействуют с ВАК1, но ВІК1 при этом все равно является необходимым элементом для передачи сигнала. У растений с подавленной экспрессией

гена, кодирующего ВАК1-киназу, репрессированы защитные ответы, индуцируемые белком холодового шока и флагеллином, но не хитином, что указывает на ВАК1-независимую активацию хитин-индуцируемого иммунитета. В то же время ВІК1-мутанты не генерируют иммунные ответы при действии и флагеллина, и фактора элогации, и хитина (Kim et al., 2013).

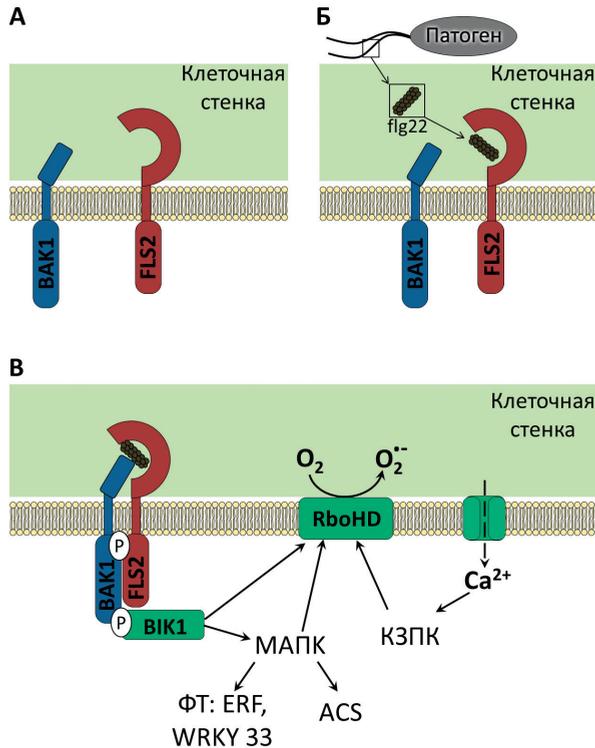


Рис. 6.1.2. Схема рецепции и передачи сигнала бактериального флагеллина в клетках растений. (А) — в отсутствие флагеллина рецепторный белок (FLS2) не взаимодействует с ВАК1-киназой. (Б) — при появлении флагеллина его физиологически активный фрагмент (flg22) связывается с FLS2, что приводит (В) к взаимодействию FLS2, ВАК1, а также ВІК1-киназы. В результате этого киназные домены этих белков фосфорилируются, что затем приводит к активации флагеллин-индуцируемых ответов: 1) вбросу Ca^{2+} в цитоплазму, что активирует кальций-зависимые протеинкиназы (КЗПК), которые, в частности, индуцируют генерирующую АФК НАДФН-оксидазу RboND; 2) индукции МАП-киназного каскада (МАПК), который, в свою очередь, активирует ферменты биосинтеза этилена (ACS), НАДФН-оксидазу RboND и факторы транскрипции (ФТ) ERF и WRKY33, контролирующие экспрессию защитных генов.

Следующим этапом в передаче ПАМП-сигнала является индукция МАП-киназного каскада с помощью активированного ВІК1 (рис. 6.1.2).

МАП-киназы (митоген-активируемые протеинкиназы) это серин/треониновые протеинкиназы, которые осуществляют передачу сигналов от сенсоров до ответных реакций (from sensors to responses). Геномы растений содержат очень большое количество (более сотни) генов, кодирующих МАП-киназы. Эти ферменты являются регуляторами очень многих (если не всех) физиологических процессов. Некоторые МАП-киназы опосредуют защитные ответы растений на биогенные стрессоры (МАПК3, МАПК4, МАПК6). МАП-киназный каскад при фитоиммунном ответе может активироваться при участии как ВК1 при распознавании ПАМП, так и киназами, ассоциированными с клеточными стенками (WAK), при восприятии эндогенных олигосахаридов (Taj et al., 2010; Ferrari et al., 2013).

Доказанными мишенями патоген-индуцируемых МАП-киназ при активации количественной устойчивости являются факторы регуляции транскрипции генов и ряд других белков (рис. 6.1.2). Среди МАП-активируемых факторов регуляции транскрипции известны белки семейства WRKY (WRKY33), имеющие специфическую аминокислотную последовательность WRKYGQK для распознавания нуклеотидных последовательностей (W-box, TTGACC/T) в промоторных областях определенных генов, многие из которых кодируют защитные белки. Кроме того, МАП-киназы при патогенезе активируют этилен-регулируемые факторы транскрипции ERF104 и ERF6, а также синтазы 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты (ACS2 и ACS6) — ферменты биосинтеза фитогормона этилена, который является важным регулятором иммунных ответов (Taj et al., 2010; Muthamilarasan, Prasad, 2013) (рис. 6.1.2).

Еще одними предполагаемыми участниками ПАМП-индуцируемого сигнала являются кальций-зависимые протеинкиназы (КЗПК) (рис. 6.1.2). Одним из ранних ответов на действие элиситоров является повышение уровня ионов кальция в цитоплазме, что приводит к разнообразным последствиям, в том числе и активации КЗПК (Zimmermann et al., 1997; Lecourieux et al., 2002; Lecourieux et al., 2006). О важной роли этих ферментов в фитоиммунитете свидетельствует то, что у мутантных растений по генам КЗПК, опосредующим ПАМП-индуцируемые ответы, снижается устойчивость к патогенам (Boudsocq et al., 2010; Dubiella et al., 2013). Информация о конкретной роли КЗПК в иммунном ответе пока достаточно скудна и отрывочна. Среди выявленных на сегодняшний день субстратов этих ферментов — НАДФН-оксидаза, ответственная за образование АФК при инфекции, а также фермент биосинтеза этилена (ACS2) (Boudsocq, Sheen, 2013).

Важной характеристикой систем индуцируемой устойчивости является способность не только активировать защитные системы в присутствии сигналов опасности, но и блокировать защитные ответы в отсутствие патогенного организма, а также после его элиминации. Это необходимо для экономии энергетических ресурсов в отсутствие влияния биогенного стрессора. Поэтому существуют системы для контроля (репрессии) передачи сигнала опасности в клетках растений. Такая репрессия может осуществляться по нескольким принципам.

Во-первых, поскольку ключевым этапом передачи сигнала является фосфорилирование, негативными регуляторами PRR-комплексов являются фосфатазы. Некоторые протеинфосфатазы ассоциированы с PRR-белками (KAPP фосфатаза ассоциирована с FLS2 резуховидки; XB15 фосфатаза — с XA21 риса) (Fuchs et al., 2013). Во-вторых, инактивация PRR-белков может осуществляться за счет фосфорилирования по определенным сайтам (Chen et al., 2010). В-третьих, существуют белки, которые в отсутствие элиситоров препятствуют взаимодействию PRR-рецепторов с ВАК1-киназами. Так, AtBIR2-киназа, взаимодействуя с ВАК1 в отсутствие флагеллина, препятствует его гетеродимеризации с FLS2; отключение AtBIR2 выражается гиперактивацией флагеллин-индуцируемых ответов растений (Halter et al., 2014). В-четвертых, существуют системы, ответственные за деградацию активированных PRR-белков. К таким системам относятся убиквитин-лигазная система (которая метит целевые белки для деградации в протеасомах) и система эндоцитоза. FLS2 может подвергаться и эндоцитозу, и полиубиквитинированию. Причем E3-убиквитин лигазы PUB12 и PUB13, «метящие» PRR-белки для дальнейшей деградации в протеасоме, активируются ВАК1 (Duplan, Rivas, 2014). Благодаря этому передача сигнала опасности регулируется по принципу отрицательной обратной связи, что предохраняет клетку от сверхдозы сигнала и терминирует процесс сигнализации после элиминации патогена (Böhm et al., 2014).

Представленная в этом разделе информация указывает на то, что система ПАМП-зависимой сигнализации устроена таким образом, чтобы обеспечить эффективную мобилизацию и своевременную демобилизацию защитных систем, что позволяет вовремя препятствовать инвазии патогенного организма, не приводя при этом к завышенным тратам энергетического ресурса.

Физиологические проявления количественной устойчивости

ПАМП-индуцируемый иммунитет может проявляться в виде целого ряда физиологических ответов, которые повышают устойчивость растений. В основном считается, что, несмотря на разнообразие индукторов количественной устойчивости и распознающих их рецепторов, разные ПАМП и эндогенные элиситоры активируют сходные защитные ответы у растений (Nicaise et al., 2009; Zipfel, Robatzek, 2010; Ranf et al., 2011). Так, например, с помощью транскриптомного анализа было продемонстрировано, что бактериальные флагеллин и пептидогликан активируют экспрессию около 1000 генов у резуховидки; при этом спектры флагеллин- и пептидогликан-индуцируемых генов растения значительно перекрываются (Gust et al., 2007; Rasmussen et al., 2013). В то же время показано, что физиологические эффекты (в том числе их интенсивность и амплитуда) разных ПАМП и эндогенных элиситоров могут в какой-то степени различаться (Vigier et al., 2015).

Одним из наиболее ранних ПАМП-индуцируемых ответов (30 секунд — 2 минуты) является защелачивание апопласта, связанное с изменением проницаемости ионных каналов. При этом происходит вброс в цитоплазму H^+ и Ca^{2+} и утечка K^+ , NO_3^- и Cl^- . Все это приводит к деполяризации мембраны, что, в частности,

стимулирует дополнительное поступление кальция в цитоплазму (Manzoor et al., 2012; Dubiella et al., 2013). Кальций при этом играет роль вторичного посредника (мессенджера), который координирует многие ПАМП-индуцируемые ответы, в том числе через активацию кальций-зависимых протеинкиназ (Ranf et al., 2011) (рис. 6.1.2). В индукции устойчивости кальцию часто отводят одну из ключевых ролей; блокировка кальциевых каналов препятствует активации фитоиммунных ответов (Bowler, Fluhr, 2000).

Один из эффектов кальция при индукции количественной устойчивости заключается в увеличении уровня АФК в клетке, которое достигается через действие кальций-зависимых протеинкиназ, активирующих прооксидантные ферменты (Dey et al., 2010; Dubiella et al., 2013; Stael et al., 2015). АФК, в свою очередь, способствуют дополнительному поступлению Ca^{2+} в цитоплазму. Таким образом, между образованием АФК и вбросом кальция в цитоплазму существует положительная обратная связь (Mori, Schroeder 2004; Gao et al., 2014; Gilroy et al., 2014). Еще одной причиной увеличения уровня АФК является индукция мембрано-связанной НАДФН-оксидазы МАП-киназами и ВIK1-киназой, активированными при развитии количественной устойчивости (Kadota et al., 2014) (рис. 6.1.2). Повышенный уровень АФК, в свою очередь, часто является критерием устойчивости растений к фитопатогенам из-за токсического действия на микроорганизмы, а также вследствие обеспечения усиления барьерных свойств растительных клеточных стенок (см. главу 5.3).

Характерными маркерами ПАМП-индуцируемого иммунитета являются также такие повышающие устойчивость растений процессы, как образование папилл из каллозы, лигнификация клеточных стенок, синтез фитоалексинов, образование PR-белков (эти процессы подробно описаны в главах 5.1–5.4). ПАМП-индуцируемые ответы защищают растения и на самых ранних стадиях взаимодействия с патогеном, когда микроорганизм пытается проникнуть с поверхности покровных тканей растения внутрь его тела. ПАМП при этом по вышеописанным механизмам (рецепция и передача сигнала, деполяризация мембран, вброс кальция, образование АФК) приводит к закрыванию устьиц, что перекрывает «дорогу» патогенным бактериям в растительный организм (Melotto et al., 2017).

ПАМП-индуцируемый ответ также сопряжен с изменением гормонального статуса растений. Активированные при фитоиммунной реакции МАП- и кальций-зависимые протеинкиназы индуцируют на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях ферменты биосинтеза этилена (рис. 6.1.2). Кроме того, при количественной устойчивости повышается уровень гормонов биотического стресса — салициловой и жасмоновой кислот (Halim et al., 2009; Vlot et al., 2009; Bigeard et al., 2015). Эти фитогормоны, в свою очередь, дополнительно «раскручивают» оборонительный арсенал растительных клеток, сдвигая приоритеты расходования ресурсов с процессов роста и развития на борьбу с патогенным микроорганизмом. Содержание «ростовых» гормонов (ауксин, цитокинины, гиббереллины), а также гормона абиотического стресса и морфогенеза (абсцизовая кислота) обычно понижается при иммунном ответе (Bari Jones, 2009; Robert-Seilaniantz et al., 2011).

Однако в действительности изменения в гормональном статусе растений могут значительно различаться в рамках конкретных растительно-микробных патосистем. Подробнее об особенностях работы гормональных систем при бактериозах можно узнать из главы 6.3.

Описанные выше ПАМП-индуцируемые ответы в основном активируются локально, то есть в непосредственной близости от места инвазии патогенного организма. В дополнение к этому ПАМП (например, флагеллин и липополисахариды) способны активировать в растении системные ответы, то есть те, которые реализуются далеко за пределами непосредственного присутствия элиситоров (на уровне всего растения). Этот тип ответов обеспечивает повышенную устойчивость растений к последующему инфицированию фитопатогенами и поэтому называется *индуцируемой системной устойчивостью* (Choudhary et al., 2007; De Vleeschauwer, Höfte, 2009). Системные ПАМП-индуцируемые ответы на молекулярном уровне охарактеризованы крайне слабо, и на сегодняшний день не существует представлений не только о механизмах их активации, но даже о физиологических характеристиках, присущих растительным клеткам и тканям при развитии индуцируемой системной устойчивости. При этом, однако, известно, что описанные выше изменения, происходящие локально в рамках количественной устойчивости (лигнификация, отложение каллозы, образование АФК и т. д.), не характерны для индуцируемой системной устойчивости (Choudhary et al., 2007; Pieterse et al., 2014). Это свидетельствует о разных механизмах локальной и системной ПАМП-индуцируемой устойчивости.

Единственным «осязаемым» критерием системных ПАМП-индуцируемых ответов является повышение устойчивости всего растения к фитопатогенам. Такое повышение устойчивости, по всей видимости, связано с тем, что ПАМП активируют подготовку («прайминг») растения к атаке патогена (Conrath et al., 2001). В пользу этого свидетельствует то, что при активации индуцируемой системной устойчивости и последующей инвазии патогена растения накапливают каллозу, закрывают устьица и запускают ряд других защитных ответов быстрее и эффективнее, чем растения, в которых этот тип устойчивости не был активирован (Conrath et al., 2001; Pieterse et al., 2014). Каковы физиологические причины более быстрого и более эффективного реагирования растений на вторжение патогена при индуцируемой системной устойчивости, остается не выясненным.

Причины количественного проявления устойчивости при ПАМП-индуцируемом иммунитете

Почему ПАМП-индуцируемая устойчивость выражается количественно, то есть может иметь разную степень эффективности: от практически нулевой до стопроцентной? Объяснение этому можно найти с точки зрения молекулярных механизмов ее активации и репрессии, а также просто «здорового смысла» в использовании энергетических ресурсов растения. Уровень количественной устойчивости в каждом конкретном случае, по всей видимости, складывается из разнообразия ПАМП, которые растительная клетка способна воспринимать,

и эффективности взаимодействия каждого ПАМП с соответствующим рецептором. Фактически сигналы от отдельных элиситоров могут «суммироваться», и получившаяся сумма, по всей вероятности, соответствует уровню проявляемой устойчивости. В пользу этого свидетельствует то, что количественная устойчивость — это полигенный признак (кодируется множеством генов) (Agrios et al., 2005; Багирова с соавт., 2012), а также то, что интенсивность защитных ответов выше в случае обработки клеток несколькими элиситорами, чем каждым по отдельности (Davis, Hahlbrock, 1987). При этом эффективность восприятия отдельно взятого элиситора может быть разной в зависимости от ряда факторов. **Во-первых**, структура распознаваемых эпитопов в молекулах одного и того же типа элиситора (например, флагеллин) у разных патогенов может различаться, поэтому и эффективность взаимодействия таких эпитопов с рецептором может быть разной. Так, например, некоторые штаммы *Pseudomonas syringae* имеют нетипичную последовательность распознаваемого участка флагеллина (flg22) (Clarke et al., 2013). **Во-вторых**, физиологически активные фрагменты ПАМП у некоторых микроорганизмов могут экранироваться за счет гликозилирования, фосфорилирования, метилирования, сульфатирования, что затрудняет их взаимодействие с PRR-белками. У ряда фитопатогенных бактерий таким образом «камуфлируются» участки флагеллина (см. главу 3.5), а у некоторых фитопатогенных грибов описаны белки, которые связывают эпитопы хитина и препятствуют его взаимодействию с растительным рецептором (de Jonge et al., 2010; Dou, Zhou, 2012). **В-третьих**, поскольку степень проявления количественной устойчивости зависит от факторов абиотической природы и физиологического статуса растения (например, стадии онтогенеза) (Agrios et al., 2005; Багирова с соавт., 2012), логично предположить, что в зависимости от состояния растительного организма (растительной клетки), количество молекул ПАМП-распознающих рецепторов может меняться, приводя к неодинаковой чувствительности макроорганизма к разнообразным ПАМП. Кроме того, эффективность восприятия того или иного ПАМП разными видами растений может различаться из-за особенностей строения PRR-белков. **В-четвертых**, в наступательном арсенале некоторых патогенов есть специальные эффектор-ные белки, которые способны подавлять работу отдельных элементов каскада ПАМП-индуцируемых ответов (см. главу 6.2). Из-за всего этого получающаяся в каждом конкретном случае «сумма» сигналов, опосредующих количественную устойчивость, может быть разной и зависеть от генетических характеристик патогена и хозяина, физиологических особенностей растений и факторов абиотической природы. Это, по всей вероятности, и является причиной количественного выражения признака ПАМП-индуцируемого иммунитета.

Несмотря на разнообразные способы аттенуации (ослабления) количественной устойчивости патогенами, ее ни в коем случае нельзя расценивать как неэффективную. ПАМП-индуцируемая устойчивость позволяет подавить *in planta* развитие большинства патогенов, «ускользнувших» от конститутивных факторов устойчивости (Jones, Dangl, 2006; Nicaise et al., 2009). Неспособность растения к восприятию определенных ПАМП в отдельно взятом случае, по всей видимости, может

компенсироваться избыточностью ПАМП-распознающих рецепторов (Zipfel, 2009; Monaghan, Zipfel, 2012; Macho, Zipfel, 2014). Хотя инактивация рецептора, распознающего определенный ПАМП, в рамках экспериментальных моделей обычно приводит к понижению устойчивости, существует точка зрения, что потеря одного из PRR-рецепторов, как правило, не будет существенно увеличивать восприимчивость макроорганизмов к биотическим стрессорам, поскольку растения обладают большим разнообразием таких рецепторов (Boller, Felix, 2009). В пользу этого свидетельствует сохранение устойчивости у двух природных экотипов резуховидки (*Ws-0* и *Cvi-0*), у которых последовательность гена *FLS2*, кодирующего рецептор флагеллина, нарушена нонсенс-(стоп-кодон)-мутацией. В то же время приобретение растениями новых ПАМП-распознающих рецепторов может оказывать положительный эффект на их устойчивость. Так, у трансгенных растений табака с привнесённым геном, кодирующим PRR-рецептор *ERF*, характерным только для представителей семейства крестоцветных, повышается устойчивость к ряду фитопатогенов, по сравнению с растениями табака дикого типа (Lacombe et al., 2010).

Количественная устойчивость действительно не утратила свое значение как рациональный способ сдерживания патогенных организмов, несмотря на то, что каскад ПАМП-индуцируемых ответов организован таким образом, что некоторые микроорганизмы умудряются находить в нем различные «лазейки» и успешно колонизировать хозяина. Такая варибельная эффективность системы количественной устойчивости может быть связана с двумя основными причинами. Во-первых, «лазейки» в количественном иммунитете, которые формируют основу для его неполной активации, позволяют растениям успешно сожительствовать с микробами-мутуалистами (взаимовыгодное сожительство), для которых, как и для патогенов, характерно наличие разнообразных ПАМП. Поэтому, в случае если бы ПАМП-индуцируемый иммунитет мог работать только на качественном уровне, не существовало бы физиологической основы для «дружбы» растений и мутуалистических микроорганизмов. Во-вторых, количественные характеристики ПАМП-индуцируемой устойчивости позволяют растению корректировать силу «ответного удара» и, соответственно, его «стоимость», и не тратить лишние ресурсы на борьбу со «слабым» патогеном. Развитие 100% устойчивости в ответ на каждый попадаемый в растение ПАМП расходовало бы все энергетические ресурсы растения и не позволяло бы ему нормально расти и развиваться. В то же время такая организация системы количественной устойчивости может приводить и к негативным для растения последствиям. Некоторые патогены, приспособившись к устройству системы количественной устойчивости, вызывают нецелесообразно слабый иммунный ответ, который не может эффективно препятствовать их развитию в теле растения-хозяина. Таким образом, ПАМП, распознающие их рецепторы и системы передачи сигнала при индукции горизонтальной устойчивости формируют «платформу» для продолжающегося коэволюционного «диалога» растений и фитопатогенов.

Литература:

Багирова, С. Ф., Джавахия, В. Г., Дьяков, Ю. Т., Озерецковская, О. Л., Проворов, Н. А., Тихонович, И. А., & Щербакова, Л. А. (2012). *Фундаментальная фитопатология*. Москва. Изд-во Красанд.

Тарчевский, И. А. (2002). *Сигнальные системы клеток растений*. Москва. Изд-во Наука.

Agrios, G. N. (2005). *Plant pathology*. 5th eds. Department of Plant Pathology. University of Florida. United States of America.

Bari, R., & Jones, J. D. (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology*, 69(4), 473–488.

Bigeard, J., Colcombet, J., & Hirt, H. (2015). Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). *Molecular Plant*, 8(4), 521–539.

Böhm, H., Albert, I., Fan, L., Reinhard, A., & Nürnberger, T. (2014). Immune receptor complexes at the plant cell surface. *Current Opinion in Plant Biology*, 20, 47–54.

Boller, T. (2005). Peptide signalling in plant development and self/non-self perception. *Current Opinion in Cell Biology*, 17(2), 116–122.

Boller, T., & Felix, G. (2009). A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review of Plant Biology*, 60, 379–406.

Boudsocq, M., Willmann, M. R., McCormack, M., Lee, H., Shan, L., He, P., ... & Sheen, J. (2010). Differential innate immune signalling via Ca²⁺ sensor protein kinases. *Nature*, 464(7287), 418–422.

Boudsocq, M., & Sheen, J. (2013). CDPKs in immune and stress signaling. *Trends in Plant Science*, 18(1), 30–40.

Bowler, C., & Fluhr, R. (2000). The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance. *Trends in Plant Science*, 5(6), 241–246.

Chen, X., Chern, M., Canlas, P. E., Ruan, D., Jiang, C., & Ronald, P. C. (2010). An ATPase promotes autophosphorylation of the pattern recognition receptor XA21 and inhibits XA21-mediated immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(17), 8029–8034.

Chisholm, S. T., Coaker, G., Day, B., & Staskawicz, B. J. (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, 124(4), 803–814.

Choudhary, D. K., Prakash, A., & Johri, B. N. (2007). Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. *Indian Journal of Microbiology*, 47(4), 289–297.

Clarke, C. R., Chinchilla, D., Hind, S. R., Taguchi, F., Miki, R., Ichinose, Y., ... & Vinatzer, B. A. (2013). Allelic variation in two distinct *Pseudomonas syringae* flagellin epitopes modulates the strength of plant immune responses but not bacterial motility. *New Phytologist*, 200(3), 847–860.

Conrath, U., Thulke, O., Katz, V., Schwindling, S., & Kohler, A. (2001). Priming as a mechanism in induced systemic resistance of plants. *European Journal of Plant Pathology*, 107(1), 113–119.

da Cunha, L., McFall, A. J., & Mackey, D. (2006). Innate immunity in plants: a continuum of layered defenses. *Microbes and Infection*, 8(5), 1372–1381.

Darvill, A. G., & Albersheim, P. (1984). Phytoalexins and their elicitors—a defense against microbial infection in plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 35(1), 243–275.

Davis, K. R., & Hahlbrock, K. (1987). Induction of plant defense responses in cultured parsley cells by plant cell wall fragments. *Plant Physiology*, 84, 1286–1290.

de Jonge, R., van Esse, H. P., Kombrink, A., Shinya, T., Desaki, Y., Bours, R., ... & Thomma, B. P. (2010). Conserved fungal LysM effector Ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants. *Science*, 329(5994), 953–955.

De Vleeschauwer, D., & Höfte, M. (2009). Rhizobacteria-induced systemic resistance. *Advances in Botanical Research*, 51, 223–281.

Dey, S., Ghose, K., & Basu, D. (2010). *Fusarium* elicitor-dependent calcium influx and associated ROS generation in tomato is independent of cell death. *European Journal of Plant Pathology*, 126(2), 217–228.

Dou, D., & Zhou, J. M. (2012). Phytopathogen effectors subverting host immunity: different foes, similar battleground. *Cell Host & Microbe*, 12(4), 484–495.

Dubiella, U., Seybold, H., Durian, G., Komander, E., Lassig, R., Witte, C. P., ... & Romeis, T. (2013). Calcium-dependent protein kinase/NADPH oxidase activation circuit is required for rapid defense signal propagation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(21), 8744–8749.

Duplan, V., & Rivas, S. (2014). E3 ubiquitin-ligases and their target proteins during the regulation of plant innate immunity. *Frontiers in Plant Science*, 5, 42.

Felix, G., Duran, J. D., Volko, S., & Boller, T. (1999). Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *The Plant Journal*, 18(3), 265–276.

Ferrari, S., Savatin, D. V., Sicilia, F., Gramegna, G., Cervone, F., & De Lorenzo, G. (2013). Oligogalacturonides: plant damage-associated molecular patterns and regulators of growth and development. *Frontiers in Plant Science*, 4, 49.

French, E., Kim, B. S., & Iyer-Pascuzzi, A. S. (2016). Mechanisms of quantitative disease resistance in plants. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 56, 201–208.

Fuchs, S., Grill, E., Meskiene, I., & Schweighofer, A. (2013). Type 2C protein phosphatases in plants. *The FEBS Journal*, 280(2), 681–693.

Gao, X., Cox Jr. K. L., & He, P. (2014). Functions of calcium-dependent protein kinases in plant innate immunity. *Plants*, 3(1), 160–176.

Gilroy, S., Suzuki, N., Miller, G., Choi, W. G., Toyota, M., Devireddy, A. R., & Mittler, R. (2014). A tidal wave of signals: calcium and ROS at the forefront of rapid systemic signaling. *Trends in Plant Science*, 19(10), 623–630.

Gómez-Gómez, L., & Boller, T. (2000). FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Molecular Cell*, 5(6), 1003–1011.

Gust, A. A., Biswas, R., Lenz, H. D., Rauhut, T., Ranf, S., Kemmerling, B., ... & Nürnberger, T. (2007). Bacteria-derived peptidoglycans constitute pathogen-associated

molecular patterns triggering innate immunity in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 282(44), 32338–32348.

Halim, V. A., Altmann, S., Ellinger, D., Eschen-Lippold, L., Miersch, O., Scheel, D., & Rosahl, S. (2009). PAMP-induced defense responses in potato require both salicylic acid and jasmonic acid. *The Plant Journal*, 57(2), 230–242.

Halter, T., Imkampe, J., Mazzotta, S., Wierzba, M., Postel, S., Bücherl, C., ... & Nürnberger, T. (2014). The leucine-rich repeat receptor kinase BIR2 is a negative regulator of BAK1 in plant immunity. *Current Biology*, 24(2), 134–143.

Han, S. W., Lee, S. W., & Ronald, P. C. (2011). Secretion, modification, and regulation of Ax21. *Current Opinion in Microbiology*, 14(1), 62–67.

Hayafune, M., Berisio, R., Marchetti, R., Silipo, A., Kayama, M., Desaki, Y., ... & Molinaro, A. (2014). Chitin-induced activation of immune signaling by the rice receptor CEBiP relies on a unique sandwich-type dimerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(3), 404–413.

Henry, E., Yadeta, K. A., & Coaker, G. (2013). Recognition of bacterial plant pathogens: local, systemic and transgenerational immunity. *New Phytologist*, 199(4), 908–915.

Huffaker, A., Pearce, G., & Ryan, C. A. (2006). An endogenous peptide signal in *Arabidopsis* activates components of the innate immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(26), 10098–10103.

Jones, J. D., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323–329.

Kadota, Y., Sklenar, J., Derbyshire, P., Stransfeld, L., Asai, S., Ntoukakis, V., Jones, J., Shirasu, K., Menke, F., Jones, A., and Zipfel, C. (2014). Direct regulation of the NADPH oxidase RBOHD by the PRR-associated kinase BIK1 is required for ROS burst and plant immunity. *Molecular Cell*, 54(1), 43–55.

Kaufmann, S. H. (1990). Heat shock proteins and the immune response. *Immunology Today*, 11, 129–136.

Kauss, H., Fauth, M., Merten, A., & Jeblick, W. (1999). Cucumber hypocotyls respond to cutin monomers via both an inducible and a constitutive H₂O₂-generating system. *Plant Physiology*, 120(4), 1175–1182.

Kim, B. H., Kim, S. Y., & Nam, K. H. (2013). Assessing the diverse functions of BAK1 and its homologs in *Arabidopsis*, beyond BR signaling and PTI responses. *Molecules and Cells*, 35(1), 7–16.

Krol, E., Mentzel, T., Chinchilla, D., Boller, T., Felix, G., Kemmerling, B., ... & Becker, D. (2010). Perception of the *Arabidopsis* danger signal peptide 1 involves the pattern recognition receptor AtPEPR1 and its close homologue AtPEPR2. *Journal of Biological Chemistry*, 285(18), 13471–13479.

Kunze, G., Zipfel, C., Robatzek, S., Niehaus, K., Boller, T., & Felix, G. (2004). The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in *Arabidopsis* plants. *The Plant Cell*, 16(12), 3496–3507.

Lacombe, S., Rougon-Cardoso, A., Sherwood, E., Peeters, N., Dahlbeck, D., Van Esse, H. P., ... & Jones, J. D. (2010). Interfamily transfer of a plant pattern-recognition receptor confers broad-spectrum bacterial resistance. *Nature Biotechnology*, 28(4), 365–369.

Lecourieux, D., Mazars, C., Pauly, N., Ranjeva, R., & Pugin, A. (2002). Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. *The Plant Cell*, *14*(10), 2627–2641.

Lecourieux, D., Ranjeva, R., & Pugin, A. (2006). Calcium in plant defence-signalling pathways. *New Phytologist*, *171*(2), 249–269.

Lee, S. W., Han, S. W., Sririyanyum, M., Park, C. J., Seo, Y. S., & Ronald, P. C. (2009). A type I-secreted, sulfated peptide triggers XA21-mediated innate immunity. *Science*, *326*(5954), 850–853.

Lin, W., Li, B., Lu, D., Chen, S., Zhu, N., He, P., & Shan, L. (2014). Tyrosine phosphorylation of protein kinase complex BAK1/BIK1 mediates *Arabidopsis* innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(9), 3632–3637.

Macho, A. P., & Zipfel, C. (2014). Plant PRRs and the activation of innate immune signaling. *Molecular Cell*, *54*(2), 263–272.

Manzoor, H., Chiltz, A., Madani, S., Vatsa, P., Schoefs, B., Pugin, A., & Garcia-Brugger, A. (2012). Calcium signatures and signaling in cytosol and organelles of tobacco cells induced by plant defense elicitors. *Cell Calcium*, *51*(6), 434–444.

Melotto, M., Zhang, L., Oblessuc, P. R., & He, S. Y. (2017). Stomatal defense a decade later. *Plant Physiology*, *174*(2), 561–571.

Monaghan, J., & Zipfel, C. (2012). Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Current Opinion in Plant Biology*, *15*(4), 349–357.

Mori, I. C., & Schroeder, J. I. (2004). Reactive oxygen species activation of plant Ca²⁺ channels. A signaling mechanism in polar growth, hormone transduction, stress signaling, and hypothetically mechanotransduction. *Plant Physiology*, *135*(2), 702–708.

Muthamilarasan, M., & Prasad, M. (2013). Plant innate immunity: an updated insight into defense mechanism. *Journal of Biosciences*, *38*(2), 433–449.

Nicaise, V., Roux, M., & Zipfel, C. (2009). Recent advances in PAMP-triggered immunity against bacteria: pattern recognition receptors watch over and raise the alarm. *Plant Physiology*, *150*(4), 1638–1647.

Pieterse, C. M., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C., & Bakker, P. A. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology*, *52*, 347–375.

Ranf, S., Eschen-Lippold, L., Pecher, P., Lee, J., & Scheel, D. (2011). Interplay between calcium signalling and early signalling elements during defence responses to microbe- or damage-associated molecular patterns. *The Plant Journal*, *68*(1), 100–113.

Rasmussen, S., Barah, P., Suarez-Rodriguez, M. C., Bressendorff, S., Friis, P., Costantino, P., ... & Mundy, J. (2013). Transcriptome responses to combinations of stresses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, *161*(4), 1783–1794.

Robert-Seilaniantz, A., Grant, M., & Jones, J. D. (2011). Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annual Review of Phytopathology*, *49*, 317–343.

Shibuya, N., & Minami, E. (2001). Oligosaccharide signalling for defence responses in plant. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 59(5), 223–233.

Shimizu, T., Nakano, T., Takamizawa, D., Desaki, Y., Ishii-Minami, N., Nishizawa, Y., ... & Shibuya, N. (2010). Two LysM receptor molecules, CEBiP and OsCERK1, cooperatively regulate chitin elicitor signaling in rice. *The Plant Journal*, 64(2), 204–214.

Stael, S., Kmiciek, P., Willems, P., Van Der Kelen, K., Coll, N. S., Teige, M., & Van Breusegem, F. (2015). Plant innate immunity — sunny side up? *Trends in Plant Science*, 20(1), 3–11.

Staskawicz, B. J., Mudgett, M. B., Dangl, J. L., & Galan, J. E. (2001). Common and contrasting themes of plant and animal diseases. *Science*, 292(5525), 2285–2289.

Taj, G., Agarwal, P., Grant, M., & Kumar, A. (2010). MAPK machinery in plants: recognition and response to different stresses through multiple signal transduction pathways. *Plant Signaling & Behavior*, 5(11), 1370–1378.

Thomma, B. P., Nürnberger, T., & Joosten, M. H. (2011). Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. *The Plant Cell*, 23(1), 4–15.

Vlot, A. C., Dempsey, D. M. A., & Klessig, D. F. (2009). Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology*, 47, 177–206.

Walley, J. W., Kliebenstein, D. J., Bostock, R. M., & Dehesh, K. (2013). Fatty acids and early detection of pathogens. *Current Opinion in Plant Biology*, 16(4), 520–526.

Zhang, J., & Zhou, J. M. (2010). Plant immunity triggered by microbial molecular signatures. *Molecular Plant*, 3(5), 783–793.

Zimmermann, S., Nürnberger, T., Frachisse, J. M., Wirtz, W., Guern, J., Hedrich, R., & Scheel, D. (1997). Receptor-mediated activation of a plant Ca²⁺-permeable ion channel involved in pathogen defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(6), 2751–2755.

Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J. D., Boller, T., & Felix, G. (2006). Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell*, 125(4), 749–760.

Zipfel, C. (2009). Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(4), 414–420.

Zipfel, C., & Robatzek, S. (2010). Pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity: veni, vidi...? *Plant Physiology*, 154(2), 551–554.

6.2. Качественная (вертикальная, эффектор-индуцируемая) устойчивость

Качественная устойчивость, которую еще называют вертикальной или эффектор-индуцируемой (effector-triggered immunity, ETI), считается в эволюционном плане более молодой и более динамично развивающейся, чем количественная (Vanderplank, 2012). Предпосылкой для возникновения качественной устойчивости у растений послужило то, что многие фитопатогенные микроорганизмы «научились» блокировать количественную (ПАМП-индуцируемую) устойчивость с помощью специальных эффекторных белков (см. главу 3.2). Чтобы противостоять таким патогенам, в растениях появились сенсорные системы, которые воспринимают эти эффекторные белки (или последствия их действия), после чего сигнализируют об инвазии микроорганизма и приводят к активации очень мощного (обычно значительно более сильного, чем при количественной устойчивости) защитного ответа. Именно этот тип устойчивости на примере взаимодействия растений льна и ржавчинных грибов более 60 лет назад исследовал известный фитопатолог Генри Гарольд Флор, когда разрабатывал теорию устойчивости растений, названную «ген на ген» (Flor, 1956, 1971). Флор пришел к выводу, что причиной формирования устойчивости является взаимодействие продукта гена авирулентности патогена с продуктом гена устойчивости (R, resistance) растения. При этом генетические варианты фитопатогенов (штаммы, расы), у которых продукты генов авирулентности «не соответствуют» продуктам R-генов растения-хозяина, вызывают заболевание. И в настоящее время положения, сформулированные Флором, не утратили своей силы, хотя его теория была пересмотрена и значительно дополнена благодаря развитию молекулярной биологии.

Для качественной устойчивости, как и для количественной, выделяют четыре отличительные особенности. **Во-первых**, эффектор-индуцируемая устойчивость выражается качественно: либо эта устойчивость не активируется и поэтому никак не препятствует развитию патогенного организма в теле хозяина, либо активируется и в этом случае полностью нейтрализует патогенный организм, приводя к стопроцентной устойчивости растения. **Во-вторых**, качественная устойчивость высокоспецифична, то есть индуцируется только в ответ на определенные патогены. Часто даже близкородственные штаммы (расы) микроорганизмов могут различаться по способности индуцировать этот тип устойчивости; при этом один штамм (индуцирующий качественную устойчивость) оказывается авирулентным, а вирулентность другого (не индуцирующего качественную устойчивость) будет зависеть от уровня индукции количественной устойчивости (Jones, Dangl, 2006; Dodds, Rathjen, 2010).

В-третьих, особенность качественной устойчивости заключается в том, что она индуцируется специфичными элиситорами — эффекторными белками (поэтому одним из ее названий является «эффектор-индуцируемая») (Cui et al., 2015). Эффекторные белки — это важные факторы вирулентности, которые, как правило, транспортируются внутрь клеток растений и обладают сигнальными функциями.

Такие белки, являющиеся иммуносупрессорами, необходимы микроорганизмам для подавления фитоиммунных ответов, а также индукции «правильного» для патогена изменения метаболизма хозяина (Grant et al., 2006; Block et al., 2008). В то же время растения «научились» распознавать некоторые эффекторы патогенов как сигнал опасности и активировать в ответ на них губительные для микроорганизма защитные реакции. Поэтому, несмотря на то, что эффекторы изначально «задуманы» как факторы вирулентности, их часто называют факторами авирулентности, поскольку их роль в растительно-микробных взаимодействиях дуалистична: у одних видов (сортов) растений определенный эффекторный белок может репрессировать защитные ответы, а у других, наоборот, активировать (Hajri et al., 2009; Lindeberg et al., 2012).

В отличие от ПАМП, эффекторы варьибельны и значительно различаются даже у близкородственных разновидностей патогенов. Это и определяет высокую специфичность эффектор-индуцируемой устойчивости. Кроме того, эти белки динамично модифицируются в процессе коэволюции и «гонки вооружения» патогена и хозяина.

В основном мишенями эффекторных белков являются компоненты каскада ПАМП-индуцируемых реакций, и считается, что возникновение эффекторов в процессе эволюции в первую очередь связано с необходимостью для микроорганизмов подавить количественную устойчивость. Одними из наиболее известных репрессоров количественной устойчивости являются эффекторы *Pseudomonas syringae* AvrPto, AvrPtoB, HopF2 и HopA11, которые препятствуют активации защитных ответов, опосредуемой рецепцией флагеллина (Thilmony et al., 1995; Robert-Seilaniantz et al., 2006; De Torres et al., 2006; Kim et al., 2009). Многие эффекторы «нацелены» на репрессию многочисленных киназ, индуцирующих количественную устойчивость (Zhang et al., 2007; Block et al., 2008). В то же время некоторые эффекторы блокируют белки растения, задействованные в качественной устойчивости (см. ниже), а также выступают как активаторы транскрипции эукариотических генов. Последний тип эффекторов выделяют в группу так называемых TAL-(transcription activator-like)-эффекторов, которые транспортируются в ядро растительной клетки и индуцируют экспрессию S-(susceptibility)-генов восприимчивости хозяина (Bogdanove et al., 2010). О роли продуктов S-генов во взаимодействии растений и фитопатогенов написано в главе 7.

В-четвертых, характерной особенностью качественной устойчивости является то, что она опосредована особым типом рецепторных белков, которые воспринимают эффекторы или последствия их действий и активируют в дальнейшем каскад защитных реакций. Эти рецепторы называют R-(resistance)-белками. У резуховидки выявлено около 150 генов, кодирующих R-белки, а у риса около 600. Практически все R-белки являются внутриклеточными, что логично, учитывая то, что большинство эффекторов патогенов доставляется в цитоплазму растительной клетки. При этом R-белки могут быть локализованы как в самой цитоплазме, так и в нуклеоплазме, хлоропластах и эндомембранных структурах (аппарат Гольджи, вакуоль, ЭПР) (Cui et al., 2015).

R-белки динамично изменяются в процессе коэволюции патогена и хозяина. Это диктуется постоянным «обновлением» эффекторов в популяциях фитопатогенов, которое «заставляет» растение быстро «создавать» новые подходящие рецепторы. Эволюционной изменчивости R-генов способствует их кластерное расположение в геноме, которое, по всей видимости, приводит к их дупликациям, и/или неравномерной рекомбинации, что обеспечивает появление новых аллелей; наиболее эффективные аллели закрепляются в популяции благодаря естественному отбору (Baumgarten et al., 2003; Meyers et al., 2003).

R-белки, которые еще называют NB-LRR-белками (nucleotide-binding site, leucine-rich repeat), достаточно консервативны. У них выделяют N-концевой вариабельный домен, воспринимающий сигнал, нуклеотид-связывающий сайт и лейцин-богатую область на С-конце. В зависимости от структуры N-концевого домена, R-белки подразделяют на два типа: 1) coiled-coil (CC)-NB-LRR и 2) toll/interleukin 1 receptor-like (TIR)-NB-LRR. Принцип действия R-белков основан на их конформационной модификации под действием эффекторов. В отсутствие лиганда (эффектора), в нуклеотид-связывающем сайте неактивного R-белка располагается АДФ, который оказывается «запертым» вследствие того, что N-конец рецептора взаимодействует с его С-концевой областью (рис. 6.2.1). Под действием эффектора R-белок «разворачивается», что способствует «вытеснению» АДФ из нуклеотид-связывающего сайта молекулой АТФ. Гидролиз АТФ в нуклеотид-связывающем сайте обеспечивает взаимодействие активированного R-белка со следующими компонентами каскада защитных реакций (Takken, Tameling, 2009; Takken, Goverse, 2012; Spoel, Dong, 2012) (рис. 6.2.1).

Некоторые R-белки могут непосредственно взаимодействовать с эффекторами патогенов, что как раз и отражает теорию Флора «ген на ген» (Dodds, Rathjen, 2010). Так, например, эффектор *Ralstonia solanacearum* PopP2, связываясь напрямую с R-белком RRS1-R резуховидки, индуцирует качественную устойчивость (Deslandes et al., 2003). Однако в большинстве случаев взаимодействие R-белков с эффекторами не прямое, благодаря чему один рецептор может активировать сигнальный каскад в ответ на действие нескольких разных эффекторов. Выяснение того, что один R-рецептор может участвовать в распознавании нескольких эффекторов, сняло вопрос о несоответствии разнообразия R-белков растений и эффекторных белков патогенов.

Непрямое взаимодействие R-белков и эффекторов опосредовано дополнительными белками, которые называют «сторожевыми» (guardee) и «белками-приманками» (decoy). «Сторожевые белки» выполняют две функции. Во-первых, они являются «узловыми» компонентами (hubs) ПАМП-индуцируемого иммунитета, и, видимо, поэтому, эти белки «выбраны» фитопатогенами в качестве «цели», поражение которой с помощью эффекторов препятствует развитию количественной устойчивости. Второй функцией «сторожевых белков» является подавление активности R-белков за счет взаимодействия с ними, что репрессирует фитоиммунный ответ в отсутствие патогена. Но, в том случае если при инфекции эффектор микроорганизма взаимодействует с растительным «сторожевым белком», происходит его

«отсоединение» от R-рецептора, приводящее к активации последнего и индукции качественной устойчивости (van der Hooft, Kamoun, 2008). Таким образом, «сторожевые белки» участвуют и в количественной устойчивости как звенья передачи сигнала ПАМП, и в качественной, играя роль сенсоров эффекторных белков патогенов.

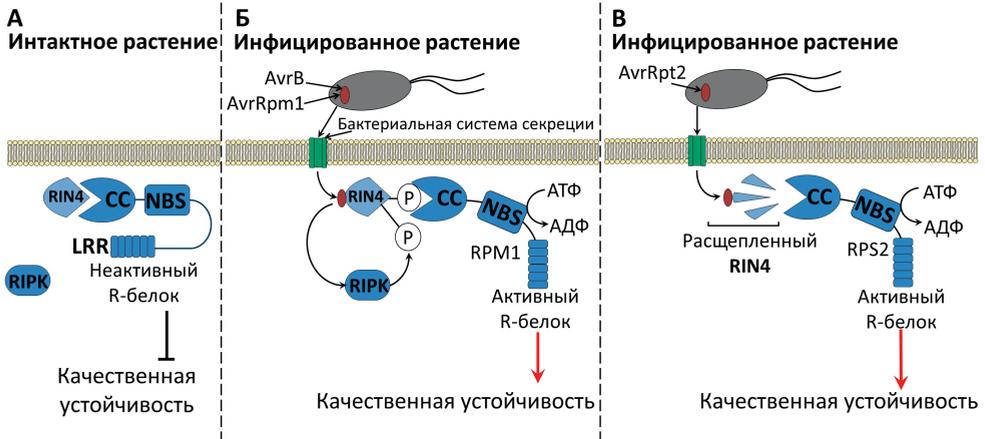


Рис. 6.2.1. Схема активации качественной (эффектор-индуцируемой) устойчивости растений (по: Spoel, Dong, 2012). **А** — в неинфицированном растении R-белок находится в неактивном состоянии (когда N-концевая область белка (CC, coiled-coil) взаимодействует с C-концевой (LRR, leucine-rich repeat), запирая таким образом АДФ в нуклеотид-связывающем сайте (NBS, nucleotide-binding site)) благодаря взаимодействию со «сторожевым белком» RIN4. **Б** — в инфицированном растении эффекторы AvrB и AvrRpm1 обеспечивают фосфорилирование RIN4, опосредованное киназой RIPK, что переводит R-белок (RPM1) в активное состояние (когда N-конец белка отсоединяется от C-конца, что обеспечивает связывание и гидролиз АДФ); в результате этого индуцируется качественная устойчивость. **В** — в инфицированном растении эффектор AvrRpt2 гидролизует RIN4, что переводит R-белок (RPS2) в активное состояние и обеспечивает активацию качественной устойчивости.

Дополнительные пояснения — в тексте.

Такая двойная роль «сторожевых белков» формирует противоречие при попытке выяснения направления их эволюционной изменчивости в рамках «гонки вооружения» патогена и хозяина. С одной стороны, ввиду того, что эти белки являются элементами ПАМП-индуцируемого иммунитета, их взаимодействие с эффекторами патогена нежелательно для растения; следовательно, в ходе естественного отбора в популяции должны закрепляться такие варианты генов, которые кодируют «нечувствительные» к эффекторам «сторожевые белки». С другой стороны, поскольку те же самые «сторожевые белки» ответственны за восприятие эффекторов, без которого невозможно развитие качественной устойчивости, отбор генов «сторожевых белков» должен осуществляться по принципу их «чувствительности» к эффекторам.

Самым известным примером «сторожевых белков» является киназа RIN4 (RPM1-interacting protein 4). RIN4 участвует в количественной устойчивости (в том числе опосредованной рецепцией флагеллина и фактора элонгации), и, видимо, поэтому многие эффекторы «приспособлены» для его инактивации. Помимо участия в количественной устойчивости, RIN4 взаимодействует с несколькими R-белками (например, RPM1 и RPS2). Это взаимодействие поддерживает R-белки в неактивной конформации (когда N-концевая область белка взаимодействует с C-концевой, запирая таким образом АДФ в нуклеотид-связывающем сайте) (рис. 6.2.1). Эффекторы фитопатогенов с целью подавления ПАМП-индуцируемого иммунитета растений инактивируют RIN4 либо за счет его фосфорилирования, либо протеолиза. Это, в свою очередь, приводит к распаду комплекса RIN4 с R-белком, что переводит последний в активное состояние (когда нуклеотид-связывающий сайт «разворачивается» для связывания и гидролиза АТФ) и индуцирует таким образом защитный ответ (Takken, Taming, 2009; Takken, Goverse, 2012; Spoel, Dong, 2012) (рис. 6.2.1). Для растений с функциональным RPS2 геном нокаут-мутация гена RIN4 является летальной (Mackey et al., 2003), по всей вероятности, из-за конститутивной активации качественной устойчивости, которая, как известно, сопряжена с программируемой клеточной смертью (см. ниже).

В отличие от «сторожевых белков», для которых сложно понять направление изменчивости кодирующих их генов, «траектория» преобразования «белков-приманок» в процессе эволюции достаточно очевидна. «Белки-приманки» не участвуют в количественной устойчивости, но, так же, как и «сторожевые белки», регулируют активность R-белков в зависимости от наличия эффекторов. Считается, что «белки-приманки» возникли в результате дупликации генов, продукты которых участвовали в ПАМП-индуцируемом иммунитете и одновременно являлись мишенями эффекторов, то есть функционировали как «сторожевые белки». В дальнейшем эти дублицированные гены изменялись в ходе эволюции независимо друг от друга. Кодируемые ими белки в итоге разделились по выполняемым функциям: один белок сохранил свое место в цепи ПАМП-индуцируемого сигналинга и стал «нечувствительным» к эффекторам, а другой — вышел из каскада реакций количественной устойчивости, но остался «мишенью» многих эффекторов и в дополнение к этому приобрел «партнера» в виде R-белка (van der Hoorn, Kamoun, 2008). Подобные эволюционные события позволили растениям оптимизировать системы, регулирующие защитные ответы, а именно «сделать» компоненты количественного иммунитета «нечувствительными» к бактериальным эффекторам, а также «разработать» специальные «приманки», которые позволяют эффективно воспринимать эффекторы и в результате этого индуцировать качественную устойчивость (Khan et al., 2016).

Примером «белка-приманки» служит псевдокиназа ZED1 резуховидки. Эта нефункциональная киназа, не участвующая в ПАМП-индуцируемых ответах, взаимодействует с R-белком ZAR1 и репрессирует его активность. ZED1 может модифицироваться при участии эффектора HopZ1a *Pseudomonas syringae*, обладающего ацетилтрансферазной активностью, что приводит к диссоциации

ZED1-ZAR1-комплекса и индукции качественной устойчивости (Lewis et al., 2013). В качестве «белка-приманки» может работать и функциональная киназа Pto томата. Pto-киназа, являясь связующим звеном между R-белком Prf и эффекторами *P. syringae* AvrPto и AvrPtoB, задействована в индукции качественной устойчивости. Истинными мишенями AvrPto и AvrPtoB являются PRR-белки (рецепторы ПАМП). Эти эффекторы либо ингибируют каталитическую (киназную) активность PRR-белков (AvrPto), либо обеспечивают их протеасомо-зависимую деградацию (AvrPtoB). При этом «киназа-приманка» Pto, несмотря на взаимодействие с AvrPtoB, не разрушается, в отличие, например, от распознающей флагеллин PRR-киназы FLS2, но при этом эффективно передает сигнал через соответствующий R-белок (Martin, 2012).

Благодаря «сторожевым белкам» и «белкам-приманкам», которые «привлекают» разнородные эффекторы, растениям требуется сравнительно малое количество R-белков для распознавания большого многообразия эффекторов. Многие R-белки фактически, отслеживая целостность «сторожевых белков» и «белков-приманок», воспринимают не сами эффекторы, а последствия их действий. Такой подход представляется целесообразным, поскольку структура эффекторов быстро модифицируется в процессе эволюции (что теоретически делает необходимым постоянное обновление и воспринимающих их рецепторов растений), но мишенями модифицированных эффекторов, как правило, остаются те же белки растения-хозяина. Поэтому для своевременного выявления патогенов растениям гораздо более эффективно отслеживать функциональное состояние этих мишеней, а не сами эффекторы.

Возникновение качественного типа устойчивости у растений послужило импульсом для селективного отбора фитопатогенов, направленного на появление новых бактериальных штаммов, которые способны «ускользнуть» от эффектор-индуцируемого иммунитета. Существуют две основные эволюционные стратегии «избегания» качественного иммунитета при колонизации растения. Во-первых, эффекторы микроорганизмов могут модифицироваться таким образом, чтобы сохранять свои фитоиммунорепрессорные свойства (блокировка ПАМП-индуцируемого иммунитета), но при этом не распознаваться R-белками, «белками-приманками» и «сторожевыми белками» и не вызывать иммунного ответа (van der Hoorn, Kamoun, 2008). Вторая стратегия связана с появлением «новых» эффекторов, способных «разрывать» цепочку передачи сигнала от «старых» эффекторов, блокируя таким образом качественную устойчивость (Khan et al., 2016). В ответ на это у растений могут появляться дополнительные системы, распознающие «новые» эффекторы патогена, что, в свою очередь, восстанавливает способность активировать качественную устойчивость, которая вновь оказывает селективное давление на популяцию микробов и приводит к возникновению «еще более новых» эффекторов. Подобная «гонка вооружения» хорошо проиллюстрирована моделью «зигзаг» (рис. 6.2.2), в рамках которой отражена постоянная модернизация средств атаки и обороны в процессе коэволюции патогена и хозяина

(Jones, Dangl, 2006). Одним из экспериментальных подтверждений этой модели служит активация мутационного процесса в клетках *Xanthomonas campestris* при их пассировании (55 последовательных пересевов) в устойчивом виде растения (кумкват). Количество выявленных мутаций у патогена при этом было значительно больше, чем при пассировании бактерий в восприимчивом растении (грейпфрут) (Trivedi, Wang, 2014). Причем эти мутации были особенно характерны для кластера генов, кодирующих эффекторные белки, которые и являются индукторами качественной устойчивости.

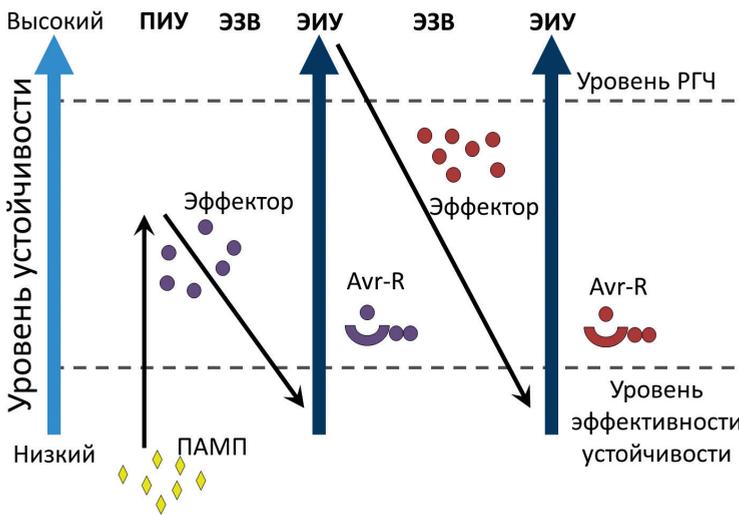


Рис. 6.2.2. «Зигзаг»-модель, отражающая формирование индуцированной устойчивости/восприимчивости на разных этапах коэволюции патогена и хозяина (по: Jones, Dangl, 2006). Способность восприятия ПАМП (патоген-ассоциированный молекулярный паттерн) растением привела к формированию ПАМП-индуцируемой (количественной) устойчивости (ПИУ). Появление у бактерий эффекторов, блокирующих ПИУ, стало причиной эффектор-зависимой восприимчивости (ЭЗВ) растения. R-белки, способные распознавать эффекторы, блокирующие ПИУ, обеспечили возможность активации эффектор-индуцируемой (качественной) устойчивости (ЭИУ). Появление новых эффекторов заблокировало качественный иммунитет и вновь привело к развитию эффектор-зависимой восприимчивости (ЭЗВ). «Обновление» R-белков опять восстановило высокий уровень качественной устойчивости. Уровень РГЧ — уровень, при котором развивается реакция гиперчувствительности. Дополнительные пояснения — в тексте.

Модель «зигзаг» также подкреплена выявленными молекулярными событиями, происходящими при развитии и блокировке разных типов фитоиммунитета. Выше упоминалось, что эффекторы AvrRpm1 и AvrB, «нацеленные» на подавление количественного иммунитета через инактивацию RIN4, могут вызывать развитие качественного иммунитета из-за того, что RIN4 ассоциирован с R-белком

RPM1 (рис. 6.2.1). Активация этого R-белка при качественном иммунитете происходит вследствие эффектор-(AvrRpm1/AvrB)-индуцируемого фосфорилирования RIN4, которое осуществляется при участии киназы RIPK (рис. 6.2.1). Для того чтобы предотвратить такое фосфорилирование, микроорганизмы в процессе эволюции «изобрели» эффектор AvrPphB (HopAR1), блокирующий киназу RIPK, что позволило подавить фитоиммунный ответ. Однако AvrPphB может инактивировать в растительной клетке не только RIPK, но и другую киназу — PBS1, которая ассоциирована с R-белком RPS5; это, в свою очередь, приводит к индукции RPS5-зависимой качественной устойчивости (Russell et al., 2015).

«Сторожевой белок» RIN4 может инактивироваться эффекторами бактерий не только посредством RIPK-зависимого фосфорилирования, но и протеолиза, который осуществляется эффектором AvrRpt2 и приводит к RPS2-зависимому фитоиммунному ответу (рис. 6.2.1). Для предотвращения такого ответа у микроорганизмов в арсенале есть эффектор HopF2, который способен препятствовать протеолизу RIN4 и блокировать таким образом AvrRpt2-индуцируемую RPS2-зависимую качественную устойчивость (Wilton et al., 2010).

Известной мишенью эффекторов при подавлении качественной устойчивости является белок EDS1. Этот белок служит узловым «передатчиком» сигнала от активированных R-белков (семейства TIR-NB-LRR). EDS1 может быть инактивирован патогенами при помощи эффекторов AvrRps4 и HopA1, что обеспечивает блокировку фитоиммунитета. В то же время взаимодействие AvrRps4 и HopA1 с EDS1 «отслеживается» R-белками RPS4 и RPS6, которые, в свою очередь, индуцируют качественную устойчивость (Bhattacharjee et al., 2011).

Особым способом в растении распознаются некоторые из эффекторов, относящиеся к группе TAL-(transcription activator-like)-эффекторов. Эти эффекторы имеют ДНК-связывающий домен, ответственный за специфичное взаимодействие с определенными последовательностями ДНК, находящимися в промоторных областях некоторых генов растений (S-генов восприимчивости). TAL-эффектор-зависимая индукция экспрессии этих генов способствует развитию патологий (Bogdanove et al., 2010). Для противостояния такой тактике патогена у растений в промоторных областях генов устойчивости закрепились мутации. Благодаря этим мутациям обеспечивается TAL-эффектор-зависимая активация экспрессии этих генов, которые в отсутствие патогена в растениях не транскрибируются (Hutin et al., 2015). Таким образом, первичное распознавание TAL-эффекторов фактически осуществляется не самими R-белками, а промоторными областями кодирующих их генов. TAL-эффекторы в наибольшей степени охарактеризованы на примере ксантомад. Самый известный TAL-эффектор — AvrBs3 *X. campestris* — активирует экспрессию гена *UPA20*, продукт которого определяет восприимчивость к этому патогену (Kau et al., 2007). В то же время AvrBs3, имеющий сходство к промотору гена устойчивости Bs3, может активировать его экспрессию и приводить таким образом к индукции качественной устойчивости. Еще один известный TAL-эффектор ксантомад — AvrXa10 — активирует экспрессию гена

устойчивости Xa10 (Tian et al., 2014). Кодированный этим геном белок, располагаясь в мембране ЭПР, индуцирует высвобождение ионов кальция в цитоплазму, что является предпосылкой для развития иммунного ответа.

Таким образом, индукция качественной устойчивости основана на прямом или опосредованном взаимодействии эффекторов фитопатогенов и R-белков растений. Патогенные организмы в ходе эволюции постоянно обновляют эффекторы для подавления фитоиммунитета и направленного изменения физиологии хозяина. В ответ на это растения «разрабатывают» все новые и новые системы для мониторинга эффекторов, обеспечивающего возможность своевременной мобилизации защитных систем в ответ на инвазию фитопатогенов. Несмотря на то, что механизмы действия некоторых эффекторов при индукции или репрессии защитных систем растений расшифрованы, многообразие факторов (а)вирулентности и механизмов функционирования уже охарактеризованных эффекторов свидетельствует о том, что принципы взаимодействия эффекторов и R-белков гораздо более разнообразны, чем можно представить на сегодняшний день. Сложность устройства систем качественной устойчивости определяется еще и тем, что один эффектор может иметь несколько мишеней, а для рецепции некоторых эффекторов требуется наличие нескольких R-белков одновременно (Büttner, 2016). Даже отдельно взятый вид микроорганизма (*Pseudomonas syringae*) может синтезировать несколько десятков эффекторных белков (для большинства из которых не выявлены мишени) (Cunnac et al., 2009; Lindeberg et al., 2012); и современная наука пока не может ответить на вопрос о том, как и для чего все эти эффекторы действуют в совокупности при формировании патологических систем.

Физиологические проявления качественной устойчивости и ее роль в растительно-микробных взаимодействиях

Качественная устойчивость выражается активацией МАП-киназного каскада, вбросом кальция в цитоплазму и активацией Ca^{2+} -зависимых протеинкиназ, интенсивным образованием АФК, лигнификацией, индукцией биосинтеза каллозы, PR-белков, фитоалексинов, этилена, салициловой и жасмоновой кислот, активацией факторов транскрипции семейства WRKY и репрограммированием экспрессии генома, то есть теми же реакциями, которые характерны для количественной устойчивости (см. главы 5.1–5.4, 6.1). Изменения в характере экспрессии генов при качественном и количественном иммунитете также в основном сходные (Navarro et al., 2004; Poland et al., 2009; Thomma et al., 2011). Все это указывает на то, что у растений существует универсальный набор защитных реакций, которые могут активироваться в рамках разных типов индуцируемого фитоиммунитета.

В чем же тогда принципиальные различия в эффектах (количественный и качественный), достигаемых при ПАМП- и эффектор-индуцируемой устойчивости? **Во-первых**, как правило, фенотипическим различием количественной и качественной устойчивости является то, что эффектор-индуцируемый фитоиммунный ответ, опосредованный R-белками, сопряжен с запуском особого типа программируемой клеточной смерти, которая называется *реакцией гиперчувствительности (РГЧ)*

(см. главу 5.3). В рамках РГЧ строго в месте инвазии патогена происходит мощнейший «окислительный взрыв», сопряженный с накоплением токсичных соединений, который убивает растительные клетки вместе с патогенным микроорганизмом. Другими словами, растение «жертвует» ограниченным количеством собственных клеток ради спасения своей жизни. Развитие РГЧ рассматривается как ключевой маркер активации качественной устойчивости, поскольку этот тип программируемой клеточной смерти не характерен для ПАМП-индуцируемых иммунных ответов (Kliebenstein, Rowe, 2008). Хотя, следует отметить, что в некоторых случаях качественная устойчивость может быть разобщена с индукцией РГЧ. Это было продемонстрировано на мутантных формах растений, которые без признаков РГЧ проявляли эффектор-зависимую устойчивость при участии R-белков (Gassmann, 2005; Coll et al., 2010; Heidrich et al., 2011). В связи с этим вопрос о том, является РГЧ причиной или следствием повышения устойчивости растений, остается дискуссионным.

Окислительный взрыв при РГЧ происходит в первую очередь из-за активации мембраносвязанной НАДФН-оксидазы (рис. 5.3.2). Иногда в рамках РГЧ выявляют молекулярных «игроков» других типов программируемой клеточной смерти: апоптозоподобной и «аутофагической» (см. главу 5.3). Так, например, в ходе РГЧ может происходить активация каспазоподобных ферментов — маркеров апоптозоподобной смерти (Coll et al., 2010). В РГЧ, которые индуцируются опосредованно R-белками семейства TIR-NB-LRR, задействованы ATG-белки — участники программируемой смерти по типу аутофагии; при этом ATG-белки не участвуют в РГЧ, опосредованной CC-NB-LRR-семейством R-белков (Hofius et al., 2009). Это означает, что в зависимости от конкретной ситуации фенотипически сходные РГЧ могут реализовываться по разным механизмам. Более того, оказалось, что необходимость компонентов системы аутофагии для развития РГЧ может определяться возрастом растения и условиями освещенности (Yoshimoto et al., 2009).

Во-вторых, различия количественной и качественной устойчивости связаны с силой защитных реакций. Считается, что количественная устойчивость менее «сильная»; и связывают это с тем, что при ее индукции включаются механизмы негативной обратной связи, которые позволяют контролировать силу ответного удара и не тратить чрезмерное количество ресурсов на борьбу со слабыми патогенами (не имеющими эффекторных белков для подавления ПАМП-индуцируемого иммунитета) (Katagiri, Tsuda, 2010). Наличие у микроорганизма эффектора, подавляющего количественный или качественный иммунитет, по всей видимости, сигнализирует растению (в случае наличия соответствующего R-белка) об инвазии очень сильного высокоспециализированного опасного патогена. Поэтому при восприятии эффектора, «без оглядки» на количество расходуемых ресурсов, растение максимально реализует фитоиммунный потенциал, чтобы подавить наступление сильного противника (Kombrink, Schmelzer, 2001; Jones, Dangl, 2006). Существующая на сегодняшний день концепция гласит, что разная амплитуда (сила) одних и тех же физиологических ответов при количественной и качественной устойчивости достигается благодаря альтернативным путям передачи сигналов

от разных типов элиситоров (ПАМП и эффекторы). При этом передача сигнала от эффекторов не сопряжена с механизмами негативной обратной связи, благодаря чему защитные реакции активируются на все сто процентов (Kombrink, Schmelzer, 2001; Gassmann, Bhattacharjee, 2012). Одним из подтверждений этого является репрессия негативных регуляторов количественной устойчивости при развитии эффектор-индуцируемого иммунитета (Kunkel, Brooks, 2002).

К сожалению, **механизмы передачи сигнала** при индукции качественной устойчивости не выяснены. Выявлены лишь некоторые участники этого процесса. Сигнал от R-белков семейства TIR-NB-LRR передается опосредованно белком EDS1, а цепь передачи сигнала от белков R-белков семейства CC-NB-LRR включает NDR1 (Aarts et al., 1998). Правда, связующие звенья между R-белками и EDS1/NDR1, а также последующие компоненты сигнальной цепи не установлены. Сложность идентификации «передатчиков» сигналов, активирующих качественный иммунитет, связана с тем, что эффектор-индуцируемая устойчивость реализуется на фоне количественной, поскольку первыми воспринимаемыми элиситорами при атаке патогенов являются ПАМП, а не эффекторы (Tsuda, Katagiri, 2010; Thomma et al., 2011). Кроме того, есть предположение, что сигнальные цепи, передающие сигнал от эффекторов, — вырожденные; то есть выявление этих цепей с помощью мутагенеза затруднено тем, что «отключение» одной из них могут компенсировать другие (Gassmann, Bhattacharjee, 2012).

Поскольку качественный иммунитет сопряжен с индукцией программируемой клеточной смерти (РГЧ), в растении должны существовать механизмы подавления распространения этой реакции за пределами области инвазии патогена. Для предотвращения избыточной гибели клеток при эффектор-индуцируемом иммунитете используются механизмы аутофагии, которая может подавлять РГЧ. У форм растений, мутантных по генам *ATG* или со сниженной экспрессией этих генов, зона РГЧ при индукции качественной устойчивости значительно увеличивается по сравнению с таковой у растений дикого типа. Аутофагия при этом подавляет действие салициловой кислоты — одного из основных активаторов РГЧ (Yoshimoto et al., 2009). Кроме того, салицилат-опосредованная система сигнализации организована таким образом, чтобы и обеспечить развитие РГЧ в месте инвазии патогена, и подавить распространение этой реакции за пределы зоны инфицирования. Ключевым регулятором при этом служит белок NPR1 (Non-expresser of pathogenesis-related genes 1) (Fu et al., 2012). Подробнее про салицилат-зависимую сигнализацию можно прочитать в главе 6.3.

Несмотря на высокую эффективность качественного иммунитета для элиминации фитопатогенов, у этого типа устойчивости есть два недостатка. Во-первых, активация качественной устойчивости сопряжена с расходом значительных энергетических ресурсов; это самый «дорогой» способ защиты от биотических стрессоров (Tian et al., 2003). Во-вторых, эффективность качественного иммунитета, почти всегда сопряженного с РГЧ, как правило, недолговечна в эволюционном плане. РГЧ — это самый мощный защитный ответ, который накладывает значительное селективное давление на популяцию

микроорганизма, индуцируя сильный мутационный процесс у патогена. В результате в популяции бактерий закрепляется генетический вариант клеток, который оказывается способным «ускользнуть» от качественного иммунитета и вызывать развитие патологий у хозяина (Block et al., 2008). Это подтверждается как экспериментальной работой, демонстрирующей динамичное изменение нуклеотидных последовательностей генов эффекторов ксантомонад при взаимодействии этих бактерий с устойчивыми видами растений (Trivedi, Wang, 2014), так и практикой внедрения R-генов в растительные геномы с целью выведения устойчивых к фитопатогенам сортов сельскохозяйственных культур. Привнесенные R-гены в этом случае обеспечивают реципиентов устойчивостью лишь в течение некоторого количества вегетационных сезонов; затем появляются штаммы (расы) патогенов, которые оказываются вирулентными в отношении новой генетической разновидности растения-хозяина (Kottapalli et al., 2010; Li et al., 2013). Подобный способ преодоления патогеном усовершенствованных систем обороны хозяина как раз и отражает рассмотренная выше эволюционная модель «зигзаг» (рис. 6.2.2) (Jones, Dangl, 2006).

Системная приобретенная устойчивость

Описанные выше реакции в рамках эффектор-индуцируемой устойчивости характерны для ограниченной области растения, а именно — места инвазии патогенного организма; то есть эти физиологические ответы отражают так называемый локальный качественный фитоиммунитет. В то же время эти локальные изменения вызывают системное физиологическое преобразование неинфицированных участков, то есть всего растения в целом, что выражается его устойчивостью к широкому кругу патогенов. Такое явление было названо **системной приобретенной устойчивостью (СПУ)** (systemic acquired resistance, SAR) (Durrant, Dong, 2004). В предыдущей главе говорилось, что ПАМП, индуцирующие количественную устойчивость, также способны вызывать системную устойчивость, названную индуцируемой системной устойчивостью, молекулярные критерии которой пока остаются загадкой. СПУ, являющаяся следствием локальной эффектор-индуцируемой устойчивости, исследована в значительно большей степени.

При СПУ в неинфицированных тканях увеличивается содержание защитных PR-белков и, как и в случае индуцируемой системной устойчивости, осуществляется подготовка («прайминг») к активации защитных систем (Jung et al., 2009). Подобный «прайминг» является действительно эффективным способом защиты и при этом не требующим значительных затрат энергии. Фактически СПУ представляет собой своего рода «иммунную память», формирующуюся после первичной инвазии микроорганизма, которая обеспечивает быструю мобилизацию фитоиммунитета при повторном проникновении патогена в ткани хозяина.

Для того чтобы во всем растении произошли физиологические изменения, определяющие его повышенную устойчивость, из инфицированного участка си-

стемно распространяются специальные сигналы. Первым из выявленных сигналов, индуцирующих СПУ, была салициловая кислота (СК) и ее метиловый эфир. Уровень СК при СПУ повышается системно (Yalpani et al., 1991), а уменьшение ее содержания с помощью гетерологичной экспрессии гена салицилатгидроксилазы препятствует развитию этого типа системной устойчивости (Gaffney et al., 1993).

СК — не единственный сигнал, индуцирующий СПУ. Согласно современным представлениям, СК не является транспортируемым сигналом при активации СПУ. В качестве сигнала, транспортируемого от места инфекции по всему растению, служит азелаиновая кислота, которая системно индуцирует синтез СК (Jung et al., 2009). СК, в свою очередь, через специальные регуляторные белки координирует экспрессию защитных генов (механизм описан в главе 6.3). Еще одним сигналом СПУ является глицерин-3-фосфат, который транспортируется по всему растению и требуется для формирования этого типа устойчивости (Nandi et al., 2004; Chanda et al., 2011). Кроме того, в формировании СПУ также задействован продукт гена *dir1-1*, который предположительно представляет собой липид-переносящий белок. Мутанты по гену *dir1-1* сохраняют способность формировать локальную устойчивость, но не системную (Maldonado et al., 2002). В связи с этим было предположено, что DIR1 отвечает за распространение сигнала липидной природы, ответственного за индукцию СПУ. Таким образом, сигнал, распространяемый при СПУ из области инвазии патогена по всему растению, по всей видимости, не ограничен одним типом молекул, а представляет собой совокупность разных соединений, которые действуют синергично. Восприятие этих сигналов приводит к системному накоплению салициловой кислоты, которая опосредует репрограммирование экспрессии генома и формирование устойчивости.

«Иммунная память» в рамках системной устойчивости может работать не только у непосредственно атакованного патогеном растения, но и у его потомков, передаваясь по наследству следующим поколениям. В основе наследования «иммунной памяти» лежат эпигенетические изменения (метилирование и ацетилирование ДНК и гистонов), происходящие в инфицированных растениях при иммунном ответе (Alvarez et al., 2010; Jaskiewicz et al., 2011). В частности, предполагают, что эти изменения могут приводить к «перетасовке» R-генов, располагающихся в кластерах, и появлению «обновленных» вариантов R-белков, которые увеличивают эффективность индукции фитоиммунитета.

Таким образом, качественная (эффектор-индуцируемая) устойчивость представляет собой эволюционно молодую и динамично развивающуюся форму индуцируемого фитоиммунитета. Этот тип устойчивости активируется при инвазии высокоспециализированных патогенов, способных репрессировать фитоиммунные ответы растения-хозяина с помощью эффекторных белков. Эффекторы патогенов распознаются в растении при участии рецепторных R-белков. Качественная устойчивость, имеющая значительно бóльшую «силу», чем количественная, сопряжена с индукцией одного из типов программируемой клеточной смерти — реакции гиперчувствительности. Следствием индукции качественной устойчи-

ности, проявляющейся локально в месте инфицирования, является активация системной приобретенной устойчивости, которая обеспечивает повышенную резистентность растения к повторному инфицированию патогенами и может наследоваться следующими поколениями.

Литература:

- Aarts, N., Metz, M., Holub, E., Staskawicz, B. J., Daniels, M. J., & Parker, J. E. (1998). Different requirements for EDS1 and NDR1 by disease resistance genes define at least two R gene-mediated signaling pathways in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(17), 10306–10311.
- Alvarez, M. E., Nota, F., & Cambiagno, D. A. (2010). Epigenetic control of plant immunity. *Molecular Plant Pathology*, 11(4), 563–576.
- Baumgarten, A., Cannon, S., Spangler, R., & May, G. (2003). Genome-level evolution of resistance genes in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 165(1), 309–319.
- Bhattacharjee, S., Halane, M. K., Kim, S. H., & Gassmann, W. (2011). Pathogen effectors target *Arabidopsis* EDS1 and alter its interactions with immune regulators. *Science*, 334(6061), 1405–1408.
- Block, A., Li, G., Fu, Z. Q., & Alfano, J. R. (2008). Phytopathogen type III effector weaponry and their plant targets. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(4), 396–403.
- Bogdanove, A. J., Schornack, S., & Lahaye, T. (2010). TAL effectors: finding plant genes for disease and defense. *Current Opinion in Plant Biology*, 13(4), 394–401.
- Büttner, D. (2016). Behind the lines — actions of bacterial type III effector proteins in plant cells. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(6), 894–937.
- Chanda, B., Xia, Y., Mandal, M. K., Yu, K., Sekine, K. T., Gao, Q. M., ... & Kachroo, A. (2011). Glycerol-3-phosphate is a critical mobile inducer of systemic immunity in plants. *Nature Genetics*, 43(5), 421–427.
- Coll, N. S., Vercammen, D., Smidler, A., Clover, C., Van Breusegem, F., Dangl, J. L., & Epple, P. (2010). *Arabidopsis* type I metacaspases control cell death. *Science*, 330(6009), 1393–1397.
- Cui, H., Tsuda, K., & Parker, J. E. (2015). Effector-triggered immunity: from pathogen perception to robust defense. *Annual Review of Plant Biology*, 66, 487–511.
- Cunnac, S., Lindeberg, M., & Collmer, A. (2009). *Pseudomonas syringae* type III secretion system effectors: repertoires in search of functions. *Current Opinion in Microbiology*, 12(1), 53–60.
- De Torres, M., Mansfield, J. W., Grabov, N., Brown, I. R., Ammoun, H., Tsiamis, G., ... & Boch, J. (2006). *Pseudomonas syringae* effector AvrPtoB suppresses basal defence in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 47(3), 368–382.
- Deslandes, L., Olivier, J., Peeters, N., Feng, D. X., Khounlotham, M., Boucher, C., ... & Marco, Y. (2003). Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to

bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(13), 8024–8029.

Dodds, P. N., & Rathjen, J. P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics*, 11(8), 539–548.

Durrant, W. E., & Dong, X. (2004). Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 42, 185–209.

Flor, H. H. (1956). The complementary genic systems in flax and flax rust. *Advances in Genetics*, 8, 29–54.

Flor, H. H. (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology*, 9(1), 275–296.

Fu, Z. Q., Yan, S., Saleh, A., Wang, W., Ruble, J., Oka, N., ... & Dong, X. (2012). NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature*, 486(7402), 228–232.

Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., ... & Ryals, J. (1993). Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science*, 261(5122), 754–754.

Gassmann, W. (2005). Natural variation in the *Arabidopsis* response to the avirulence gene *hopPsyA* uncouples the hypersensitive response from disease resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18(10), 1054–1060.

Gassmann, W., & Bhattacharjee, S. (2012). Effector-triggered immunity signaling: from gene-for-gene pathways to protein-protein interaction networks. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(7), 862–868.

Grant, S. R., Fisher, E. J., Chang, J. H., Mole, B. M., & Dangl, J. L. (2006). Subterfuge and manipulation: type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 60, 425–449.

Hajri, A., Brin, C., Hunault, G., Lardeux, F., Lemaire, C., Manceau, C., ... & Poussier, S. (2009). A «repertoire for repertoire» hypothesis: Repertoires of type three effectors are candidate determinants of host specificity in *Xanthomonas*. *PLoS ONE*, 4(8), e6632.

Heidrich, K., Wirthmueller, L., Tasset, C., Pouzet, C., Deslandes, L., & Parker, J. E. (2011). *Arabidopsis* EDS1 connects pathogen effector recognition to cell compartment-specific immune responses. *Science*, 334(6061), 1401–1404.

Hofius, D., Schultz-Larsen, T., Joensen, J., Tsitsigiannis, D. I., Petersen, N. H., Mattsson, O., ... & Petersen, M. (2009). Autophagic components contribute to hypersensitive cell death in *Arabidopsis*. *Cell*, 137(4), 773–783.

Hutin, M., Pérez-Quintero, A. L., Lopez, C., & Szurek, B. (2015). MorTAL Kombat: the story of defense against TAL effectors through loss-of-susceptibility. *Frontiers in Plant Science*, 6, 535.

Jaskiewicz, M., Peterhansel, C., & Conrath, U. (2011). Detection of histone modifications in plant leaves. *Journal of Visualized Experiments*, (55), e3096.

- Jones, J. D., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323–329.
- Jung, H. W., Tschaplinski, T. J., Wang, L., Glazebrook, J., & Greenberg, J. T. (2009). Priming in systemic plant immunity. *Science*, 324(5923), 89–91.
- Katagiri, F., & Tsuda, K. (2010). Understanding the plant immune system. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23(12), 1531–1536.
- Kay, S., Hahn, S., Marois, E., Hause, G., & Bonas, U. (2007). A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science*, 318(5850), 648–651.
- Khan, M., Subramaniam, R., & Desveaux, D. (2016). Of guards, decoys, baits and traps: pathogen perception in plants by type III effector sensors. *Current Opinion in Microbiology*, 29, 49–55.
- Kim, S. H., Kwon, S. I., Saha, D., Anyanwu, N. C., & Gassmann, W. (2009). Resistance to the *Pseudomonas syringae* effector HopA1 is governed by the TIR-NBS-LRR protein RPS6 and is enhanced by mutations in SRFR1. *Plant Physiology*, 150(4), 1723–1732.
- Kliebenstein, D. J., & Rowe, H. C. (2008). Ecological costs of biotrophic versus necrotrophic pathogen resistance, the hypersensitive response and signal transduction. *Plant Science*, 174(6), 551–556.
- Kombrink, E., & Schmelzer, E. (2001). The hypersensitive response and its role in local and systemic disease resistance. *European Journal of Plant Pathology*, 107(1), 69–78.
- Kottapalli, K. R., Narasu, M. L., & Jena, K. K. (2010). Effective strategy for pyramiding three bacterial blight resistance genes into fine grain rice cultivar, Samba Mahsuri, using sequence tagged site markers. *Biotechnology Letters*, 32(7), 989–996.
- Kunkel, B. N., & Brooks, D. M. (2002). Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(4), 325–331.
- Lewis, J. D., Lee, A. H. Y., Hassan, J. A., Wan, J., Hurley, B., Jhingree, J. R., ... & Desveaux, D. (2013). The *Arabidopsis* ZED1 pseudokinase is required for ZAR1-mediated immunity induced by the *Pseudomonas syringae* type III effector HopZ1a. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(46), 18722–18727.
- Li, Y., Huang, F., Lu, Y., Shi, Y., Zhang, M., Fan, J., & Wang, W. (2013). Mechanism of plant-microbe interaction and its utilization in disease-resistance breeding for modern agriculture. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 83, 51–58.
- Lindeberg, M., Cunnac, S., & Collmer, A. (2012). *Pseudomonas syringae* type III effector repertoires: last words in endless arguments. *Trends in Microbiology*, 20(4), 199–208.
- Mackey, D., Belkhadir, Y., Alonso, J. M., Ecker, J. R., & Dangl, J. L. (2003). *Arabidopsis* RIN4 is a target of the type III virulence effector AvrRpt2 and modulates RPS2-mediated resistance. *Cell*, 112(3), 379–389.
- Maldonado, A. M., Doerner, P., Dixon, R. A., Lamb, C. J., & Cameron, R. K. (2002). A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in *Arabidopsis*. *Nature*, 419(6905), 399–403.
- Martin, G. B. (2012). Suppression and activation of the plant immune system by *Pseudomonas syringae* effectors AvrPto and AvrPtoB. *Effectors in Plant-Microbe Interactions*, 123–154.

Meyers, B. C., Kozik, A., Griego, A., Kuang, H., & Michelmore, R. W. (2003). Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, *15*(4), 809–834.

Nandi, A., Welti, R., & Shah, J. (2004). The *Arabidopsis thaliana* dihydroxyacetone phosphate reductase gene *SUPPRESSOR OF FATTY ACID DESATURASE DEFICIENCY1* is required for glycerolipid metabolism and for the activation of systemic acquired resistance. *The Plant Cell*, *16*(2), 465–477.

Navarro, L., Zipfel, C., Rowland, O., Keller, I., Robatzek, S., Boller, T., & Jones, J. D. (2004). The transcriptional innate immune response to flg22. Interplay and overlap with Avr gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. *Plant Physiology*, *135*(2), 1113–1128.

Poland, J. A., Balint-Kurti, P. J., Wissler, R. J., Pratt, R. C., & Nelson, R. J. (2009). Shades of gray: the world of quantitative disease resistance. *Trends in Plant Science*, *14*(1), 21–29.

Robert-Seilaniantz, A., Shan, L., Zhou, J. M., & Tang, X. (2006). The *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 type III effector HopF2 has a putative myristoylation site required for its avirulence and virulence functions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *19*(2), 130–138.

Russell, A. R., Ashfield, T., & Innes, R. W. (2015). *Pseudomonas syringae* effector AvrPphB suppresses AvrB-induced activation of RPM1 but not AvrRpm1-induced activation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *28*(6), 727–735.

Spoel, S. H., & Dong, X. (2012). How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature Reviews Immunology*, *12*(2), 89–100.

Takken, F. L. W., & Tameling, W. I. L. (2009). To nibble at plant resistance proteins. *Science*, *324*(5928), 744–746.

Takken, F. L., & Govere, A. (2012). How to build a pathogen detector: structural basis of NB-LRR function. *Current Opinion in Plant Biology*, *15*(4), 375–384.

Thilmony, R. L., Chen, Z., Bressan, R. A., & Martin, G. B. (1995). Expression of the tomato Pto Gene in tobacco enhances resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* expressing AvrPto. *The Plant Cell*, *7*(10), 1529–1536.

Thomma, B. P., Nürnberger, T., & Joosten, M. H. (2011). Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. *The Plant Cell Online*, *23*(1), 4–15.

Tian, D., Traw, M. B., Chen, J. Q., Kreitman, M., & Bergelson, J. (2003). Fitness costs of R-gene-mediated resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, *423*(6935), 74–77.

Tian, D., Wang, J., Zeng, X., Gu, K., Qiu, C., Yang, X., ... & White, F. F. (2014). The rice TAL effector-dependent resistance protein XA10 triggers cell death and calcium depletion in the endoplasmic reticulum. *The Plant Cell*, *26*(1), 497–515.

Trivedi, P., & Wang, N. (2014). Host immune responses accelerate pathogen evolution. *The ISME Journal*, *8*(3), 727–731.

Tsuda, K., & Katagiri, F. (2010). Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, *13*(4), 459–465.

van der Hoorn, R. A., & Kamoun, S. (2008). From guard to decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors. *The Plant Cell*, *20*(8), 2009–2017.

Vanderplank, J. E. (2012). Disease resistance in plants. Elsevier. Academic Press.

Wilton, M., Subramaniam, R., Elmore, J., Felsensteiner, C., Coaker, G., & Desveaux, D. (2010). The type III effector HopF2 Pto targets *Arabidopsis* RIN4 protein to promote *Pseudomonas syringae* virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(5), 2349–2354.

Yalpani, N., Silverman, P., Wilson, T. M., Kleier, D. A., & Raskin, I. (1991). Salicylic acid is a systemic signal and an inducer of pathogenesis-related proteins in virus-infected tobacco. *The Plant Cell*, 3(8), 809–818.

Yoshimoto, K., Jikumaru, Y., Kamiya, Y., Kusano, M., Consonni, C., Panstruga, R., ... & Shirasu, K. (2009). Autophagy negatively regulates cell death by controlling NPR1-dependent salicylic acid signaling during senescence and the innate immune response in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 21(9), 2914–2927.

Zhang, J., Shao, F., Li, Y., Cui, H., Chen, L., Li, H., ... & Chen, S. (2007). A *Pseudomonas syringae* effector inactivates MAPKs to suppress PAMP-induced immunity in plants. *Cell Host & Microbe*, 1(3), 175–185.

6.3. Фитогормоны в регуляции иммунного ответа

Большинство (если не все) физиологических процессов в растениях координируется фитогормонами. Взаимодействие растений и фитопатогенов сопряжено с динамичным изменением гормонального статуса хозяина. От того, как меняется гормональный баланс в растении, во многом зависит степень его устойчивости/восприимчивости к конкретному патогену. Изменение гормонального фона в растении при инфекции может быть результатом как оборонительной стратегии хозяина, направленной на увеличение устойчивости, так и обманной тактики патогена, который с помощью эффлекторов, фитотоксинов и других факторов вирулентности может, воздействуя на гормональные системы макроорганизма, менять его физиологию в «правильном» для себя направлении. Среди фитогормонов ключевая роль во взаимодействии растений с микроорганизмами отводится так называемым «защитным» гормонам биотического стресса — салициловой и жасмоновой кислотам и их производным, а также этилену. В то же время влияние других фитогормонов (ауксина, гиббереллинов, цитокининов, абсцизовой кислоты (АБК)) на процесс формирования патологической системы может тоже быть весьма значительным (Robert-Seilaniantz et al., 2011). Нельзя не отметить, что, поскольку все системы гормональной регуляции функционируют в рамках единой сигнальной сети, изменения в работе отдельно взятой гормональной системы при инфекции могут отражаться на функционировании других (Robert-Seilaniantz et al., 2007; Bari, Jones, 2009). Поэтому бывает сложно однозначно определить, влияет ли определенный гормон на формирование патосистемы напрямую или он служит в качестве посредника, который действует на другие гормональные системы, непосредственно вовлеченные во взаимодействие патогена и хозяина.

Салициловая кислота

Самым «популярным» гормоном биотического стресса является салициловая кислота (СК). Хотя СК регулирует ряд физиологических процессов, не связанных напрямую с защитными реакциями (цветение, цианид-устойчивое дыхание и термогенез), основная ее роль связана с координированием ответных реакций на фитопатогены (Vlot et al., 2009; Медведев, Шарова, 2011). Этот фитогормон служит в качестве обязательного регулятора реакции гиперчувствительности (РГЧ) и системной приобретенной устойчивости (СПУ), а также количественной устойчивости (см. главы 6.1, 6.2). При развитии РГЧ накопление АБК в растительных тканях приводит, в том числе к усилению биосинтеза СК, которая, в частности, ингибирует каталазу — фермент, осуществляющий детоксикацию перекиси водорода. В результате этого происходит «окислительный взрыв», который и вызывает элиминацию патогенного организма (Дьяков и др., 2001; Vlot et al., 2009; Медведев, Шарова, 2011). В рамках системной приобретенной устойчивости активация синтеза СК осуществляется на системном уровне (но более низком, чем при РГЧ); при этом СК в первую очередь служит в качестве сигнала, оптимизирующего интенсивность транскрипции защитных генов.

СК в растениях синтезируется из хоризмовой кислоты двумя различными способами. В одном случае хоризмовая кислота преобразуется до фенилаланина, который с помощью фенилаланин-аммиак-лиазы превращается в коричневую кислоту. Последняя затем окисляется до бензойной или кумаровой кислот, из которых синтезируется СК. В другом случае хоризмовая кислота метаболизируется до СК через изохоризмат с помощью ферментов изохоризмат-синтазы и изохоризмат-пируват-лиазы (Vlot et al., 2009; Медведев, Шарова, 2011).

Одним из основных компонентов пути передачи сигнала СК служит белок NPR1 (Non-expresser of pathogenesis-related genes 1) (Dong, 2004). В отсутствие СК NPR1 локализован в цитоплазме, где он формирует мультимеры. Увеличение содержания СК приводит к изменению редокс-статуса клетки (Mou et al., 2003), что ведет к диссоциации NPR1-комплексов и миграции мономеров NPR1 в ядро. В ядре NPR1 связывается с факторами регуляции транскрипции, что активирует экспрессию СК-индуцируемых генов (Dong, 2004). Однако только изменением локализации NPR1 механизм регуляции СК-зависимых ответов не ограничивается. В дополнение к редокс-статусу клетки содержание NPR1 в ядре контролируют связывающие СК белки NPR3 и NPR4 (Fu et al., 2012).

NPR3 и NPR4 в зависимости от уровня СК могут играть роль адаптеров между NPR1 и убиквитин-лигазным комплексом (CUL3), который «метит» NPR1 для деградации в протеасомах, что негативным образом сказывается на процессе передачи СК-сигнала. СК при этом регулирует процесс формирования комплексов NPR1/NPR3 и NPR1/NPR4 и, следовательно, стабильность и активность NPR1 (рис. 6.3.1). Принципы работы NPR3 и NPR4 различаются, что и обеспечивает оптимизацию механизмов действия СК. Эти два белка, во-первых, обладают разной аффинностью к СК. Во-вторых, NPR4 при связывании с СК теряет способность обеспечивать деградацию NPR1, а NPR3, наоборот, приобретает (Fu et al., 2012).

В отсутствие патогена, когда концентрация СК в растениях низкая, NPR4 обеспечивает разрушение большей части NPR1 в результате CUL3^{NPR4}-зависимой деградации. Такая деградация необходима для того, чтобы предотвратить активацию защитных реакций в неинфицированном патогеном растении (рис. 6.3.1 А) (Fu et al., 2012). При этом базовый уровень СК способствует диссоциации части NPR1/NPR4-комплексов, что поддерживает в клетке определенный уровень NPR1, необходимый для нормального функционирования растительного организма (Wildermuth et al., 2001; Nawrath et al., 2002).

Повышение уровня СК при индукции количественной или системной приобретенной устойчивости «инактивирует» NPR4, благодаря чему в ядре накапливается NPR1, что способствует активации экспрессии СК-зависимых генов (рис. 6.3.1 Б). При развитии качественной устойчивости, сопряженной с индукцией РГЧ, в растении формируется градиент концентрации СК; при этом ее максимальный уровень (гораздо больший, чем при количественной и системной приобретенной устойчивости) достигается в месте инвазии патогена (Jones, Dangl, 2006; Fu et al., 2012). В этой области, где развивается РГЧ, концентрация СК становится достаточной для активации NPR3, который обеспечивает

CUL3^{NPR3}-зависимый протеолиз NPR1 (рис. 6.3.1 В). Разрушение NPR1 в зоне инфицирования имеет важное значение, поскольку этот белок подавляет развитие РГЧ (Rate, Greenberg, 2001).

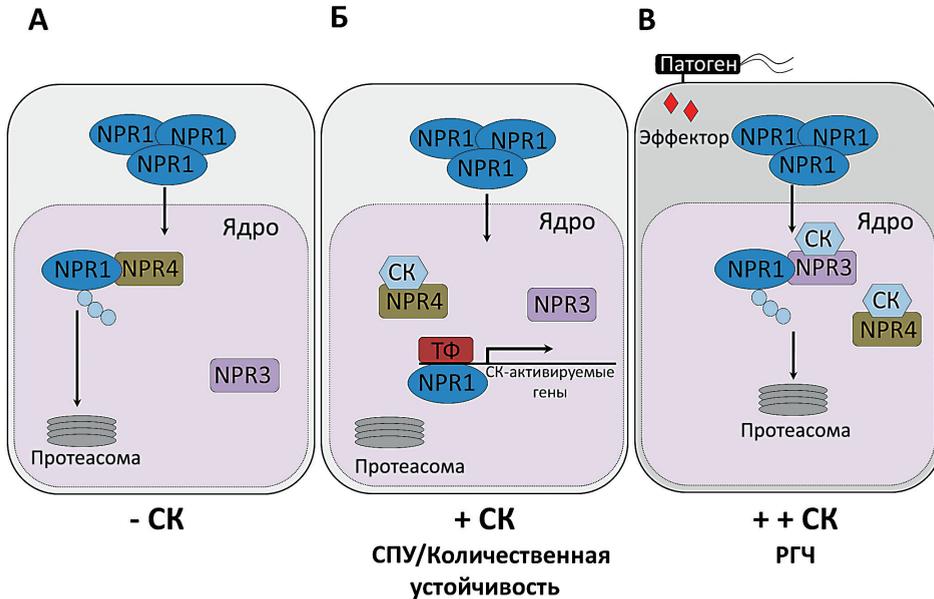


Рис. 6.3.1. Схема передачи сигнала салициловой кислоты (СК) (по: Fu et al., 2012 с модификациями). В присутствии СК происходит распад гомологичных мультимеров NPR1, и мономеры NPR1 транспортируются в ядро. **А** — в отсутствие СК NPR1 взаимодействует с NPR4, что приводит к убиквитинированию и последующему протеолизу NPR1. **Б** — при увеличении содержания СК до определенного уровня (характерного для количественной устойчивости и системной приобретенной устойчивости) этот фитогормон связывается с NPR4 (но не с NPR3) и препятствует взаимодействию NPR4 с NPR1. При этом NPR1 взаимодействует с СК-регулируемыми факторами регуляции транскрипции (ТФ) и активирует транскрипцию СК-индуцируемых генов. **В** — при максимальном уровне СК, характерном для зоны развития реакции гиперчувствительности (РГЧ), этот фитогормон связывается и с NPR4, и с NPR3. NPR3 при связывании с СК взаимодействует с NPR1 и активирует его протеолиз. Это обеспечивает возможность индукции РГЧ, негативным регулятором которой является NPR1. Дополнительные пояснения к рисунку — в тексте.

Таким образом, в зоне РГЧ СК не столько выполняет функцию регулятора экспрессии генов, сколько индуктора «окислительного взрыва» за счет активации проокислительных и инактивации антиоксидантных систем растительной клетки (Chen et al., 1993; Conrath et al., 1995). При этом за пределами области РГЧ, из-за меньшего уровня СК, CUL3^{NPR3}-зависимой деградации NPR1 не про-

исходит, что обеспечивает индукцию СК-регулируемых генов и формирование системной приобретенной устойчивости, а также подавляет избыточное распространение РГЧ вследствие высокого уровня NPR1 (рис. 6.3.1 Б). Таким образом, два рецептора СК (NPR3 и NPR4) регулируют содержание NPR1 (активатор экспрессии СК-индуцируемых генов и одновременно ингибитор РГЧ) при разных концентрациях этого фитогормона (Fu et al., 2012). Благодаря такому устройству СК-опосредуемой гормональной системы, СК (в зависимости от ее содержания) может контролировать разнообразные процессы (количественная, качественная и системная приобретенная устойчивость) в клетках растений (Delaney et al., 1994).

Важная роль СК в защитном ответе растений была продемонстрирована во множестве экспериментальных работ. Многие из них основаны на анализе трансгенных растений, экспрессирующих ген *nahG*, который кодирует салицилат-гидролазу — фермент, разрушающий СК. В таких растениях в процессе инфекции не накапливается СК и не развивается системная приобретенная устойчивость. Это приводит к увеличению восприимчивости растений как к вирулентным, так и к авирулентным патогенам (Gaffney et al., 1993; Delaney et al., 1994; Vernooij et al., 1994; Lawton et al., 1995). При блокировке экспрессии гена, кодирующего фенилаланин-аммиак-лиазу (один из ферментов биосинтеза СК), растения также проявляют бóльшую восприимчивость по сравнению с диким типом и не способны активировать системную приобретенную устойчивость (Pallas et al., 1996; Nawrath, Métraux, 1999; Wildermuth et al., 2001; Nawrath et al., 2002). В то же время мутанты со сверхпродукцией СК характеризуются повышенной устойчивостью к биотрофным патогенам (Kachroo et al., 2001, 2005; Shah et al., 2001; Nandi et al., 2005).

Несмотря на то, что салициловая кислота является ключевым сигналом защитного ответа у растений, ее участие в растительно-микробных взаимодействиях неоднозначно. Высокий уровень СК не всегда сопряжен с повышением устойчивости растений. В некоторых случаях, наоборот, накопление СК необходимо для успешной колонизации организма хозяина патогенными организмами. Так, развитие симптомов заболевания, вызываемого *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, сопряжено с повышением уровня СК в растении; при этом у мутантных растений со сниженным содержанием СК после инфицирования этим патогеном симптомы заболевания не формируются, а экзогенное внесение салицилата восстанавливает характерную для дикого типа симптоматику (O'Donnell et al., 2001). Некротрофные патогены могут индуцировать повышение уровня СК, чтобы вызвать локальную гибель клеток хозяина, приводящую к высвобождению из них питательного субстрата (Govrin, Levine, 2000). Для биотрофных псевдомонад также была показана необходимость СК для индукции формирования симптомов заболевания у растений (Greenberg et al., 2000). Таким образом, увеличение содержания СК при инфекции требуется как для индуцируемой устойчивости, так и для индуцируемой восприимчивости; сценарий взаимоотношений патогена и хозяина при этом, по всей видимости, определяется степенью и амплитудой активации СК-зависимой гормональной системы.

Жасмоновая кислота и этилен

В рамках ответных реакций на биотические стрессоры жасмоновая кислота (ЖК) и этилен обычно работают в «тандеме» (Xu et al., 1994; Penninckx et al., 1998; Pieterse et al., 1998; Thomma et al., 2001; Glazebrook, 2005). Регулоны этих двух фитогормонов в значительной степени перекрываются, а индукция одной из этих систем часто приводит к активации второй (Schenk et al., 2000). Так, например, ЖК индуцирует экспрессию гена этилен-чувствительного фактора регуляции транскрипции ERF1 (Memelink, 2009). Несмотря на агонистическое действие этих двух систем при биотическом стрессе, в отсутствие патогенного организма ЖК и этилен контролируют в растении разные физиологические процессы (Davies, 2012).

Хотя ЖК рассматривают в первую очередь как регулятор защитных ответов, этот фитогормон также координирует в растениях ряд процессов, не связанных с патогенезом (деление и растяжение клеток, старение, прорастание семян, развитие пыльцы, созревание плодов, формирование клубней, рост корня, тигмоморфогенез) (Wasternack et al., 2006; Reinbothe et al., 2009; Медведев, Шарова, 2011). ЖК служит ключевым компонентом защиты от насекомых-фитофагов, но при этом она также играет важную роль во взаимодействии растений и микроорганизмов.

ЖК и жасмонаты относятся к продуктам перекисного окисления жирных кислот. В растениях они синтезируются в результате окисления линоленовой кислоты при участии липоксигеназ. Образующиеся при этом продукты — гидроперекиси жирных кислот — через каскад реакций, катализируемых алленоксидсинтазами и алленоксидциклазами, преобразуются до ЖК (Creelman, Mullet, 1995, 1997; Wasternack, 2007). В рецепции ЖК принимают участие белок COI1, который является компонентом убиквитин-лигазного комплекса, а также группа белков, называемых JAZ (Jasmonate ZIM-domain). JAZ-белки, связываясь с фактором регуляции транскрипции MYC2, препятствуют экспрессии ЖК-индуцируемых генов (Memelink, 2009). Жасмонаты, в свою очередь, служат в качестве «молекулярного клея», который обеспечивает взаимодействие COI1 и JAZ-белков. В результате этого JAZ-белки убиквитинируются и в дальнейшем подвергаются протеолизу, что приводит к дерепрессии ЖК-индуцируемых генов (рис. 6.3.2). Передача ЖК-сигнала в растениях регулируется по принципам как положительной, так и отрицательной обратной связи. С одной стороны, ЖК активирует экспрессию генов, кодирующих ферменты ее собственного биосинтеза (положительная обратная связь) (Pieterse et al., 2012). С другой стороны, к ЖК-индуцируемым генам принадлежат гены JAZ-белков — негативных регуляторов передачи ЖК-сигнала (отрицательная обратная связь) (Shoji et al., 2008; Memelink, 2009; Soitamo et al., 2012). Сочетание принципов позитивной и негативной обратной связи в регуляции ЖК-опосредуемой гормональной системы, по всей видимости, обеспечивает возможность тонкой оптимизации работы этой системы, а также силы и амплитуды защитных ответов, координируемых этим фитогормоном.

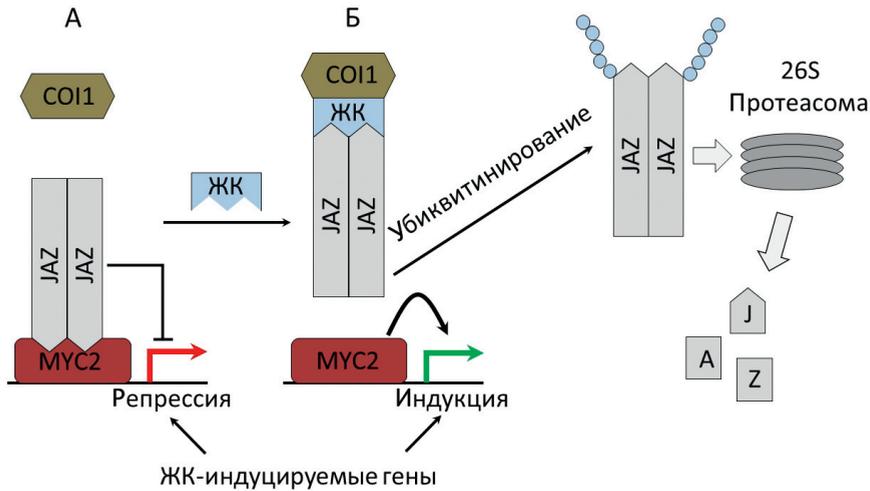


Рис. 6.3.2. Схема передачи сигнала жасмоновой кислоты (ЖК) (по: Memelink, 2009).

А — в отсутствие ЖК JAZ-белки репрессируют ЖК-регулируемые факторы транскрипции (MYC2) и препятствуют экспрессии ЖК-индуцируемых генов.

Б — ЖК обеспечивает взаимодействие JAZ-белков с компонентом убиквитин-лигазного комплекса COI1, что приводит к убиквитинированию и последующему протеолизу JAZ-белков и активации экспрессии ЖК-индуцируемых генов.

Дополнительные пояснения к рисунку — в тексте.

Роль **этилена** в растении многопланова. Этот фитогормон регулирует процессы созревания плодов, прорастания семян, старения, опадения плодов и листьев, подавления роста клеток растяжением, развития цветков, образования корневых волосков (Wang et al., 2013). Этилен также участвует в ответных реакциях растений на различные абиотические стрессовые факторы: колебание температуры, пониженное содержание кислорода, засуха, механическое повреждение (Полевой, 1989; Медведев, Шарова, 2011). В то же время этилен задействован и в координировании ответных реакций растений на патогенные организмы.

В растениях этилен синтезируется из 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты, которая является интермедиатом метаболизма метионина. В рецепции этилена принимают участие несколько белков: ETR1, ETR2, EIN4, ERS1, ERS2 (рис. 6.3.3). Эти рецепторы локализованы в мембранах ЭПР или аппарата Гольджи и в отсутствие этилена активируют цитоплазматическую киназу CTR1 (Guo, Ecker, 2004; Cho, Yoo, 2015). CTR1 является негативным регулятором компонентов передачи этиленового сигнала: 1) МАП-киназного каскада, непосредственно активирующего этилен-регулируемые факторы транскрипции, и 2) белка EIN2 (рис. 6.3.3). В отсутствие этилена EIN2 подвергается CTR1-опосредуемому фосфорилированию, которое влечет за собой распознавание EIN2 компонентами убиквитин-лигазного комплекса ETP1 и ETP2 и дальнейшее разрушение EIN2 в протеасомах (Qiao et al., 2009; Ju et al., 2012). При связывании этилена с рецепто-

рами происходит инактивация CTR1, приводящая к дерепрессии МАП-киназного каскада и подавлению фосфорилирования и последующего протеолиза EIN2. Роль EIN2, локализованного, как и рецепторы этилена, в мембранах ЭПР или аппарата Гольджи, в активации этилен-зависимых ответов заключается в обеспечении димеризации этилен-регулируемых факторов транскрипции (EIN3 и EIL1), которая необходима для индукции экспрессии целевых генов (Alonso et al., 1999). Димеризацию EIN3 и EIL1 обеспечивает С-конец EIN2 (EIN2C), который отщепляется от мембраносвязанной части белка при участии специфической протеазы и затем доставляется в ядро (рис. 6.3.3) (Zhu et al., 2011).

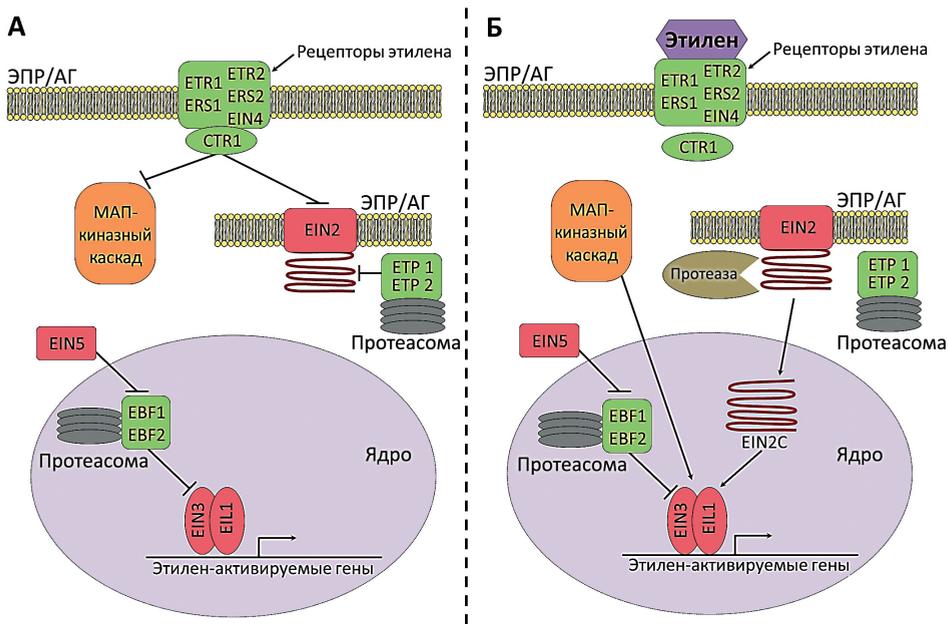


Рис. 6.3.3. Схема передачи сигнала этилена (по: Cho, Yoo, 2015 с модификациями).

А — в отсутствие этилена его рецепторы (ETR1, ERS1, ETR2, ERS2, EIN4), расположенные в мембранах ЭПР и аппарата Гольджи, активируют негативный регулятор этилен-индуцируемых ответов CTR1. CTR1 репрессирует МАП-киназный каскад, индуцирующий этилен-регулируемые факторы транскрипции (EIN3 и EIL1), а также обеспечивает ETP1/ETP2-зависимый протеолиз белка EIN2, который тоже активирует этилен-регулируемые факторы транскрипции (EIN3 и EIL1).

Б — в присутствии этилена происходит инактивация CTR1, что приводит к дерепрессии МАП-киназного каскада и подавлению протеолиза EIN2. От EIN2 с помощью протеазы отщепляется С-концевая область, которая транспортируется в ядро и обеспечивает димеризацию факторов регуляции транскрипции (EIN3 и EIL1), необходимую для активации экспрессии этилен-индуцируемых генов. EIN3 и EIL1 могут подвергаться EBF1/EBF2-зависимому протеолизу, который негативно регулируется EIN5 — рибонуклеазой, разрушающей транскрипты генов EBF1 и EBF2.

Дополнительные пояснения к рисунку — в тексте.

Этилен-индуцируемые факторы транскрипции EIN3 и EIL1, в рамках негативной регуляции передачи сигнала, тоже могут подвергаться убиквитинированию при участии белков EBF1 и EBF2 и разрушаться в протеасомах. Причем экспрессия генов EBF1 и EBF2 индуцируется этиленом, что формирует негативную обратную связь в механизме передачи сигнала этого фитогормона. В свою очередь, EBF1- и EBF2-зависимой деградации EIN3 и EIL1 может препятствовать белок EIN5, который, благодаря наличию 5'-3'-экзорибонуклеазной активности, разрушает транскрипты генов EBF1 и EBF2 и таким образом препятствует протеолизу EIN3 и EIL1 (рис. 6.3.3) (Cho, Yoo, 2015).

Роль ЖК и этилена в активации защитных реакций растений была неоднократно продемонстрирована. Эти фитогормоны совместно могут индуцировать синтез фитоалексинов, PR-белков, а также лигнификацию (Knoester et al., 1998; Adie et al., 2007a). Показано, что конститутивная активация ЖК- и этилен-опосредованных гормональных систем с помощью генетических модификаций может приводить к увеличению устойчивости растений к фитопатогенам, а репрессия этих систем, наоборот, способствовать увеличению восприимчивости (Thomma et al., 1998; Ellis, Turner, 2001; Ellis et al., 2002; McGrath et al., 2005). Этилен является ключевым регулятором образования в сосудах ксилемы тилл и гелей, которые блокируют водный транспорт (см. главу 5.1) (Lund et al., 1998; Perez-Donoso et al., 2007; Balaji et al., 2008). Формирование тилл и гелей в некоторых случаях может представлять собой защитную реакцию, которая предотвращает системное распространение микроорганизмов с транспирационным током и поэтому негативным образом сказывается на развитии патогена в растении (Wallis, Truter, 1978; Hilaire et al., 2001). Этилен и ЖК также опосредуют развитие индуцируемой системной устойчивости, которая формируется во всем растении в рамках активации ПАМП-индуцируемого иммунитета (см. главу 6.1) (Farmer, Ryan, 1992; Penninckx et al., 1998; Pieterse et al., 1998; Pieterse et al., 2000).

В то же время ЖК и этилен могут активировать такие реакции растений, которые не увеличивают, а, наоборот, снижают их устойчивость к фитопатогенам. Так, например, регулируемое этиленом образование тилл и гелей для некоторых микроорганизмов является препятствием для эффективной колонизации растения, а для других бактерий, образование этих структур может быть необходимым условием для взаимодействия с хозяином (VanderMolen et al., 1977; Boher et al., 1995; James et al., 2002; Vaccari, Lindow, 2011). Это, по-видимому, связано с тем, что колонизация сосудов может быть затруднена интенсивным водным потоком, который создает «хаос» в популяции микробов и препятствует их межклеточной коммуникации, необходимой для проявления вирулентности (см. главу 4.1). Образование тилл и гелей, в свою очередь, может значительно снизить интенсивность транспирационного потока и «приспособить» таким образом сосуды ксилемы для жизни микроорганизмов.

Некоторые микроорганизмы «специально» активируют ЖК/этилен-опосредуемые ответы для запуска так называемой индуцируемой восприимчивости растения-хозяина (Da Cunha et al., 2007; Xin, He, 2013). Индуцируемая воспри-

имчивость, по сути, представляет собой совокупность патоген-индуцируемых ответов растений, которые не увеличивают, а, наоборот, снижают его устойчивость (подробно про индуцируемую восприимчивость написано в главе 7). Например, некоторые патогены при колонизации растений через активацию ЖК/этиленопосредуемых гормональных систем индуцируют у хозяина процессы естественного старения (*disease resemble senescence*), что является необходимым аспектом формирования патологий. При этом этилен- и ЖК-нечувствительные мутанты растений, проявляют устойчивость к этим патогенам (Bent et al., 1992; Knoester et al., 1998; Lund et al., 1998; Thatcher et al., 2009).

Направленная индукция «защитных» гормональных систем растения-хозяина со стороны фитопатогенного организма может быть нацелена на подавление таких иммунных ответов растения, к которым микроорганизм в наибольшей степени восприимчив (Da Cunha et al., 2007; Kazan, Lyons, 2014). Защитные ответы растений часто подразделяют на две категории в зависимости от того, какие гормональные системы их активируют. К одной категории относятся СК-индуцируемые ответы, а ко второй — реакции, опосредуемые ЖК/этиленом. Эти два типа ответов в основном взаимодействуют антагонистически, вследствие чего в растении обычно не могут активироваться сразу и ЖК/этилен-, и СК-регулируемые реакции (Thaler et al., 2002; Robert-Seilaniantz et al., 2011). Поэтому при взаимодействии с бактериями растениям приходится «выбирать» только одну из возможных стратегий оборонительной реакции (либо СК-, либо ЖК/этилен-зависимую) в зависимости от характеристик атакующего патогенного микроорганизма. Большинство патогенов имеет разную степень чувствительности к СК- и ЖК/этилен-зависимым реакциям растений. Считается, что ЖК/этилен-зависимые реакции являются эффективными способами защиты от некротрофных патогенов, в то время как СК определяет устойчивость к биотрофам (Тарчевский, 2002; Truman et al., 2006; Robert-Seilaniantz, et al., 2007; Bari, Jones, 2009). Тем не менее это не всегда так: некоторые некротрофы могут быть более восприимчивы к СК-индуцируемой защите, а биотрофы — к ЖК/этилен-зависимой.

Вследствие разной степени чувствительности к разным защитным ответам некоторые фитопатогены приобрели способность «целенаправленно» индуцировать в растении ту «защитную» гормональную систему, которая, во-первых, менее вредоносна для микроорганизма и, во-вторых, способна подавить активацию более вредоносной за счет антагонистического действия (Kazan, Lyons, 2014). Классическим примером подобной обманной тактики патогенов является взаимодействие *Pseudomonas syringae* с растениями. Этот микроорганизм не способен колонизировать растение при активации СК-зависимой системы; в то же время псевдомонады толерантны к ЖК-регулируемым ответам (Xin, He, 2013). Для предотвращения индукции СК-опосредуемой системы *P. syringae* синтезирует в растении-хозяине фитотоксин коронатин, который является функциональным аналогом ЖК и поэтому индуцирует ЖК-зависимые ответные реакции (Zheng et al., 2012). Это, в свою очередь, приводит к репрессии СК-опосредуемой защитной системы, благодаря чему микроорганизм способен активно размножаться в орга-

низме хозяина. Подтверждением этому, в частности, служит устойчивость к псевдомонадам ЖК-нечувствительных мутантов, в которых, в отличие от растений дикого типа, при инфицировании увеличивается содержание СК (Kloek et al., 2001; Nickstadt et al., 2004; Laurie-Berry et al., 2006; Zheng et al., 2012).

Выявлено несколько молекулярных «игроков», которые определяют антагонистическое взаимодействие СК- и ЖК/этилен-опосредуемых защитных систем. Одним из них является белок NPR1, который не только активирует экспрессию СК-индуцируемых генов (см. выше), но и блокирует передачу ЖК-сигнала (Spoel et al., 2003; Dong, 2004). Кроме того, СК-индуцируемый фактор регуляции транскрипции WRKY70 служит в качестве активатора СК-опосредуемых ответов и одновременно репрессора ЖК-опосредуемых (Li et al., 2004). МАП-киназа (МАПК4), наоборот, является индуктором ЖК-опосредуемой системы и репрессором СК-зависимой. Мутанты по гену МАПК4 имеют повышенный уровень СК и приобретают устойчивость к биотрофным псевдомонадам, а экспрессия ЖК-индуцируемых генов у таких мутантных форм ниже, чем у дикого типа, что негативно сказывается на устойчивости к некротрофным патогенам (Petersen et al., 2000; Brodersen et al., 2006).

Несмотря на то, что СК- и ЖК/этилен-опосредуемые гормональные системы принято рассматривать как антагонистов, в некоторых случаях эти системы могут взаимодействовать и агонистически (Mur et al., 2006; Koornneef, Pieterse, 2008; Gutjahr, Paszkowski, 2009). Характер взаимодействия этих систем, по всей видимости, определяется концентрацией фитогормонов, а также специфическими регуляторными компонентами, многие из которых на сегодняшний день остаются неизвестными. Показано, что при низких концентрациях СК и ЖК совместно активируют экспрессию защитных генов, а при высоких — работают как антагонисты (Mur et al., 2006).

Таким образом, особое устройство «защитных» гормональных систем, обеспечивающее их агонистические и антагонистические взаимодействия, дает возможность растениям оптимизировать параметры защитного ответа в зависимости от характеристик атакующего микроорганизма и других факторов. В то же время структурно-функциональная организация этих гормональных систем позволяет патогенам манипулировать реакциями хозяина, что приводит к неэффективности фитоиммунного ответа и развитию патологических процессов.

«Ростовые» гормоны: ауксин, цитокинины, гиббереллины

Фитогормоны, активирующие ростовые процессы у растений (ауксин, гиббереллины и цитокинины), как оказалось, тоже могут детерминировать особенности взаимодействия растений и фитопатогенных бактерий (Bari, Jones, 2009; Robert-Seilantantz et al., 2011). Относительно причин и следствий изменений в работе ауксин-, гиббереллин-, цитокинин-опосредуемых гормональных систем при инфекции существует несколько точек зрения. Во-первых, есть мнение, что эти изменения являются «побочным эффектом» развития патологий. Во-вторых, считают, что модуляция этих систем при инфекции — это

«целенаправленный» процесс, суть которого заключается в том, что ауксин-, гиббереллин-, цитокинин-опосредуемые гормональные системы могут влиять на работу СК-, ЖК-, этилен-опосредуемых — напрямую вовлеченных в развитие ответных реакций на патоген (Bari, Jones, 2009). Так, например, известно, что ауксин негативно влияет на работу СК-опосредуемой гормональной системы при инфекции, вызванной *Pseudomonas syringae*, а патоген-индуцируемое накопление гиббереллинов репрессирует ЖК-регулируемые ответы (Wang et al., 2007; Lu et al., 2015). Однако, несмотря на многочисленные сведения о перекрестном влиянии гормональных систем друг на друга, роль ауксин-, гиббереллин-, цитокинин-опосредуемых гормональных систем в патогенезе нельзя ограничивать лишь «кросс-током» с СК-, ЖК-, этилен-опосредуемыми. Существует много примеров того, что процессы (или белки), непосредственно регулируемые ауксином, или гиббереллинами, или цитокининами, влияют на стратегию взаимодействия растений и фитопатогенных бактерий (Bari, Jones, 2009; Robert-Seilaniantz et al., 2011).

Ауксин (индолил-3-уксусная кислота, ИУК), как правило, выступает в качестве негативного регулятора иммунных ответов. Обработка растений этим фитогормоном стимулирует развитие заболеваний, вызываемых *Agrobacterium tumefaciens* (Yamada, 1993), *Pseudomonas savastanoi* (Yamada, 1993) и *Pseudomonas syringae* (Navarro et al., 2006; Chen et al., 2007; Wang et al., 2007). Видимо, поэтому в рамках защитных реакций растений ауксин-опосредуемая гормональная система обычно подавляется. Это позволяет растению снизить или прекратить расходование энергетических ресурсов на ростовые процессы и «сконцентрироваться» на борьбе с патогенным организмом. Репрессия ауксин-опосредуемой гормональной системы при развитии инфекции, по крайней мере отчасти, связана с индукцией образования специфической микро-РНК (miR393), которая служит в качестве негативного регулятора рецепторов ауксина (Navarro et al., 2006; Windels, Vazquez, 2011).

Ряд фитопатогенных бактерий с целью повышения восприимчивости хозяина активирует у растений ауксин-опосредуемую гормональную систему. Многие из этих микроорганизмов сами синтезируют ауксин: *Agrobacterium tumefaciens* (Escobar, Dandekar, 2003), *Pseudomonas savastanoi* (Bari, Jones, 2009), *Erwinia herbicola* pv. *gypsophylae* (Robert-Seilaniantz et al., 2011), *Rhodococcus fascians* (Benjamins, Scheres, 2008). Симптомы, которые вызывают вышеперечисленные ауксин-синтезирующие фитопатогенные бактерии, сопряжены с гипертрофией клеток растений (в том числе формирование опухолей), которая является следствием увеличения содержания этого фитогормона. Однако не все фитопатогены, способные производить ауксин, вызывают симптомы гипертрофии. Так, например, продуцирующие ауксин *Erwinia chrysanthemi* (*Dickeya dadantii*) и *Ralstonia solanacearum* являются возбудителями мокрой и бурой гнилей, соответственно, а разные штаммы *Pseudomonas syringae* вызывают пятнистости, хлорозы, симптомы «обморожения» (Robert-Seilaniantz et al., 2007). Мутации в генах, кодирующих ферменты биосинтеза ауксина у микроорганизмов, негативно влияют на их вирулентность (Beaudoin et al., 2000).

Индукция ауксин-опосредуемой гормональной системы при инфекции может происходить и вследствие того, что микроорганизмы направленно активируют экспрессию растительных генов, кодирующих ферменты биосинтеза этого фитогормона, а также подавляют транскрипцию генов, кодирующих репрессоры передачи ауксинового сигнала (Ding et al., 2008; Kazan, Manners, 2009; Wang, Fu, 2011). Ключевую роль в этом играют эффекторные белки (например, AvrRpt2 *Pseudomonas syringae* и AvrBs3 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*) (Marois et al., 2002; O'Donnell et al., 2003; Chen et al., 2007). Репрессия ауксин-опосредованной передачи сигнала у растений приводит к их устойчивости к *Pseudomonas syringae*, а активация способствует увеличению восприимчивости хозяина к этим патогенам (Navarro et al., 2006). Развитие ксантомонад (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) *in planta* тоже зависит от содержания ауксина в растении. Понижение уровня «активного» ауксина при помощи сверхэкспрессии генов ИУК-амидосинтетаз, которые обеспечивают конъюгацию этого фитогормона с аминокислотами и переводят его в неактивную форму, повышает устойчивость растений к ксантомонадам (Ding et al., 2008).

Во всех описанных на сегодняшний день случаях повышение уровня ауксина при взаимодействии фитопатогенных бактерий с растениями является критерием восприимчивости хозяина. Наряду с «кросс-током» с «защитными» гормональными системами и активацией гипертрофии клеток, функции ауксина как фактора восприимчивости растений могут заключаться еще и в индукции растительных белков (экстенсины, эндо- β -1,4-глюканазы, ксилоглюканэндотрансгликозилазы), которые обеспечивают разрыхление растительной клеточной стенки и таким образом способствуют развитию заболевания (Ding et al., 2008; Cernades, Benedetti, 2009). В то же время при колонизации растений фитопатогенными грибами индукция ауксин-зависимой гормональной системы может быть критерием как устойчивости, так и восприимчивости хозяина в зависимости от видовой принадлежности паразитического гриба (Robert-Seilantantz et al., 2007; Llorente et al., 2008), что указывает на многоплановую роль ауксина в ответе растений на биотические стрессоры.

Многие ИУК-продуцирующие бактерии (*Pseudomonas savastanoi*, *Erwinia herbicola* pv. *gypsophylae*, *Rhodococcus fascians*) синтезируют, наряду с ауксином, еще и **цитокинины**, которые тоже необходимы для развития симптомов гипертрофии и гиперплазии (Jameson, 2000; Chalupowicz et al., 2006; Perez-Martinez et al., 2010). *Agrobacterium tumefaciens* не продуцирует цитокинины, но «заставляет» синтезировать эти фитогормоны своего хозяина, интегрируя в его геном участок Т-ДНК, на котором расположены гены ферментов биосинтеза цитокининов (см. главу 3.7). Помимо индукции гипертрофии, вклад цитокининов в развитие инфекции может быть связан с тем, что эти фитогормоны подавляют РГЧ (Robinette, Matthyse, 1990; Murphy et al., 1997). Несмотря на роль цитокининов в развитии некоторых заболеваний, эти фитогормоны могут являться и факторами устойчивости растений к патогенам. Так, сверхэкспрессия генов биосинтеза цитокининов повышает устойчивость растений резуховидки к *Pseudomonas syringae*. При этом цитокинин-активируемый фактор регуляции транскрипции индуцирует экспрес-

сию генов некоторых СК-регулируемых PR-белков, что, по-видимому, и приводит к формированию устойчивости (Uchida, Tasaka 2010; Choi et al., 2010).

Цитокинины являются ключевыми регуляторами донорно-акцепторных отношений в растении: накопление этих фитогормонов в акцепторной области приводит к оттоку к ней продуктов фотосинтеза, образующихся в донорном (интенсивно фотосинтезирующем) участке (Brenner, Cheikh, 1995). В случае накопления цитокининов в месте инфицирования в эту область активизируется приток фотоассимилятов, что может по-разному влиять на взаимодействие макро- и микроорганизма. С одной стороны, высокий уровень продуктов фотосинтеза необходим растению для сверхактивации защитных систем; поэтому накопление цитокининов в месте инфекции часто расценивается как критерий устойчивости растений (Naseem, Dandekar, 2012; Argueso et al., 2012). С другой стороны, транспортируемые к месту инфекции фотоассимиляты могут использоваться патогеном в качестве субстрата, обеспечивающего интенсивную пролиферацию клеток микроорганизма *in planta*; и в таком случае цитокинины выступают в качестве факторов восприимчивости хозяина (Ashby, 2000; Walters et al., 2008; Zwack, Rashotte, 2013).

Гиббереллин-опосредуемая гормональная система может тоже являться «плацдармом» для взаимодействия фитопатогенных бактерий и растений. Интересно, что впервые гиббереллины были охарактеризованы не как фитогормоны, а как факторы вирулентности фитопатогенного гриба *Gibberella fujikuroi*, который вызывает патологическое «вытягивание» растений риса (Kurosawa, 1926). Гиббереллин-опосредуемую гормональную систему часто рассматривают (в рамках развития патосистем) как агониста СК-опосредуемой и антагониста ЖК-опосредуемой систем (Vidhyasekaran, 2015). Индукция гиббереллин-опосредуемой гормональной системы за счет инактивации DELLA-белков (негативные регуляторы передачи гиббереллинового сигнала), а также преобработки растений этими фитогормонами приводит к активации СК-индуцируемых генов и репрессии ЖК-индуцируемых. При этом происходит повышение устойчивости растений к биотрофным патогенам и снижение устойчивости к некротрофным (Navarro et al., 2008; Lu et al., 2015). При сверхэкспрессии генов DELLA-белков, наоборот, восприимчивость к биотрофам повышается, а к некротрофам — понижается.

Роль гиббереллинов в растительно-микробных взаимодействиях, по всей видимости, не ограничивается только их влиянием на СК-, ЖК-зависимые процессы. Наряду с ауксином, гиббереллины ответственны за «разрыхление» растительной клеточной стенки, в том числе при инфекции (Ding et al., 2008; Cernades, Benedetti, 2009), что является необходимым условием формирования некоторых патологий. Гиббереллины также являются регуляторами биосинтеза фитоалексинов и противопатогенных белков. У мутантных растений с повышенным содержанием гиббереллинов увеличивается уровень экспрессии гена PBZ1, который кодирует белок, обладающий фунгицидными свойствами (Tanaka et al., 2006). Кроме того, гиббереллин-опосредуемая гормональная система регулирует

уровень АФК. У мутантов по генам DELLA-белков происходит более выраженное повышение содержания АФК при инфекции, вызванной *Erwinia amylovora*, а экспрессия генов, кодирующих ферменты детоксикации АФК, при этом снижена по сравнению с растениями дикого типа (Achard et al., 2006, 2008).

Абсцизовая кислота

Абсцизовая кислота (АБК), которую часто называют гормоном «покоя и абиотического стресса» (Wasilewska et al., 2008; Медведев, Шарова, 2011), также вовлечена во взаимодействие растений с фитопатогенами. В большинстве случаев АБК рассматривается как негативный регулятор фитоиммунитета (Mauch-Mani, Mauch, 2005; Mohr, Cahill, 2007; de Torres-Zabala et al., 2007; Adie et al., 2007b). АБК-нечувствительные мутанты и мутанты по генам ферментов биосинтеза АБК, как правило, более устойчивы к фитопатогенам, чем растения дикого типа (Audenaert et al., 2002; Thaler, Bostock, 2004; Achuo et al., 2006; de Torres-Zabala et al., 2007; Asselbergh et al., 2008). Экзогенная обработка АБК, наоборот, повышает чувствительность растений к паразитическим микроорганизмам (Koga et al., 2004; de Torres-Zabala et al., 2007).

Основной предполагаемой причиной негативного влияния АБК на устойчивость к фитопатогенным микроорганизмам является то, что ответные реакции растений на абиотические и биотические стрессоры регулируются по иерархическому принципу; при этом приоритет имеют индуцируемые АБК ответы на стресс-факторы абиотической природы, с которыми, как считается, растения сталкиваются чаще, чем с атакой патогенных микроорганизмов. Поэтому при повышении концентрации АБК в растении происходит репрессия фитоиммунных реакций, регулируемых в первую очередь СК, ЖК и этиленом (Robert-Seilaniantz et al., 2007). Мутантные формы по генам ферментов биосинтеза АБК характеризуются сверхэкспрессией этилен/жасмонат-индуцируемых генов, а обработка растений экзогенной АБК, наоборот, репрессирует транскрипцию этих генов (de Torres-Zabala et al., 2007; Navarro et al., 2008). СК-опосредуемая гормональная система тоже угнетается АБК, что, в частности, препятствует развитию СК-регулируемой системной приобретенной устойчивости (de Torres Zabala et al., 2007). Кроме того, АБК негативно влияет на экспрессию гена, кодирующего фенилаланин-аммиаклиазу, которая является ключевым звеном в цепи биосинтеза СК и фенилпропаноидов, в том числе фитоалексинов, фитоантиципинов (Ward et al., 1989; McDonald, Cahill, 1999; Audenaert et al., 2002). Вследствие негативного влияния АБК на фитоиммунитет, гормональная система, опосредуемая этим фитогормоном, обычно репрессируется в рамках защитных реакций против патогенных организмов (Robert-Seilaniantz et al., 2007; Bari, Jones, 2009).

В то же время в некоторых случаях АБК оказывается необходимым компонентом иммунного ответа растений и определяет их устойчивость к ряду фитопатогенных бактерий. Обработка растений АБК снижает восприимчивость растений к *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Melotto et al., 2006) и *Ralstonia solanacearum* (Hernandez-Blanco et al., 2007). Защитная роль АБК в этих случаях, по всей види-

мости, может быть связана с несколькими причинами. Во-первых, АБК является индуктором биосинтеза каллозы — полисахарида, который быстро «заделывает бреши» в растительной клеточной стенке (см. главу 5.1) (Ton, Mauch-Mani, 2004; Kaliff et al., 2007; Flors et al., 2008; Iriti, Faoro, 2008). Во-вторых, АБК может индуцировать изменения в структуре полисахаридов клеточной стенки, а также увеличивать плотность кутикулы (Curvers et al., 2010). В-третьих, накопление АБК приводит к закрыванию устьиц, которые служат в качестве «входных ворот» для многих фитопатогенных бактерий (Melotto et al., 2006).

Таким образом, все фитогормональные системы так или иначе задействованы в формировании взаимоотношений между растениями и фитопатогенными бактериями. Это отчасти связано с тем, что все регуляторные системы растений работают в рамках сложной интегрированной сигнальной сети; поэтому воздействие на одну гормональную систему может приводить к глобальным физиологическим перестройкам, которые затрагивают всю сигнальную сеть. Каждая из гормональных систем может вносить вклад и в устойчивость, и в восприимчивость растений к фитопатогенам. Конкретная роль определенного фитогормона в детерминировании степени устойчивости растения, по всей видимости, определяется видовыми принадлежностями макро- и микроорганизма и стратегиями их взаимодействий, а также концентрацией гормона и комплексом факторов окружающей среды.

Масштабность гормональных перестроек при формировании растительно-микробных патосистем можно наглядно проиллюстрировать на примере образования корончатых галлов, вызываемых *Agrobacterium tumefaciens*. Как уже отмечалось выше (в том числе в главе 3.7), образование галлов сопряжено с увеличением содержания ауксина и цитокининов, гены ферментов биосинтеза которых интегрируются в геном растения в составе Т-ДНК. Эти «ростовые» гормоны приводят к гипертрофии клеток и разрастанию галла. Повышенный уровень ауксина при этом, помимо индукции ростовых процессов, приводит к очень важным для «правильного» функционирования галла дальнейшим гормональным перестройкам. Известно, что повышение уровня ауксина влечет за собой активацию биосинтеза этилена (Riov, Yang, 1989; Vandenbussche et al., 2003; Vandenbussche et al., 2010). Синтезируемый в галле этилен, в свою очередь, активирует продукцию в листьях АБК, которая транспортируется в галл, где индуцирует биосинтез суберина, препятствующего избыточному испарению влаги, и накопление осмотически активных соединений, способствующих более интенсивному транспорту воды в направлении опухоли (Efetova et al., 2007). Эти процессы являются критическими для нормального функционирования галла, поскольку при его разрастании разрушаются покровные ткани и кутикулярный слой, что неизбежно приводит к неконтролируемой потере воды. Комплексные гормональные перестройки в растениях, инфицированных агробактериями, позволяют нейтрализовать проблему разрушения покровных тканей на поверхности галла и поддерживать патологическую систему в «рабочем» состоянии.

Кроме того, для функционирования галла необходимы специализированные клетки, которые обеспечивают доставку воды, минеральных соединений и фотоассимилятов к новообразованию, а также выполняют механическую функцию. Поэтому процесс развития галла сопряжен не только с делением и ростом растительных клеток, но и их дифференцировкой в проводящие элементы (сосуды, ситовидные элементы) и волокна (Aloni et al., 1995). Не вызывает сомнения, что сложнейший процесс дифференцировки клеток, в том числе при формировании галлов, требует строго детерминированной работы гормональных систем, особенности которой при развитии опухолей у растений пока остаются неизвестными.

Литература:

- Дьяков, Ю. Т., Озерецковская, О. Л., Джавахия, В. Г., & Багирова, С. Ф. (2001). Общая и молекулярная фитопатология. Москва. Изд-во Общество фитопатологов.
- Медведев, С. С., & Шарова, Е. И. (2011). Биология развития растений. В 2-х т. Том 1. Начала биологии развития растений. Фитогормоны. Санкт-Петербург. Изд-во Санкт-Петербургского университета.
- Полевой, В. В. (1989). Физиология растений. Москва. Высшая школа.
- Тарчевский, И. А. (2002). Сигнальные системы клеток растений. Москва. Наука.
- Achard, P., Cheng, H., De Grauwe, L., Decat, J., Schoutteten, H., Moritz, T., ... & Harberd, N. P. (2006). Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science*, 311(5757), 91–94.
- Achard, P., Gong, F., Cheminant, S., Alioua, M., Hedden, P., & Genschik, P. (2008). The cold-inducible CBF1 factor-dependent signaling pathway modulates the accumulation of the growth-repressing DELLA proteins via its effect on gibberellin metabolism. *The Plant Cell*, 20(8), 2117–2129.
- Achuo, E. A., Prinsen, E., & Höfte, M. (2006). Influence of drought, salt stress and abscisic acid on the resistance of tomato to *Botrytis cinerea* and *Oidium neolycopersici*. *Plant Pathology*, 55(2), 178–186.
- Adie, B., Chico, J. M., Rubio-Somoza, I., & Solano, R. (2007a). Modulation of plant defenses by ethylene. *Journal of Plant Growth Regulation*, 26(2), 160–177.
- Adie, B. A., Pérez-Pérez, J., Pérez-Pérez, M. M., Godoy, M., Sánchez-Serrano, J. J., Schmelz, E. A., & Solano, R. (2007b). ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 19(5), 1665–1681.
- Aloni, R., Pradel, K. S., & Ullrich, C. I. (1995). The three-dimensional structure of vascular tissues in *Agrobacterium tumefaciens*-induced crown galls and in the host stems of *Ricinus communis* L. *Planta*, 196(3), 597–605.
- Alonso, J. M., Hirayama, T., Roman, G., Nourizadeh, S., & Ecker, J. R. (1999). EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in *Arabidopsis*. *Science*, 284(5423), 2148–2152.

Argueso, C. T., Ferreira, F. J., Epple, P., To, J. P., Hutchison, C. E., Schaller, G. E., ... & Kieber, J. J. (2012). Two-component elements mediate interactions between cytokinin and salicylic acid in plant immunity. *PLoS Genetics*, 8(1), e1002448.

Ashby, A. M. (2000). Biotrophy and the cytokinin conundrum. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 57(4), 147–158.

Asselbergh, B., De Vleeschauwer, D., & Höfte, M. (2008). Global switches and fine-tuning — ABA modulates plant pathogen defense. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(6), 709–719.

Audenaert, K., Pattery, T., Cornelis, P., & Höfte, M. (2002). Induction of systemic resistance to *Botrytis cinerea* in tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2: role of salicylic acid, pyochelin, and pyocyanin. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15(11), 1147–1156.

Baccari, C., & Lindow, S. E. (2011). Assessment of the process of movement of *Xylella fastidiosa* within susceptible and resistant grape cultivars. *Phytopathology*, 101(1), 77–84.

Balaji, V., Mayrose, M., Sherf, O., Jacob-Hirsch, J., Eichenlaub, R., Iraki, N., ... & Sessa, G. (2008). Tomato transcriptional changes in response to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* reveal a role for ethylene in disease development. *Plant Physiology*, 146(4), 1797–1809.

Bari, R., & Jones, J. D. (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology*, 69(4), 473–488.

Beaudoin, N., Serizet, C., Gosti, F., & Giraudat, J. (2000). Interactions between abscisic acid and ethylene signaling cascades. *The Plant Cell*, 12(7), 1103–1115.

Benjamins, R., & Scheres, B. (2008). Auxin: the looping star in plant development. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 443–465.

Bent, A. F., Innes, R. W., Ecker, J. R., & Staskawicz, B. J. (1992). Disease development in ethylene-insensitive *Arabidopsis thaliana* infected with virulent and avirulent *Pseudomonas* and *Xanthomonas* pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 5, 372–372.

Boher, B., Kpemoua, K., Nicole, M., Luisetti, J., & Geiger, J. P. (1995). Ultrastructure of interactions between cassava and *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*: Cytochemistry of cellulose and pectin degradation in a susceptible cultivar. *Phytopathology*, 85(7), 777–788.

Brenner, M. L., & Cheikh, N. (1995). The role of hormones in photosynthate partitioning and seed filling. In: *Plant Hormones*. Springer, Dordrecht, 649–670.

Brodersen, P., Petersen, M., Bjørn Nielsen, H., Zhu, S., Newman, M. A., Shokat, K. M., ... & Mundy, J. (2006). Arabidopsis MAP kinase 4 regulates salicylic acid- and jasmonic acid/ethylene-dependent responses via EDS1 and PAD4. *The Plant Journal*, 47(4), 532–546.

Cernadas, R. A., & Benedetti, C. E. (2009). Role of auxin and gibberellin in citrus canker development and in the transcriptional control of cell-wall remodeling genes modulated by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Plant Science*, 177(3), 190–195.

Chalupowicz, L., Barash, I., Schwartz, M., Aloni, R., & Manulis, S. (2006). Comparative anatomy of gall development on *Gypsophila paniculata* induced by bacteria with different mechanisms of pathogenicity. *Planta*, 224(2), 429–437.

Chen, Z., Silva, H., & Klessig, D. F. (1993). Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science*, 262(5141), 1883–1885.

Chen, Z., Agnew, J. L., Cohen, J. D., He, P., Shan, L., Sheen, J., & Kunkel, B. N. (2007). *Pseudomonas syringae* type III effector AvrRpt2 alters *Arabidopsis thaliana* auxin physiology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(50), 20131–20136.

Cho, Y. H., & Yoo, S. D. (2015). Novel connections and gaps in ethylene signaling from the ER membrane to the nucleus. *Frontiers in Plant Science*, 5, 733.

Choi, J., Huh, S. U., Kojima, M., Sakakibara, H., Paek, K. H., & Hwang, I. (2010). The cytokinin-activated transcription factor ARR2 promotes plant immunity via TGA3/NPR1-dependent salicylic acid signaling in *Arabidopsis*. *Developmental Cell*, 19(2), 284–295.

Conrath, U., Chen, Z., Ricigliano, J. R., & Klessig, D. F. (1995). Two inducers of plant defense responses, 2,6-dichloroisonicotinic acid and salicylic acid, inhibit catalase activity in tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(16), 7143–7147.

Creelman, R. A., & Mullet, J. E. (1995). Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(10), 4114–4119.

Creelman, R. A., & Mullet, J. E. (1997). Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 48(1), 355–381.

Curvers, K., Seifi, H., Mouille, G., De Rycke, R., Asselbergh, B., Van Hecke, A., ... & Höfte, M. (2010). Abscisic acid deficiency causes changes in cuticle permeability and pectin composition that influence tomato resistance to *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology*, 154(2), 847–860.

Da Cunha, L., Sreerekha, M. V., & Mackey, D. (2007). Defense suppression by virulence effectors of bacterial phytopathogens. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(4), 349–357.

Davies, P. (Ed.). (2012). *Plant hormones and their role in plant growth and development*. Springer Science & Business Media.

de Torres-Zabala, M., Truman, W., Bennett, M. H., Lafforgue, G., Mansfield, J. W., Egea, P. R., ... & Grant, M. (2007). *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* hijacks the *Arabidopsis* abscisic acid signalling pathway to cause disease. *The EMBO Journal*, 26(5), 1434–1443.

Delaney, T. P., Uknes, S., Vernooij, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., ... & Ryals, J. (1994). A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science*, 266(5188), 1247–1250.

Ding, X., Cao, Y., Huang, L., Zhao, J., Xu, C., Li, X., & Wang, S. (2008). Activation of the indole-3-acetic acid — amido synthetase GH3-8 suppresses expansin expression and promotes salicylate- and jasmonate-independent basal immunity in rice. *The Plant Cell*, 20(1), 228–240.

Dong, X. (2004). NPR1, all things considered. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(5), 547–552.

Efetova, M., Zeier, J., Riederer, M., Lee, C. W., Stingl, N., Mueller, M., ... & Deeken, R. (2007). A central role of abscisic acid in drought stress protection of *Agrobacterium*-induced tumors on *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 145(3), 853–862.

Ellis, C., & Turner, J. G. (2001). The *Arabidopsis* mutant *cev1* has constitutively active jasmonate and ethylene signal pathways and enhanced resistance to pathogens. *The Plant Cell*, 13(5), 1025–1033.

Ellis, C., Karafyllidis, I., Wasternack, C., & Turner, J. G. (2002). The *Arabidopsis* mutant *cev1* links cell wall signaling to jasmonate and ethylene responses. *The Plant Cell Online*, 14(7), 1557–1566.

Escobar, M. A., & Dandekar, A. M. (2003). *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. *Trends in Plant Science*, 8(8), 380–386.

Farmer, E. E., & Ryan, C. A. (1992). Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *The Plant Cell*, 4(2), 129–134.

Flors, V., Ton, J., Van Doorn, R., Jakab, G., García-Agustín, P., & Mauch-Mani, B. (2008). Interplay between JA, SA and ABA signalling during basal and induced resistance against *Pseudomonas syringae* and *Alternaria brassicicola*. *The Plant Journal*, 54(1), 81–92.

Fu, Z. Q., Yan, S., Saleh, A., Wang, W., Ruble, J., Oka, N., ... & Dong, X. (2012). NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature*, 486(7402), 228–232.

Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., ... & Ryals, J. (1993). Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science*, 261(5122), 754–756.

Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 43, 205–227.

Govrin, E. M., & Levine, A. (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology*, 10(13), 751–757.

Greenberg, J. T., Silverman, F. P., & Liang, H. (2000). Uncoupling salicylic acid-dependent cell death and defense-related responses from disease resistance in the *Arabidopsis* mutant *acd5*. *Genetics*, 156(1), 341–350.

Guo, H., & Ecker, J. R. (2004). The ethylene signaling pathway: new insights. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(1), 40–49.

Gutjahr, C., & Paszkowski, U. (2009). Weights in the balance: jasmonic acid and salicylic acid signaling in root-biotroph interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(7), 763–772.

Hilaire, E., Young, S. A., Willard, L. H., McGee, J. D., Sweat, T., Chittoor, J. M., ... & Leach, J. E. (2001). Vascular defense responses in rice: peroxidase accumulation in xylem parenchyma cells and xylem wall thickening. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14(12), 1411–1419.

Iriti, M., & Faoro, F. (2008). Abscisic acid is involved in chitosan-induced resistance to tobacco necrosis virus (TNV). *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(12), 1106–1111.

James, S. A., Clearwater, M. J., Meinzer, F. C., & Goldstein, G. (2002). Heat dissipation sensors of variable length for the measurement of sap flow in trees with deep sapwood. *Tree Physiology*, 22(4), 277–283.

Jameson, P. E. (2000). Cytokinins and auxins in plant-pathogen interactions — An overview. *Plant Growth Regulation*, 32(2), 369–380.

Jones, J. D., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323–329.

Ju, C., Yoon, G. M., Shemansky, J. M., Lin, D. Y., Ying, Z. I., Chang, J., ... & Cooper, B. (2012). CTR1 phosphorylates the central regulator EIN2 to control ethylene hormone signaling from the ER membrane to the nucleus in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(47), 19486–19491.

Kachroo, P., Shanklin, J., Shah, J., Whittle, E. J., & Klessig, D. F. (2001). A fatty acid desaturase modulates the activation of defense signaling pathways in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(16), 9448–9453.

Kachroo, P., Venugopal, S. C., Navarre, D. A., Lapchyk, L., & Kachroo, A. (2005). Role of salicylic acid and fatty acid desaturation pathways in *ssi2*-mediated signaling. *Plant Physiology*, 139(4), 1717–1735.

Kaliff, M., Staal, J., Myrenås, M., & Dixelius, C. (2007). ABA is required for *Leptosphaeria maculans* resistance via ABI1- and ABI4-dependent signaling. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(4), 335–345.

Kazan, K., & Manners, J. M. (2009). Linking development to defense: auxin in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Science*, 14(7), 373–382.

Kazan, K., & Lyons, R. (2014). Intervention of phytohormone pathways by pathogen effectors. *The Plant Cell*, 26(6), 2285–2309.

Kloek, A. P., Verbsky, M. L., Sharma, S. B., Schoelz, J. E., Vogel, J., Klessig, D. F., & Kunkel, B. N. (2001). Resistance to *Pseudomonas syringae* conferred by an *Arabidopsis thaliana* coronatine-insensitive (*coi1*) mutation occurs through two distinct mechanisms. *The Plant Journal*, 26(5), 509–522.

Knoester, M., Van Loon, L. C., Van Den Heuvel, J., Hennig, J., Bol, J. F., & Linthorst, H. J. (1998). Ethylene-insensitive tobacco lacks nonhost resistance against soilborne fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(4), 1933–1937.

Koga, H., Dohi, K., & Mori, M. (2004). Abscisic acid and low temperatures suppress the whole plant-specific resistance reaction of rice plants to the infection of *Magnaporthe grisea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 65(1), 3–9.

Koornneef, A., & Pieterse, C. M. (2008). Cross talk in defense signaling. *Plant Physiology*, 146(3), 839–844.

Kurosawa, E. (1926). Experimental studies on the nature of the substance secreted by the "bakanae" fungus. *Natural. History Society of Formosa*, 16, 213–227.

Laurie-Berry, N., Joardar, V., Street, I. H., & Kunkel, B. N. (2006). The *Arabidopsis thaliana* jasmonate insensitive 1 gene is required for suppression of salicylic acid-dependent defenses during infection by *Pseudomonas syringae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(7), 789–800.

Lawton, K., Weymann, K., Friedrich, L., Vernooij, B., Uknes, S., & Ryals, J. (1995). Systemic acquired resistance in *Arabidopsis* requires salicylic acid but not ethylene. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 8(6), 863–870.

Li, J., Brader, G., & Palva, E. T. (2004). The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *The Plant Cell*, 16(2), 319–331.

Llorente, F., Muskett, P., Sánchez-Vallet, A., López, G., Ramos, B., Sánchez-Rodríguez, C., ... & Molina, A. (2008). Repression of the auxin response pathway increases *Arabidopsis* susceptibility to necrotrophic fungi. *Molecular Plant*, 1(3), 496–509.

Lu, X., Hershey, D. M., Wang, L., Bogdanove, A. J., & Peters, R. J. (2015). An ent-kaurene-derived diterpenoid virulence factor from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. *New Phytologist*, 206(1), 295–302.

Lund, S. T., Stall, R. E., & Klee, H. J. (1998). Ethylene regulates the susceptible response to pathogen infection in tomato. *The Plant Cell*, 10(3), 371–382.

Marois, E., Van den Ackerveken, G., & Bonas, U. (2002). The *Xanthomonas* type III effector protein AvrBs3 modulates plant gene expression and induces cell hypertrophy in the susceptible host. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15(7), 637–646.

Mauch-Mani, B., & Mauch, F. (2005). The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(4), 409–414.

McDonald, K. L., & Cahill, D. M. (1999). Influence of abscisic acid and the abscisic acid biosynthesis inhibitor, norflurazon, on interactions between *Phytophthora sojae* and soybean (*Glycine max*). *European Journal of Plant Pathology*, 105(7), 651–658.

McGrath, K. C., Dombrecht, B., Manners, J. M., Schenk, P. M., Edgar, C. I., Maclean, D. J., ... & Kazan, K. (2005). Repressor-and activator-type ethylene response factors functioning in jasmonate signaling and disease resistance identified via a genome-wide screen of *Arabidopsis* transcription factor gene expression. *Plant Physiology*, 139(2), 949–959.

Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K., & He, S. Y. (2006). Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell*, 126(5), 969–980.

Memelink, J. (2009). Regulation of gene expression by jasmonate hormones. *Phytochemistry*, 70(13), 1560–1570.

Mohr, P. G., & Cahill, D. M. (2007). Suppression by ABA of salicylic acid and lignin accumulation and the expression of multiple genes, in *Arabidopsis* infected with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Functional & Integrative Genomics*, 7(3), 181–191.

Mou, Z., Fan, W., & Dong, X. (2003). Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell*, 113(7), 935–944.

Mur, L. A., Kenton, P., Atzorn, R., Miersch, O., & Wasternack, C. (2006). The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiology*, 140(1), 249–262.

Murphy, A. M., Pryce-Jones, E., Johnstone, K., & Ashby, A. M. (1997). Comparison of cytokinin production *in vitro* by *Pyrenopeziza brassicae* with other plant pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 50(1), 53–65.

Nandi, A., Moeder, W., Kachroo, P., Klessig, D. F., & Shah, J. (2005). *Arabidopsis* *ssi2*-conferred susceptibility to *Botrytis cinerea* is dependent on EDS5 and PAD4. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18(4), 363–370.

- Naseem, M., & Dandekar, T. (2012). The role of auxin-cytokinin antagonism in plantpathogen interactions. *PLoS Pathogens*, 8(11), e1003026.
- Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F., Arnold, B., Dharmasiri, N., Estelle, M., ... & Jones, J. D. (2006). A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science*, 312(5772), 436–439.
- Navarro, L., Bari, R., Achard, P., Lisón, P., Nemri, A., Harberd, N. P., & Jones, J. D. (2008). DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling. *Current Biology*, 18(9), 650–655.
- Nawrath, C., & Métraux, J. P. (1999). Salicylic acid induction-deficient mutants of *Arabidopsis* express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. *The Plant Cell*, 11(8), 1393–1404.
- Nawrath, C., Heck, S., Parinthewong, N., & Métraux, J. P. (2002). EDS5, an essential component of salicylic acid-dependent signaling for disease resistance in *Arabidopsis*, is a member of the MATE transporter family. *The Plant Cell*, 14(1), 275–286.
- Nickstadt, A., Thomma, B. P., Feussner, I. V. O., Kangasjarvi, J., Zeier, J., Loeffler, C., ... & Berger, S. (2004). The jasmonate-insensitive mutant *jin1* shows increased resistance to biotrophic as well as necrotrophic pathogens. *Molecular Plant Pathology*, 5(5), 425–434.
- O'Donnell, P. J., Jones, J. B., Antoine, F. R., Ciardi, J., & Klee, H. J. (2001). Ethylene-dependent salicylic acid regulates an expanded cell death response to a plant pathogen. *The Plant Journal*, 25(3), 315–323.
- O'Donnell, P. J., Schmelz, E. A., Moussatche, P., Lund, S. T., Jones, J. B., & Klee, H. J. (2003). Susceptible to intolerance — a range of hormonal actions in a susceptible *Arabidopsis* pathogen response. *The Plant Journal*, 33(2), 245–257.
- Pallas, J. A., Paiva, N. L., Lamb, C., & Dixon, R. A. (1996). Tobacco plants epigenetically suppressed in phenylalanine ammonia-lyase expression do not develop systemic acquired resistance in response to infection by tobacco mosaic virus. *The Plant Journal*, 10(2), 281–293.
- Penninckx, I. A., Thomma, B. P., Buchala, A., Métraux, J. P., & Broekaert, W. F. (1998). Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 10(12), 2103–2113.
- Pérez-Donoso, A. G., Greve, L. C., Walton, J. H., Shackel, K. A., & Labavitch, J. M. (2007). *Xylella fastidiosa* infection and ethylene exposure result in xylem and water movement disruption in grapevine shoots. *Plant Physiology*, 143(2), 1024–1036.
- Pérez-Martínez, I., Rodríguez-Moreno, L., Lambertsen, L., Matas, I. M., Murillo, J., Tegli, S., ... & Ramos, C. (2010). Fate of a *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* type III secretion system mutant in olive plants (*Olea europaea* L.). *Applied and Environmental Microbiology*, 76(11), 3611–3619.
- Petersen, M., Brodersen, P., Naested, H., Andreasson, E., Lindhart, U., Johansen, B., ... & Sharma, S. B. (2000). *Arabidopsis* MAP kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell*, 103(7), 1111–1120.

Pieterse, C. M., Van Wees, S. C., Van Pelt, J. A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., ... & Van Loon, L. C. (1998). A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, *10*(9), 1571–1580.

Pieterse, C. M., Van Pelt, J. A., Ton, J., Parchmann, S., Mueller, M. J., Buchala, A. J., ... & Van Loon, L. C. (2000). Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* requires sensitivity to jasmonate and ethylene but is not accompanied by an increase in their production. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *57*(3), 123–134.

Pieterse, C. M., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., & Van Wees, S. C. (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *28*, 489–521.

Qiao, H., Chang, K. N., Yazaki, J., & Ecker, J. R. (2009). Interplay between ethylene, ETP1/ETP2 F-box proteins, and degradation of EIN2 triggers ethylene responses in *Arabidopsis*. *Genes & Development*, *23*(4), 512–521.

Rate, D. N., & Greenberg, J. T. (2001). The *Arabidopsis* aberrant growth and death2 mutant shows resistance to *Pseudomonas syringae* and reveals a role for NPR1 in suppressing hypersensitive cell death. *The Plant Journal*, *27*(3), 203–211.

Reinbothe, C., Springer, A., Samol, I., & Reinbothe, S. (2009). Plant oxylipins: role of jasmonic acid during programmed cell death, defence and leaf senescence. *The FEBS Journal*, *276*(17), 4666–4681.

Rioy, J., & Yang, S. F. (1989). Ethylene and auxin-ethylene interaction in adventitious root formation in mung bean (*Vigna radiata*) cuttings. *Journal of Plant Growth Regulation*, *8*(2), 131–141.

Robert-Seilaniantz, A., Navarro, L., Bari, R., & Jones, J. D. (2007). Pathological hormone imbalances. *Current Opinion in Plant Biology*, *10*(4), 372–379.

Robert-Seilaniantz, A., Grant, M., & Jones, J. D. (2011). Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annual Review of Phytopathology*, *49*, 317–343.

Robinette, D., & Matthyse, A. G. (1990). Inhibition by *Agrobacterium tumefaciens* and *Pseudomonas savastanoi* of development of the hypersensitive response elicited by *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Journal of Bacteriology*, *172*(10), 5742–5749.

Schenk, P. M., Kazan, K., Wilson, I., Anderson, J. P., Richmond, T., Somerville, S. C., & Manners, J. M. (2000). Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(21), 11655–11660.

Shah, J., Kachroo, P., Nandi, A., & Klessig, D. F. (2001). A recessive mutation in the *Arabidopsis* SSI2 gene confers SA- and NPR1-independent expression of PR genes and resistance against bacterial and oomycete pathogens. *The Plant Journal*, *25*(5), 563–574.

Shoji, T., Ogawa, T., & Hashimoto, T. (2008). Jasmonate-induced nicotine formation in tobacco is mediated by tobacco COI1 and JAZ genes. *Plant and Cell Physiology*, *49*(7), 1003–1012.

Soitamo, A. J., Jada, B., & Lehto, K. (2012). Expression of geminiviral AC2 RNA silencing suppressor changes sugar and jasmonate responsive gene expression in transgenic tobacco plants. *BMC Plant Biology*, 12(1), 204.

Spoel, S. H., Koornneef, A., Claessens, S. M., Korzelius, J. P., Van Pelt, J. A., Mueller, M. J., ... & Van Loon, L. C. (2003). NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *The Plant Cell*, 15(3), 760–770.

Tanaka, N., Matsuoka, M., Kitano, H., Asano, T., Kaku, H., & Komatsu, S. (2006). *gid1*, a gibberellin-insensitive dwarf mutant, shows altered regulation of probenazole-inducible protein (PBZ1) in response to cold stress and pathogen attack. *Plant, Cell & Environment*, 29(4), 619–631.

Thaler, J. S., Fidantsef, A. L., & Bostock, R. M. (2002). Antagonism between jasmonate- and salicylate-mediated induced plant resistance: effects of concentration and timing of elicitation on defense-related proteins, herbivore, and pathogen performance in tomato. *Journal of Chemical Ecology*, 28(6), 1131–1159.

Thaler, J. S., & Bostock, R. M. (2004). Interactions between abscisic-acid-mediated responses and plant resistance to pathogens and insects. *Ecology*, 85(1), 48–58.

Thatcher, L. F., Manners, J. M., & Kazan, K. (2009). *Fusarium oxysporum* hijacks COI1-mediated jasmonate signaling to promote disease development in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 58(6), 927–939.

Thomma, B. P., Eggermont, K., Penninckx, I. A., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B. P., & Broekaert, W. F. (1998). Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(25), 15107–15111.

Thomma, B. P., Penninckx, I. A., Cammue, B. P., & Broekaert, W. F. (2001). The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Immunology*, 13(1), 63–68.

Ton, J., & Mauch-Mani, B. (2004). β -amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose. *The Plant Journal*, 38(1), 119–130.

Truman, W., Zabala, M. T., & Grant, M. (2006). Type III effectors orchestrate a complex interplay between transcriptional networks to modify basal defence responses during pathogenesis and resistance. *The Plant Journal*, 46(1), 14–33.

Uchida, N., & Tasaka, M. (2010). Intersections between immune responses and morphological regulation in plants. *Journal of Experimental Botany*, 61(10), 2539–2547.

Vandenbussche, F., Smalle, J., Le, J., Saibo, N. J. M., De Paepe, A., Chaerle, L., ... & Van Onckelen, H. (2003). The *Arabidopsis* mutant *alh1* illustrates a cross talk between ethylene and auxin. *Plant Physiology*, 131(3), 1228–1238.

Vandenbussche, F., Petrášek, J., Žádníková, P., Hoyerová, K., Pešek, B., Raz, V., ... & Van Der Straeten, D. (2010). The auxin influx carriers AUX1 and LAX3 are involved in auxin-ethylene interactions during apical hook development in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Development*, 137(4), 597–606.

VanderMolen, G. E., Beckman, C. H., & Rodehorst, E. (1977). Vascular gelation: a general response phenomenon following infection. *Physiological Plant Pathology*, 11(1), 95–100.

Vernooij, B., Friedrich, L., Morse, A., Reist, R., Kolditz-Jawhar, R., Ward, E., ... & Ryals, J. (1994). Salicylic acid is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction. *The Plant Cell*, 6(7), 959–965.

Vidhyasekaran, P. (2015). Gibberellin signaling in plant innate immunity. In: *Plant Hormone Signaling Systems in Plant Innate Immunity*. Springer Netherlands, 383–401.

Vlot, A. C., Dempsey, D. M. A., & Klessig, D. F. (2009). Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology*, 47, 177–206.

Wallis, F. M., & Truter, S. J. (1978). Histopathology of tomato plants infected with *Pseudomonas solanacearum*, with emphasis on ultrastructure. *Physiological Plant Pathology*, 13(3), 307–310.

Walters, D. R., McRoberts, N., & Fitt, B. D. (2008). Are green islands red herrings? Significance of green islands in plant interactions with pathogens and pests. *Biological Reviews*, 83(1), 79–102.

Wang, D., Pajerowska-Mukhtar, K., Culler, A. H., & Dong, X. (2007). Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway. *Current Biology*, 17(20), 1784–1790.

Wang, F., Cui, X., Sun, Y., & Dong, C. H. (2013). Ethylene signaling and regulation in plant growth and stress responses. *Plant Cell Reports*, 32(7), 1099–1109.

Wang, S., & Fu, J. (2011). Insights into auxin signaling in plant-pathogen interactions. *Frontiers in Plant Science*, 2, 74.

Ward, E. W., Cahill, D. M., & Bhattacharyya, M. K. (1989). Abscisic acid suppression of phenylalanine ammonia-lyase activity and mRNA, and resistance of soybeans to *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *Plant Physiology*, 91(1), 23–27.

Wasilewska, A., Vlad, F., Sirichandra, C., Redko, Y., Jammes, F., Valon, C., ... & Leung, J. (2008). An update on abscisic acid signaling in plants and more... *Molecular Plant*, 1(2), 198–217.

Wasternack, C., Stenzel, I., Hause, B., Hause, G., Kutter, C., Maucher, H., ... & Miersch, O. (2006). The wound response in tomato — role of jasmonic acid. *Journal of Plant Physiology*, 163(3), 297–306.

Wasternack, C. (2007). Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany*, 100(4), 681–697.

Wildermuth, M. C., Dewdney, J., Wu, G., & Ausubel, F. M. (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*, 414(6863), 562–565.

Windels, D., & Vazquez, F. (2011). miR393: integrator of environmental cues in auxin signaling? *Plant Signaling & Behavior*, 6(11), 1672–1675.

Xin, X. F., & He, S. Y. (2013). *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000: a model pathogen for probing disease susceptibility and hormone signaling in plants. *Annual Review of Phytopathology*, 51, 473–498.

Xu, Y. I., Chang, P. F. L., Liu, D., Narasimhan, M. L., Raghothama, K. G., Hasegawa, P. M., & Bressan, R. A. (1994). Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate. *The Plant Cell*, 6(8), 1077–1085.

Yamada, T. (1993). The role of auxin in plant-disease development. *Annual Review of Phytopathology*, 31(1), 253–273.

Zheng, X. Y., Spivey, N. W., Zeng, W., Liu, P. P., Fu, Z. Q., Klessig, D. F., ... & Dong, X. (2012). Coronatine promotes *Pseudomonas syringae* virulence in plants by activating a signaling cascade that inhibits salicylic acid accumulation. *Cell Host & Microbe*, 11(6), 587–596.

Zhu, Z., An, F., Feng, Y., Li, P., Xue, L., Mu, A., ... & Zhang, X. (2011). Derepression of ethylene-stabilized transcription factors (EIN3/EIL1) mediates jasmonate and ethylene signaling synergy in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(30), 12539–12544.

Zwack, P. J., & Rashotte, A. M. (2013). Cytokinin inhibition of leaf senescence. *Plant Signaling & Behavior*, 8(7), e24737.

Глава 7

ВОСПРИИМЧИВЫЕ ОТВЕТЫ РАСТЕНИЙ КАК КРИТЕРИЙ РАЗВИТИЯ ПАТОСИСТЕМ

Формирование индуцируемой устойчивости растений к фитопатогенам сопряжено с активными «действиями» хозяина, которые заключаются в репрограммировании метаболизма и мобилизации защитных систем (см. главу 6). При этом под восприимчивостью растения часто подразумевают его «пассивность», то есть неспособность «отвечать» на инвазию патогенного микроорганизма и контролировать «поведение» паразита. В действительности же, восприимчивость растений, так же как и устойчивость, не предполагает инертности макроорганизма, а требует активации особых патоген-индуцируемых реакций хозяина. Такие реакции растения, которые способствуют его колонизации патогенами и формированию выраженных патологий, называют *восприимчивыми ответами*. Индукция восприимчивых ответов не увеличивает, а, наоборот, снижает устойчивость макроорганизма к паразиту. Восприимчивые ответы при этом обеспечивают функционирование растения не как автономной биологической единицы, а как компонента интегрированной растительно-микробной патосистемы, преобразуя растительный организм в комфортную для патогена эконишу.

Восприимчивые ответы растений можно условно разделить на две категории. К первой категории относятся такие реакции, которые интерферируют с защитными системами растений и препятствуют индукции фитоиммунитета. Такие ответы, в частности, были описаны в главе 6.3. Так, например, «целенаправленная» активация патогеном жасмонат-индуцируемых ответов растения препятствует индукции салицилат-зависимых ответов хозяина, которые являются губительными для многих паразитов. При этом неспособность патогена индуцировать восприимчивый ответ (активация жасмонат-опосредуемой гормональной системы) выражается формированием устойчивости у хозяина (Robert-Seilaniantz et al., 2007; Koornneef, Pieterse, 2008; Robert-Seilaniantz et al., 2011). Другими примерами восприимчивых ответов, интерферирующих с защитными системами, служат патоген-индуцируемая активация биосинтеза гиббереллинов и ауксина, которые подавляют жасмонат- и салицилат-опосредуемую защиту соответственно (Robert-Seilaniantz et al., 2011; Mutka et al., 2013; Song et al., 2014).

Восприимчивые ответы второй категории не влияют напрямую на защитные системы растений, а приводят к изменениям в основном метаболизме хозяина, которые благоприятствуют его колонизации патогеном и/или проявлению патологий. Во многих исследованиях продемонстрировано, что сценарий формирования растительно-микробных патосистем может зависеть от индукции/репрессии

физиологических процессов растения-хозяина, связанных с ростом и дифференцировкой клеток, транспортом продуктов фотосинтеза, ассимиляцией неорганических соединений, водным транспортом, движением замыкающих клеток устьиц, разными формами программируемой клеточной смерти и т. д. (см. главы 7.1–7.7). Поэтому восприимчивость нельзя отождествлять просто с отсутствием или неэффективностью защитных ответов (Lapin, Van den Ackerveken, 2013); в дополнение к этому восприимчивость подразумевает направленное изменение метаболизма хозяина, обеспечивающее кондиционирование (оптимизацию) его внутренней среды.

Восприимчивые ответы сопряжены с индукцией экспрессии генов восприимчивости, которые называют S-(susceptibility)-генами. Продукты S-генов, задействованные во многих метаболических процессах, необходимы растениям для нормального развития, и поэтому эти гены не могут быть элиминированы в процессе эволюции, несмотря на их негативную роль в устойчивости к биогенным стрессорам (Eckardt, 2002; Pavan et al., 2010). Экспрессия S-генов подвержена иерархической многоступенчатой регуляции, не только в зависимости от присутствия патогена, но и от комплекса внешних и внутренних факторов (тип клеток, физиологический статус растения, условия окружающей среды) (Pavan et al., 2010; Lucas, 2011; Fan, Doerner, 2012; Lapin, Van den Ackerveken, 2013). В связи с этим инвазия патогенного микроорганизма не всегда оказывается достаточным условием для полноценной активации экспрессии S-генов. Если уровень экспрессии S-генов и «сила» восприимчивого ответа после проникновения патогена оказываются недостаточными для развития выраженных патологий (например, из-за «особого» физиологического статуса растений до инфицирования или условий окружающей среды), то либо стратегия взаимодействия макро- и микроорганизма изменяется, либо формируется полная невосприимчивость (устойчивость) хозяина к паразиту. По всей видимости, дифференциальная экспрессия S-генов и является одной из причин неодинаковой степени устойчивости определенного вида растений к конкретному патогену на разных стадиях онтогенеза, а также при разном физиологическом статусе и условиях окружающей среды (Block et al., 2005; Walters, Bingham 2007; Багирова с соавт., 2012; Gohlke, Deeken, 2014).

Таким образом, во-первых, индукция восприимчивых ответов служит важным критерием физиологической совместимости патогена и хозяина, то есть способности к реализации их генетического потенциала к взаимодействию. Во-вторых, восприимчивые ответы, из-за неодинакового уровня индукции в каждом конкретном случае, позволяют патогену и хозяину корректировать тактику их взаимодействия, что выражается развитием разных типов инфекционного процесса, например типичная, атипичная, латентная, abortивная инфекции (см. главу 1).

Литература:

Багирова, С. Ф., Джавахия, В. Г., Дьяков, Ю. Т., Озерецковская, О. Л., Проворов, Н. А., Тихонович, И. А., & Щербакова, Л. А. (2012). Фундаментальная фитопатология. Москва. Изд-во Красанд.

Block, A., Schmelz, E., O'Donnell, P. J., Jones, J. B., & Klee, H. J. (2005). Systemic acquired tolerance to virulent bacterial pathogens in tomato. *Plant Physiology*, 138(3), 1481–1490.

Eckardt, N. A. (2002). Plant disease susceptibility genes? *The Plant Cell*, 14(9), 1983–1986.

Fan, J., & Doerner, P. (2012). Genetic and molecular basis of nonhost disease resistance: complex, yes; silver bullet, no. *Current Opinion in Plant Biology*, 15(4), 400–406.

Gohlke, J., & Deeken, R. (2014). Plant responses to *Agrobacterium tumefaciens* and crown gall development. *Frontiers in Plant Science*, 5, 155.

Koornneef, A., & Pieterse, C. M. (2008). Cross talk in defense signaling. *Plant Physiology*, 146(3), 839–844.

Lapin, D., & Van den Ackerveken, G. (2013). Susceptibility to plant disease: more than a failure of host immunity. *Trends in Plant Science*, 18(10), 546–554.

Lucas, J. A. (2011). Advances in plant disease and pest management. *The Journal of Agricultural Science*, 149(S1), 91–114.

Mutka, A. M., Fawley, S., Tsao, T., & Kunkel, B. N. (2013). Auxin promotes susceptibility to *Pseudomonas syringae* via a mechanism independent of suppression of salicylic acid-mediated defenses. *The Plant Journal*, 74(5), 746–754.

Pavan, S., Jacobsen, E., Visser, R. G., & Bai, Y. (2010). Loss of susceptibility as a novel breeding strategy for durable and broad-spectrum resistance. *Molecular Breeding*, 25(1), 1.

Robert-Seilaniantz, A., Navarro, L., Bari, R., & Jones, J. D. (2007). Pathological hormone imbalances. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(4), 372–379.

Robert-Seilaniantz, A., Grant, M., & Jones, J. D. (2011). Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annual Review of Phytopathology*, 49, 317–343.

Song, S., Qi, T., Wasternack, C., & Xie, D. (2014). Jasmonate signaling and crosstalk with gibberellin and ethylene. *Current Opinion in Plant Biology*, 21, 112–119.

Walters, D. R., & Bingham, I. J. (2007). Influence of nutrition on disease development caused by fungal pathogens: implications for plant disease control. *Annals of Applied Biology*, 151(3), 307–324.

7.1. Движения замыкающих клеток устьиц

Уже на самом начальном этапе взаимодействия фитопатогенов с растениями, при колонизации филлосферы (поверхность листьев), для инвазии паразита в тело хозяина требуется ответная реакция макроорганизма, которая заключается в движении замыкающих клеток устьиц. Устьица, необходимые для формирования транспирационного тока и поступления углекислого газа в растение, служат в качестве «входных ворот» для многих фитопатогенов внутрь организма хозяина (Underwood et al., 2007; Melotto et al., 2017). Чтобы препятствовать инвазии патогенов, у растений выработались механизмы, обеспечивающие закрывание устьиц при рецепции консервативных метаболитов патогенов — патоген-ассоциированного молекулярного паттерна (ПАМП) (Melotto et al., 2008; McLachlan et al., 2014) (см. главу 6.1). ПАМП-индуцируемое закрывание устьиц является хорошо известной защитной реакцией на патогены, которую часто называют «устьичным иммунитетом» (stomata immunity) (Zeng et al., 2010; Melotto et al., 2017). Поэтому для проникновения внутрь растений у патогенов существуют механизмы для поддержания устьиц в открытом состоянии. Эти механизмы заключаются либо в активации процесса повторного открывания устьиц (reopening) после их ПАМП-индуцируемого закрывания, либо в репрессии ПАМП-регулируемого закрывания устьиц. Для координирования работы устьичного аппарата хозяина патогены воздействуют на различные регуляторные системы и физиологические процессы макроорганизма: гормональную систему, опосредуемую салициловой кислотой (Misas-Villamil et al., 2013; Geng et al., 2014), OST1-(Open Stomata)-киназу и АБК-опосредуемую гормональную систему (Melotto et al., 2006), МАП-киназный каскад (Gudesblat et al., 2009a), протонные помпы (Gudesblat et al., 2009b), протеасомозависимую деградацию белков (Lozano-Duran et al., 2014), аккумуляцию K^+ и разрушение крахмала в замыкающих клетках (Guimaraes, Stotz, 2004).

Кроме того, бактерия *P. syringae*, способная при помощи фитотоксина (коронатина) активировать повторное открывание устьиц на инвазивной стадии инфекции, после проникновения внутрь хозяина индуцирует закрывание устьиц. Это обеспечивает снижение потерь воды в инфицированном растении, что «продлевает жизнь» патологической системе (Goel et al., 2008; Freeman, Beattie, 2009), а также, по всей видимости, препятствует проникновению в хозяина других фитопатогенов. Таким образом, одним из первых восприимчивых ответов растения является патоген-регулируемая работа устьичного аппарата, которая обеспечивает эффективную инвазию паразита и «правильное» функционирование патологической системы.

Литература:

- Freeman, B. C., & Beattie, G. A. (2009). Bacterial growth restriction during host resistance to *Pseudomonas syringae* is associated with leaf water loss and localized cessation of vascular activity in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(7), 857–867.
- Geng, X., Jin, L., Shimada, M., Kim, M. G., & Mackey, D. (2014). The phytotoxin coronatine is a multifunctional component of the virulence armament of *Pseudomonas syringae*. *Planta*, 240(6), 1149–1165.
- Goel, A. K., Lundberg, D., Torres, M. A., Matthews, R., Akimoto-Tomiyama, C., Farmer, L., ... & Grant, S. R. (2008). The *Pseudomonas syringae* type III effector HopAM1 enhances virulence on water-stressed plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(3), 361–370.
- Gudesblat, G. E., Torres, P. S., & Vojno, A. A. (2009). Stomata and pathogens: warfare at the gates. *Plant Signaling & Behavior*, 4(12), 1114–1116.
- Gudesblat, G. E., Torres, P. S., & Vojnov, A. A. (2009). *Xanthomonas campestris* overcomes *Arabidopsis* stomatal innate immunity through a DSF cell-to-cell signal-regulated virulence factor. *Plant Physiology*, 149(2), 1017–1027.
- Guimaraes, R. L., & Stotz, H. U. (2004). Oxalate production by *Sclerotinia sclerotiorum* deregulates guard cells during infection. *Plant Physiology*, 136(3), 3703–3711.
- Lozano-Durán, R., Bourdais, G., He, S. Y., & Robatzek, S. (2014). The bacterial effector HopM1 suppresses PAMP-triggered oxidative burst and stomatal immunity. *New Phytologist*, 202(1), 259–269.
- McLachlan, D. H., Kopischke, M., & Robatzek, S. (2014). Gate control: guard cell regulation by microbial stress. *New Phytologist*, 203(4), 1049–1063.
- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K., & He, S. Y. (2006). Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell*, 126(5), 969–980.
- Melotto, M., Underwood, W., & He, S. Y. (2008). Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 46, 101–122.
- Melotto, M., Zhang, L., Oblessuc, P. R., & He, S. Y. (2017). Stomatal defense a decade later. *Plant Physiology*, 174(2), 561–571.
- Misas-Villamil, J. C., Kolodziejek, I., Crabill, E., Kaschani, F., Niessen, S., Shindo, T., ... & van der Hoorn, R. A. (2013). *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* uses proteasome inhibitor syringolin A to colonize from wound infection sites. *PLoS Pathogens*, 9(3), e1003281.
- Underwood, W., Melotto, M., & He, S. Y. (2007). Role of plant stomata in bacterial invasion. *Cellular Microbiology*, 9(7), 1621–1629.
- Zeng, W., Melotto, M., & He, S. Y. (2010). Plant stomata: a checkpoint of host immunity and pathogen virulence. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(5), 599–603.

7.2. Изменение свойств растительной клеточной стенки

Восприимчивые ответы растений нацелены и на преобразование растительной клеточной стенки (РКС) — компартмента, который представляет собой и «стол переговоров», и «плацдарм военных действий» паразита и хозяина (Jarvis, 2009; Bellincampi et al., 2014; Lionetti, Métraux, 2014). Поэтому события, разворачивающиеся при патогенезе в РКС, во многом определяют сценарий развития патологической системы. С одной стороны, РКС служит ключевым защитным барьером, который к тому же может дополнительно укрепляться при инвазии патогена (см. главу 5.1). С другой стороны, полисахариды РКС представляют собой основной ростовой субстрат для многих микроорганизмов, обитающих в теле растения. В связи с этим преобразование структуры РКС является необходимым процессом для формирования растительно-микробных патосистем, а именно для высвобождения низкомолекулярных усвояемых микроорганизмами углеводов из высокомолекулярных полисахаридов, эффективной миграции бактерии по апопласту при системной колонизации растений, а также патологического возобновления ростовых процессов при симптомах гипертрофии и гиперплазии (например, при агробактериальной инфекции). В последнем случае без «разрыхления» клеточной стенки невозможно увеличение размеров клеток, которое является ключевым аспектом развития патологий (см. главы 3.7, 7.7).

«Разрыхление» РКС при формировании растительно-микробных патосистем небезосновательно связывают с действием экстраклеточных ферментов фитопатогенов (см. главу 3.1). Однако оказалось, что для нарушения связей между полимерами в РКС и для разрушения полисахаридов при инфекции требуются и собственные «клеточностеночные» белки растения-хозяина. Разрыхление РКС — это нормальный физиологический процесс, который протекает при участии белков растений и в отсутствие патогенов, например при росте растительных клеток растяжением или при созревании плодов (Brummell, Harpster, 2001; Cosgrove, 2005). Подобная «естественная» модификация РКС растительными белками может быть выгодна и фитопатогенам, поскольку она обеспечивает появление низкомолекулярных углеводов и снижает барьерные свойства РКС. Поэтому фитопатогены приобрели способность индуцировать специфический восприимчивый ответ у хозяина, в результате которого происходит активация ферментов и других белков растения, задействованных в разрыхлении РКС. Лишение патогена возможности «эксплуатировать» некоторые хозяйские белки, модифицирующие полисахариды РКС и нарушающие связи между отдельными полимерами, часто приводит к снижению восприимчивости растений (см. ниже). Таким образом, некоторые ферменты и белки РКС служат в качестве факторов восприимчивости растений к фитопатогенам. Это, по всей видимости, связано с тем, что РКС весьма сложно поддается деструкции, и ферментов паразита может оказаться недостаточно для эффективного воздействия на этот клеточный компартмент.

Несмотря на большое разнообразие ферментов, разрушающих полимеры РКС, у бактерий, многообразие полисахаридов в составе этого компартмента несо-

поставимо большее. Это многообразие связано с нематричным синтезом сложных углеводов, который приводит к тому, что две молекулы одного и того же типа полисахарида могут быть не абсолютно похожими друг на друга (разная степень полимеризации, разное число и характер расположения боковых цепей и модифицирующих групп и т. д.) (Albersheim et al., 2010) и поэтому обладать разной «доступностью» для разрушающих/модифицирующих их ферментов (подробнее см. главу 3.1). У растений для модификации огромного разнообразия полисахаридов и нарушения связей между отдельными полимерами есть много (тысячи) белков, «содержать» которые позволяет большой геном. Даже гены определенных ферментов, имеющих один и тот же тип активности и субстратную специфичность, представлены в геномах растений в нескольких десятках вариантах. Так, у резуховидки выявлено 52 и 67 генов, кодирующих пектиметилэстеразы (отщепление метоксильной группы в молекуле полигалактуроновой кислоты) и полигалактуроназы (гидролитическое расщепление гликозидной связи в молекуле полигалактуроновой кислоты) соответственно (Arabidopsis Genome Initiative, 2000). У других видов растений мультигенные семейства «клеточностеночных» белков могут достигать еще больших размеров: количество генов пектинметилэстераз у томата (Vandevenne et al., 2009), тополя (Pelloux et al., 2007) и льна (Pinzon-Latorre, Deyholos, 2013) составляет 79, 89, 105 соответственно.

Фитопатогены, геномы которых на несколько порядков величин меньше, чем у растений, имеют в распоряжении от силы несколько десятков генов, кодирующих белки, модифицирующие структуру РКС, что, судя по экспериментальным работам, не является достаточным для развития типичных инфекций. Поэтому микроорганизмы «научились» использовать некоторые ферменты растений, чтобы «правильно» воздействовать на РКС при колонизации своих хозяев.

Среди растительных ферментов, разрушающих гликозидные связи в молекулах полисахаридов РКС (деполимеразы), для эндо- β -глюканаз, полигалактуроназ и пектатлиаз-подобных белков была продемонстрирована роль в индуцируемой восприимчивости растений; мутантные растения, дефектные по генам этих ферментов, проявляли большую устойчивость к патогенам, чем растения дикого типа (Vogel et al., 2002; Flors et al., 2007; Cantu et al., 2008). Кроме того, важная роль в патогенезе была продемонстрирована для экспансинов растений. Эти белки, не обладающие ферментативной активностью, нарушают взаимодействие связующих гликанов и микрофибрилл целлюлозы, что обеспечивает «разрыхление» РКС, в том числе при росте клеток растяжением и при созревании плодов (Cosgrove, 1997, 2015). Воздействие на клеточную стенку с помощью активации экспансинов своего хозяина осуществляется фитопатогенами для эффективной колонизации растений, и поэтому эти белки, безусловно, можно отнести к факторам восприимчивости (Kay et al., 2007; Cantu et al., 2008; Abuqamar et al., 2013).

«Разрыхление» РКС может обеспечивать, помимо снижения барьерных свойств этого компартмента, и «мобильность» полимеров, входящих в его состав. Такая «мобильность» описана на примере взаимодействия растений с пектобактериями (*Pectobacterium atrosepticum*) (Gorshkov et al., 2014, 2016).

Эти бактерии индуцируют восприимчивый ответ, в результате которого изменяется архитектура клеточных стенок сосудов первичной ксилемы, что приводит к высвобождению из РКС в люмен (полость сосуда) одного из пектиновых полисахаридов — рамногалактуронана I. В полости сосуда из этого полисахарида образуется внеклеточный матрикс для бактерий, необходимый патогену для формирования особых биопленко-подобных «многоклеточных» структур — бактериальных эмболов (см. главу 3.8). Таким образом, пектобактерии, индуцируя восприимчивый ответ у хозяина, используют высвобождающиеся из РКС полисахариды в качестве «строительного материала» для построения бактериальных эмболов — структур, обеспечивающих тотальную закупорку сосудов первичной ксилемы.

Помимо вышеупомянутых деполимераз и экспансинов, в восприимчивом ответе растений задействованы также метил- и ацетилэстеразы полисахаридов РКС. Эти ферменты отщепляют метоксильные и ацетильные группировки, которые способны «экранировать» полисахариды от действия деполимераз и таким образом препятствовать ферментативному разрушению полимеров, в том числе при патогенезе (Bellincampi et al., 2014). Для удаления этих группировок у фитопатогенов есть собственные метил- и ацетилэстеразы полисахаридов РКС. Однако действие только бактериальных углевод-эстераз не всегда является достаточным для полноценного развития патологий у инфицированного растения; на это указывает то, что ингибирование растительных углевод-эстераз повышает устойчивость растений к патогенам (Lionetti et al., 2007; An et al., 2008; Raiola et al., 2011). По всей видимости, важная роль растительных углевод-эстераз в патогенезе связана с высокой степенью специфичности этих ферментов к определенным вариантам строения молекул полисахаридов, а также другим факторам (рН, осмотичность, тип ткани). В пользу такой специфичности свидетельствует, в частности, большое разнообразие углевод-эстераз (от нескольких десятков до сотни) у растений (см. выше). Патогены, чтобы избежать необходимости содержать такую «громоздкую машину», включающую десятки ферментов, в своем миниатюрном геноме, «научились» использовать углевод-эстеразы своего хозяина для эффективного «разрыхления» РКС.

Индуцируемая восприимчивость растений к фитопатогенам сопряжена не только с разрушением полисахаридов РКС, но и с их биосинтезом. Показано, что для восприимчивости растений необходим активный синтез целлюлозы и каллозы; мутации в генах, кодирующих целлюлозо- и каллозосинтазу, повышали устойчивость растений к патогенам (Ellis et al., 2002; Cano-Delgado et al., 2003; Jacobs et al., 2003; Nishimura et al., 2003; Hernández-Blanco et al., 2007). Особенно неожиданным оказался эффект «отключения» (с помощью мутагенеза) патоген-индуцируемого гена фермента биосинтеза каллозы — хорошо известного «защитного» полимера, активация продукции которого является каноническим фитоиммунным ответом (см. главу 5.1); тем не менее инактивация каллозосинтазы приводила к формированию устойчивости растений к паразитам (Jacobs et al., 2003; Nishimura et al., 2003).

Положительный эффект инактивации целлюлозо- и каллозосинтазы на устойчивость во многом связывают с продемонстрированной конститутивной активацией защитных систем (салицилат-, жасмонат-, этилен-опосредуемых) в мутантных растениях (Ellis et al., 2002; Jacobs et al., 2003; Nishimura et al., 2003; Hernández-Blanco et al., 2007). Считается, что растения способны «чувствовать» уязвимость РКС (при отключении ферментов биосинтеза каллозы и целлюлозы), что «автоматически» приводит к мобилизации защитных систем и повышает устойчивость к биотическим стрессорам. Кроме того, роль каллозы в восприимчивости может быть связана с тем, что этот полимер, как предполагают, способен предохранять клетки микроорганизмов от действия антимикробных метаболитов растения, а также препятствовать распознаванию элиситоров и снижать благодаря этому «силу» иммунного ответа (Jacobs et al., 2003; Bellincampi et al., 2014).

При разных типах инфекций (типичных, латентных, абортивных) каллоза в растениях обычно откладывается в виде папилл — структур клеточной стенки, которые, помимо этого полимера, содержат и многие другие метаболиты (см. главу 5.1). Папиллы образуются как в устойчивых, так и в восприимчивых растениях, в зависимости от чего эти структуры условно разделяют на эффективные и неэффективные соответственно. «Эффективность» папилл зависит от состава входящих в них метаболитов, а также динамики (скорости) их формирования (Pessina et al., 2016). Образование папилл сопряжено с везикулярным транспортом различных веществ в РКС, который координируется различными регуляторными системами растений (Hückelhoven, 2014). Один из предполагаемых регуляторов такого везикулярного транспорта — белок MLO (Mildew resistance locus) — является хорошо известным фактором восприимчивости. Мутанты по гену *mlo* проявляют устойчивость к мучнистой росе (Piffanelli et al., 2004; Consonni et al., 2006). Считается, что через белок MLO, который аккумулируется в формирующихся папиллах, патогены могут контролировать транспорт различных соединений в эти структуры и благодаря этому снижать «эффективность» папилл как факторов устойчивости (Bhat et al., 2005; Miklis et al., 2007; Pessina et al., 2016).

Таким образом, определенные типы восприимчивых ответов растения, сопряженные с активацией некоторых «клеточностеночных» белков хозяина, позволяют патогену координировать процесс «правильной» для него модификации структуры РКС при патогенезе. Благодаря такой модификации апопласт преобразуется в удобную экологическую нишу для патогена, в рамках которой микроорганизм оказывается защищенным от систем фитоиммунитета хозяина, получает доступный субстрат в виде легкоусвояемых низкомолекулярных углеводов и способен эффективно передвигаться по растению благодаря снижению барьерных свойств РКС.

Литература:

- Abuqamar, S., Ajeb, S., Sham, A., Enan, M. R., & Iratni, R. (2013). A mutation in the expansin-like A2 gene enhances resistance to necrotrophic fungi and hypersensitivity to abiotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant Pathology*, 14(8), 813–827.
- Albersheim, P., Darvill, A., Roberts, K., Sederoff, R., & Staehelin, A. (2010). Plant cell walls. Garland Science.
- An, S. H., Sohn, K. H., Choi, H. W., Hwang, I. S., Lee, S. C., & Hwang, B. K. (2008). Pepper pectin methylesterase inhibitor protein CaPMEI1 is required for antifungal activity, basal disease resistance and abiotic stress tolerance. *Planta*, 228(1), 61–78.
- Bellincampi, D., Cervone, F., & Lionetti, V. (2014). Plant cell wall dynamics and wall-related susceptibility in plant — pathogen interactions. *Frontiers in Plant Science*, 5, 228.
- Bhat, R. A., Miklis, M., Schmelzer, E., Schulze-Lefert, P., & Panstruga, R. (2005). Recruitment and interaction dynamics of plant penetration resistance components in a plasma membrane microdomain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(8), 3135–3140.
- Brummell, D. A., & Harpster, M. H. (2001). Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Molecular Biology*, 47(1–2), 311–339.
- Cano-Delgado, A., Penfield, S., Smith, C., Catley, M., & Bevan, M. (2003). Reduced cellulose synthesis invokes lignification and defense responses in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 34(3), 351–362.
- Cantu, D., Vicente, A. R., Greve, L. C., Dewey, F. M., Bennett, A. B., Labavitch, J. M., & Powell, A. L. T. (2008). The intersection between cell wall disassembly, ripening, and fruit susceptibility to *Botrytis cinerea*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(3), 859–864.
- Consonni, C., Humphry, M. E., Hartmann, H. A., Livaja, M., Durner, J., Westphal, L., ... & Somerville, S. C. (2006). Conserved requirement for a plant host cell protein in powdery mildew pathogenesis. *Nature Genetics*, 38(6), 716–720.
- Cosgrove, D. J. (1997). Relaxation in a high-stress environment: the molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement. *The Plant Cell*, 9(7), 1031.
- Cosgrove, D. J. (2005). Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(11), 850–861.
- Cosgrove, D. J. (2015). Plant expansins: diversity and interactions with plant cell walls. *Current Opinion in Plant Biology*, 25, 162–172.
- Ellis, C., Karafyllidis, I., Wasternack, C., & Turner, J. G. (2002). The *Arabidopsis* mutant *cevl* links cell wall signaling to jasmonate and ethylene responses. *The Plant Cell Online*, 14(7), 1557–1566.
- Flors, V., Leyva, M. D. L. O., Vicedo, B., Finiti, I., Real, M. D., García-Agustín, P., ... & González-Bosch, C. (2007). Absence of the endo- β -1,4-glucanases Cel1 and Cel2 reduces susceptibility to *Botrytis cinerea* in tomato. *The Plant Journal*, 52(6), 1027–1040.

Gorshkov, V., Daminova, A., Ageeva, M., Petrova, O., Gogoleva, N., Tarasova, N., & Gogolev, Y. (2014). Dissociation of a population of *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 in tobacco plants: formation of bacterial emboli and dormant cells. *Protoplasma*, 251(3), 499–510.

Gorshkov, V. Y., Daminova, A. G., Mikshina, P. V., Petrova, O. E., Ageeva, M. V., Salnikov, V. V., ... & Gogolev, Y. V. (2016). Pathogen-induced conditioning of the primary xylem vessels — a prerequisite for the formation of bacterial emboli by *Pectobacterium atrosepticum*. *Plant Biology*, 18(4), 609–617.

Hernández-Blanco, C., Feng, D. X., Hu, J., Sánchez-Vallet, A., Deslandes, L., Llorente, F., ... & Anderson, L. K. (2007). Impairment of cellulose synthases required for *Arabidopsis* secondary cell wall formation enhances disease resistance. *The Plant Cell*, 19(3), 890–903.

Hückelhoven, R. (2014). The effective papilla hypothesis. *New Phytologist*, 204(3), 438–440.

Jacobs, A. K., Lipka, V., Burton, R. A., Panstruga, R., Strizhov, N., Schulze-Lefert, P., & Fincher, G. B. (2003). An *Arabidopsis* callose synthase, GSL5, is required for wound and papillary callose formation. *The Plant Cell*, 15(11), 2503–2513.

Jarvis, M. C. (2009). Plant cell walls: supramolecular assembly, signalling and stress. *Structural Chemistry*, 20(2), 245–253.

Kay, S., Hahn, S., Marois, E., Hause, G., & Bonas, U. (2007). A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science*, 318(5850), 648–651.

Lionetti, V., Raiola, A., Camardella, L., Giovane, A., Obel, N., Pauly, M., ... & Bellincampi, D. (2007). Overexpression of pectin methylesterase inhibitors in *Arabidopsis* restricts fungal infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology*, 143(4), 1871–1880.

Lionetti, V., & Métraux, J. P. (2014). Plant cell wall in pathogenesis, parasitism and symbiosis. *Frontiers in Plant Science*, 5, 612.

Miklis, M., Consonni, C., Bhat, R. A., Lipka, V., Schulze-Lefert, P., & Panstruga, R. (2007). Barley MLO modulates actin-dependent and actin-independent antifungal defense pathways at the cell periphery. *Plant Physiology*, 144(2), 1132–1143.

Nishimura, M. T., Stein, M., Hou, B. H., Vogel, J. P., Edwards, H., & Somerville, S. C. (2003). Loss of a callose synthase results in salicylic acid-dependent disease resistance. *Science*, 301(5635), 969–972.

Pelloux, J., Rustérucci, C., & Mellerowicz, E. J. (2007). New insights into pectin methylesterase structure and function. *Trends in Plant Science*, 12(6), 267–277.

Pessina, S., Lenzi, L., Perazzolli, M., Campa, M., Dalla Costa, L., Urso, S., ... & Malnoy, M. (2016). Knockdown of MLO genes reduces susceptibility to powdery mildew in grapevine. *Horticulture Research*, 3, 16016.

Piffanelli, P., Ramsay, L., Waugh, R., Benabdelmouna, A., D'Hont, A., Hollricher, K., ... & Panstruga, R. (2004). A barley cultivation-associated polymorphism conveys resistance to powdery mildew. *Nature*, 430(7002), 887–891.

Pinzón-Latorre, D., & Deyholos, M. K. (2013). Characterization and transcript profiling of the pectin methylesterase (PME) and pectin methylesterase inhibitor (PMEI) gene families in flax (*Linum usitatissimum*). *BMC Genomics*, 14(1), 742.

Raiola, A., Lionetti, V., Elmaghraby, I., Immerzeel, P., Mellerowicz, E. J., Salvi, G., ... & Bellincampi, D. (2011). Pectin methylesterase is induced in *Arabidopsis* upon infection and is necessary for a successful colonization by necrotrophic pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(4), 432–440.

Vandevenne, E., Van Buggenhout, S., Duvetter, T., Brouwers, E., Declerck, P. J., Hendrickx, M. E., ... & Gils, A. (2009). Development and evaluation of monoclonal antibodies as probes to assess the differences between two tomato pectin methylesterase isoenzymes. *Journal of Immunological Methods*, 349(1), 18–27.

Vogel, J. P., Raab, T. K., Schiff, C., & Somerville, S. C. (2002). PMR6, a pectate lyase — like gene required for powdery mildew susceptibility in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 14(9), 2095–2106.

7.3. Модуляция водного транспорта

Патоген-индуцируемые восприимчивые ответы растений могут быть связаны с изменениями параметров водного транспорта в организме хозяина. Такие изменения, в частности, выражаются симптомами увядания, которые являются следствием закупорки сосудов ксилемы, приводящей к снижению их гидравлической проводимости. Вазкулярную (сосудистую) дисфункцию инфицированных растений долгое время связывали с механической блокировкой сосудов клетками патогенов и их метаболитами (в первую очередь экзополисахаридами) (VanderMolen et al., 1983; Hopkins, 1989; van Doorn, 1989; Danhorn, Fuqua, 2007). Однако оказалось, что бактериальная биомасса внутри увядающих растений недостаточна для обеспечения закупорки такого количества сосудов, которое бы значительно сказывалось на интенсивности водного потока во всем растении. Это дополнительно подтверждается тем, что большинство сосудов в увядающих растениях остается не колонизированными бактериями (Sun et al., 2013).

Механическую блокировку восходящего потока воды в инфицированных растениях обеспечивают не столько сами по себе бактериальные клетки, сколько индуцируемые ими процессы преобразования сосудов ксилемы, то есть реакции самого растения-хозяина (Klosterman et al., 2009; Beattie, 2011; Yadeta, Thomma, 2013; Sun et al., 2013). Эти реакции заключаются в патоген-индуцируемом формировании тилл (выростов клеток ксилемной паренхимы в полости сосудов, рис. 5.1.3), а также во вбросе желирующих субстанций в люмен сосудов и в образовании в них гелей (Beckman, 2000; Yadeta, Thomma, 2013). Формирование тилл и гелей в сосудах изначально рассматривали как защитную реакцию, которая препятствует системному распространению фитопатогенов в растении по ксилеме (см. главу 5.1). Однако оказалось, что тиллы и гели далеко не всегда способны препятствовать колонизации патогеном своего хозяина (Yadeta, Thomma, 2013; Wang et al., 2015). Более того, в ряде случаев образование тилл происходит более динамично в восприимчивых растениях, чем в устойчивых (Sun et al., 2013), а образующиеся в сосудах гели могут использоваться бактериями в качестве внеклеточного матрикса при формировании «многоклеточных» биопленкоподобных структур (Gorshkov et al., 2014, 2016). Это означает, что роль гелей и тилл во взаимодействии фитопатогенов с растениями дуалистична: с одной стороны, эти структуры могут «иммобилизовать» клетки некоторых патогенов, препятствуя их системному распространению в растении; с другой стороны, тиллы и гели, негативно влияя на гидравлическую проводимость сосудов, усугубляют развитие симптомов заболевания и благоприятствуют размножению ряда фитопатогенных бактерий (Sun et al., 2013; Wang et al., 2015; Bispo et al., 2016).

В пользу увеличения восприимчивости растений при снижении проводимости их гидравлической системы свидетельствует ряд экспериментальных данных. Так, например, известно, что растения, испытывающие водный дефицит, проявляют большую восприимчивость к некоторым фитопатогенам (McElrone et al., 2001, 2003; Gomes et al., 2003; Thorne et al., 2006; Choat et al., 2009; Oliva et al., 2014), а патогенез, индуцируемый *Xylella fascidiosa*, сопряжен с реакциями хозяина,

сходными со стрессовыми ответами растения на недостаток воды (Daugherty et al., 2010). Кроме того, у этилен-нечувствительных и этилен-дефектных мутантов растений, в которых регулируемое этим фитогормоном образование тилл и гелей подавляется, увеличивается устойчивость к *X. fascioides* и *Clavibacter michiganensis* по сравнению с растениями дикого типа (Pérez-Donoso et al., 2007; Balaji et al., 2008).

Существует несколько предположений относительно причин повышения восприимчивости растений к паразитическим организмам при водном дефиците. Во-первых, при нарушении проводимости сосудов ксилемы в растении подавляются многие процессы первичного метаболизма, в том числе фотосинтез и флоэмный транспорт ассимилятов, которые обеспечивают макроорганизм энергией, необходимой, в частности, для активации защитных ответов (Bolton, 2009; Vispo et al., 2016). Во-вторых, поскольку ответы растений на абиотические стрессоры (в том числе недостаток воды) находятся в приоритете по сравнению с защитными реакциями на патогены (Mittler, 2006; Beattie, 2011), восстановление гомеостаза при водном дефиците лишает хозяина возможности полноценно реагировать на паразитический организм. Вероятно, поэтому многие патогены, индуцируя нарушение гидравлической проводимости сосудов, целенаправленно создают в растениях водный дефицит. Это дополнительно подтверждается негативным влиянием АБК — фитогормона абиотического стресса (в том числе водного дефицита) — на устойчивость растений к большинству фитопатогенов (Audenaert et al., 2002; Mohr, Cahill, 2003; Mauch-Mani, Mauch, 2005).

В-третьих, снижение скорости ксилемного потока, по всей вероятности, может способствовать увеличению содержания низкомолекулярных углеводов в небогатых питательным субстратом сосудах ксилемы, что благоприятным образом сказывается на размножении паразита. Подобный вброс осмотически активных сахаров в сосуды при газовой эмболии рассматривается как адаптивная реакция растения, направленная на восстановление транспорта воды (Nardini et al., 2011; Brodersen, McElrone, 2013). В-четвертых, патогенам, обитающим в сосудах, уменьшение гидравлической проводимости сосудистой системы хозяина обеспечивает возможность реализации «социального поведения», которое играет ключевую роль в вирулентности микроорганизмов (см. главу 4.1). Внеклеточные сигнальные молекулы (аутоиндукторы), посредством которых осуществляется межклеточная коммуникация бактерий, не могут накапливаться в бактериальном микроокружении при интенсивном транспорте воды. Это не позволяет бактериям «общаться» между собой и координировать свои действия, что создает «хаос» в популяции микробов и препятствует эффективному взаимодействию паразита с хозяином. Остановка (или существенное снижение интенсивности) ксилемного транспорта, в свою очередь, может способствовать накоплению аутоиндукторов и полноценному проявлению вирулентности патогена.

В-пятых, подавление восходящего тока жидкости создает условия для нисходящей миграции бактерий по сосудам ксилемы, что позволяет микроорганизмам расселиться из надземных органов хозяина в подземные, в том числе для переме-

щения из основного побега в боковые, а также для переживания неблагоприятных условий в корневой системе и в запасующих органах (клубни, корневища) (Wallis et al., 1973; Boher et al., 1995; De La Fuente et al., 2007; Czajkowski et al., 2010; Misas-Villamil et al., 2013; Sun et al., 2013; Gorshkov et al., 2014). Интересно, что именно сосуды ксилемы (в которых в норме осуществляется восходящий ток жидкости), а не ситовидные элементы флоэмы (где ток жидкости преимущественно нисходящий) используются патогенами для нисходящей миграции по организму хозяина. Лишь ограниченное число видов фитопатогенных бактерий способно колонизировать флоэму; причем эти виды, как правило, не колонизируют другие ткани растений и попадают в организм хозяина благодаря насекомым, питающимся флоэмным соком (Bové, Garnier, 2003; Oshima et al., 2004). Однозначного заключения о причинах «непригодности» флоэмы в качестве места обитания для большинства фитопатогенных бактерий пока не сделано; наиболее вероятная причина этого, как считают, связана с чрезмерно высокой осмотичностью флоэмного сока (Bové, Garnier, 2003).

Основным препятствием для нисходящей миграции бактерий по сосудам ксилемы является то, что скорость восходящего потока на несколько порядков величин превышает скорость передвижения бактерий (Purcell, Hopkins, 1996; Meng et al., 2005; Windt et al., 2006). Однако ряд фитопатогенов нейтрализуют этот негативный фактор, снижая гидравлическую проводимость сосудов путем индукции восприимчивых ответов хозяина, связанных с образованием тилл и гелей в проводящей системе. Это, в частности, подтверждается тем, что системное распространение фитопатогенной бактерии *Xylella fascidiosa* в восприимчивых растениях, в том числе перемещение микроорганизма в боковые побеги, сопряжено с формированием большого количества тилл, в то время как в устойчивых сортах, где блокировка сосудов тиллами выражена в значительно меньшей степени, патоген локализуется преимущественно в месте инфицирования и не способен эффективно перемещаться по растению (Sun et al., 2013).

Несмотря на то, что подавление ксилемного потока имеет важное значение для эффективной колонизации патогенами растения-хозяина, значительное снижение гидравлической проводимости сосудов может и негативным образом сказываться на развитии фитопатогенов *in planta*, в особенности биотрофных. Этот негативный эффект заключается в быстрой гибели растения-хозяина в результате водного дефицита, которая лишает паразита источника питания и экологической ниши. Чтобы предотвратить такой эффект, некоторые фитопатогены индуцируют в клетках растений специальные морфогенетические программы, позволяющие компенсировать дисфункцию колонизированных сосудов ксилемы (Ваауен, 1986; Reusche et al., 2012). Эти программы заключаются в образовании «новых» сосудов ксилемы либо в результате увеличения активности камбия, либо посредством дедифференцировки клеток обкладки сосудистого пучка или ксилемной паренхимы в сосуды. Индукция патогеном таких ответов у инфицированного растения продлевает «жизнь» патологической системы и даже может повышать устойчивость растений к засухе, что благоприятным образом сказывается и на самом паразитическом

организме (Reusche et al., 2012). Таким образом, путем индукции восприимчивых ответов фитопатогены способны регулировать водный обмен в организме растения-хозяина, оптимизируя за счет этого среду своего обитания.

Литература:

Audenaert, K., De Meyer, G. B., & Höfte, M. M. (2002). Abscisic acid determines basal susceptibility of tomato to *Botrytis cinerea* and suppresses salicylic acid-dependent signaling mechanisms. *Plant Physiology*, 128(2), 491–501.

Baayen, R. P. (1986). Regeneration of vascular tissues in relation to *Fusarium* wilt resistance of carnation. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 92(6), 273–285.

Balaji, V., Mayrose, M., Sherf, O., Jacob-Hirsch, J., Eichenlaub, R., Iraki, N., ... & Sessa, G. (2008). Tomato transcriptional changes in response to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* reveal a role for ethylene in disease development. *Plant Physiology*, 146(4), 1797–1809.

Beattie, G. A. (2011). Water relations in the interaction of foliar bacterial pathogens with plants. *Annual Review of Phytopathology*, 49, 533–555.

Beckman, C. H. (2000). Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 57(3), 101–110.

Bispo, W. M., Araujo, L., Cacique, I. S., DaMatta, F. M., & Rodrigues, F. A. (2016). Photosynthesis impairments precede noticeable changes in leaf water status of mango plants infected by *Ceratocystis fimbriata*. *European Journal of Plant Pathology*, 146(2), 419–432.

Boher, B., Kpemoua, K., Nicole, M., Luisetti, J., Geiger, J. P. (1995). Ultrastructure of interactions between *Cassava* and *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*: cytochemistry of cellulose and pectin degradation in a susceptible. *Phytopathology*, 85, 777–788.

Bolton, M. D. (2009). Primary metabolism and plant defense — fuel for the fire. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(5), 487–497.

Bové, J. M., & Garnier, M. (2003). Phloem-and xylem-restricted plant pathogenic bacteria. *Plant Science*, 164(3), 423–438.

Brodersen, C., & McElrone, A. (2013). Maintenance of xylem network transport capacity: a review of embolism repair in vascular plants. *Frontiers in Plant Science*, 4, 108.

Choat, B., Gambetta, G. A., Wada, H., Shackel, K. A., & Matthews, M. A. (2009). The effects of Pierce's disease on leaf and petiole hydraulic conductance in *Vitis vinifera* cv. Chardonnay. *Physiologia Plantarum*, 136(4), 384–394.

Czajkowski, R., de Boer, W. J., van Veen, J. A., van der Wolf, J. M. (2010). Downward vascular translocation of a green fluorescent proteintagged strain of *Dickeya* sp. (Biovar 3) from stem and leaf inoculation sites on potato. *Phytopathology*, 100, 1128–1137.

Danhorn, T., & Fuqua, C. (2007). Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 61, 401–422.

Daugherty, M. P., Lopes, J. R., & Almeida, R. P. (2010). Strain-specific alfalfa water stress induced by *Xylella fastidiosa*. *European Journal of Plant Pathology*, 127(3), 333–340.

De La Fuente, L., Burr, T. J., & Hoch, H. C. (2007). Mutations in type I and type IV pilus biosynthetic genes affect twitching motility rates in *Xylella fastidiosa*. *Journal of Bacteriology*, 189(20), 7507–7510.

Gomes, M. M. A., Lagôa, A. M. M. A., Machado, E. C., & Medina, C. L. (2003). Abscisic acid and indole-3-acetic acid contents in orange trees infected by *Xylella fastidiosa* and submitted to cycles of water stress. *Plant Growth Regulation*, 39(3), 263–270.

Gorshkov, V., Daminova, A., Ageeva, M., Petrova, O., Gogoleva, N., Tarasova, N., & Gogolev, Y. (2014). Dissociation of a population of *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 in tobacco plants: formation of bacterial emboli and dormant cells. *Protoplasma*, 251(3), 499–510.

Gorshkov, V. Y., Daminova, A. G., Mikshina, P. V., Petrova, O. E., Ageeva, M. V., Salnikov, V. V., ... & Gogolev, Y. V. (2016). Pathogen-induced conditioning of the primary xylem vessels — a prerequisite for the formation of bacterial emboli by *Pectobacterium atrosepticum*. *Plant Biology*, 18(4), 609–617.

Hopkins, D. L. (1989). *Xylella fastidiosa*: xylem-limited bacterial pathogen of plants. *Annual Review of Phytopathology*, 27(1), 271–290.

Klosterman, S. J., Atallah, Z. K., Vallad, G. E., & Subbarao, K. V. (2009). Diversity, pathogenicity, and management of *Verticillium* species. *Annual Review of Phytopathology*, 47, 39–62.

Mauch-Mani, B., & Mauch, F. (2005). The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(4), 409–414.

McElrone, A. J., Sherald, J. L., & Forseth, I. N. (2001). Effects of water stress on symptomatology and growth of *Parthenocissus quinquefolia* infected by *Xylella fastidiosa*. *Plant Disease*, 85(11), 1160–1164.

McElrone, A. J., Sherald, J. L., & Forseth, I. N. (2003). Interactive effects of water stress and xylem-limited bacterial infection on the water relations of a host vine. *Journal of Experimental Botany*, 54(381), 419–430.

Meng, Y., Li, Y., Galvani, C. D., Hao, G., Turner, J. N., Burr, T. J., & Hoch, H. C. (2005). Upstream migration of *Xylella fastidiosa* via pilus-driven twitching motility. *Journal of Bacteriology*, 187(16), 5560–5567.

Misas-Villamil, J. C., Kolodziejek, I., Crabill, E., Kaschani, F., Niessen, S., Shindo, T., ... & van der Hoorn, R. A. (2013). *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* uses proteasome inhibitor syringolin A to colonize from wound infection sites. *PLoS Pathogens*, 9(3), e1003281.

Mittler, R. (2006). Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science*, 11(1), 15–19.

Mohr, P. G., & Cahill, D. M. (2003). Abscisic acid influences the susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Peronospora parasitica*. *Functional Plant Biology*, 30(4), 461–469.

- Nardini, A., Gullo, M. A. L., & Salleo, S. (2011). Refilling embolized xylem conduits: is it a matter of phloem unloading? *Plant Science*, *180*(4), 604–611.
- Oliva, J., Stenlid, J., & Martínez-Vilalta, J. (2014). The effect of fungal pathogens on the water and carbon economy of trees: implications for drought-induced mortality. *New Phytologist*, *203*(4), 1028–1035.
- Oshima, K., Kakizawa, S., Nishigawa, H., Jung, H. Y., Wei, W., Suzuki, S., ... & Namba, S. (2004). Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nature Genetics*, *36*(1), 27–29.
- Pérez-Donoso, A. G., Greve, L. C., Walton, J. H., Shackel, K. A., & Labavitch, J. M. (2007). *Xylella fastidiosa* infection and ethylene exposure result in xylem and water movement disruption in grapevine shoots. *Plant Physiology*, *143*(2), 1024–1036.
- Purcell, A. H., & Hopkins, D. L. (1996). Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, *34*(1), 131–151.
- Reusche, M., Thole, K., Janz, D., Truskina, J., Rindfleisch, S., Drübert, C., ... & Teichmann, T. (2012). *Verticillium* infection triggers VASCULAR-RELATED NAC DOMAIN7 — dependent *de novo* xylem formation and enhances drought tolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, *24*(9), 3823–3837.
- Sun, Q., Sun, Y., Walker, M. A., & Labavitch, J. M. (2013). Vascular occlusions in grapevines with Pierce's disease make disease symptom development worse. *Plant Physiology*, *161*(3), 1529–1541.
- Thorne, E. T., Stevenson, J. F., Rost, T. L., Labavitch, J. M., & Matthews, M. A. (2006). Pierce's disease symptoms: comparison with symptoms of water deficit and the impact of water deficits. *American Journal of Enology and Viticulture*, *57*(1), 1–11.
- van Doorn, W. G., Schurer, K., & de Witte, Y. (1989). Role of endogenous bacteria in vascular blockage of cut rose flowers. *Journal of Plant Physiology*, *134*(3), 375–381.
- VanderMolen, G. E., Labavitch, J. M., Strand, L. L., & DeVay, J. E. (1983). Pathogen-induced vascular gels: Ethylene as a host intermediate. *Physiologia Plantarum*, *59*(4), 573–580.
- Wallis, F. M., Rijkenberg, F. H. J., Joubert, J. J., Martin, M. M. (1973). Ultrastructural histopathology of cabbage leaves infected with *Xanthomonas campestris*. *Physiological Plant Pathology*, *3*, 371–378.
- Wang, M., Sun, Y., Sun, G., Liu, X., Zhai, L., Shen, Q., & Guo, S. (2015). Water balance altered in cucumber plants infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. *Scientific Reports*, *5*, 7722.
- Windt, C. W., Vergeldt, F. J., De Jager, P. A., & Van As, H. (2006). MRI of long-distance water transport: a comparison of the phloem and xylem flow characteristics and dynamics in poplar, castor bean, tomato and tobacco. *Plant, Cell & Environment*, *29*(9), 1715–1729.
- Yadeta, K. A., & Thomma, B. P. (2013). The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. *Frontiers in Plant Science*, *4*, 97.

7.4. Перераспределение фотоассимилятов

Благодаря индукции восприимчивых ответов хозяина фитопатогены способствуют оттоку фотоассимилятов к месту инфекции, где они потребляются паразитическим микроорганизмом в качестве ростового субстрата. Поступление продуктов фотосинтеза в инфицированный участок происходит вследствие влияния патогена на донорно-акцепторные отношения в растении, которые координируют направленность транспорта фотоассимилятов. Простые углеводы, синтезируемые в донорном участке (где интенсивно протекают процессы фотосинтеза), транспортируются в акцепторный (где фотоассимиляты используются). При патогенезе акцепторные свойства инфицированного участка значительно увеличиваются.

Донорно-акцепторные взаимоотношения в растениях во многом регулируются активностью апопластных инвертаз, которые гидролизуют сахарозу — основную транспортную форму углеводов в растении, до глюкозы и фруктозы, что обеспечивает формирование концентрационного градиента сахарозы и разгрузку флоэмы (Turgeon, 2000; Williams et al., 2000). Активность апопластных инвертаз резко повышается в месте инфекции, стимулируя отток к нему фотоассимилятов и увеличение уровня гексоз (глюкоза, фруктоза) (Biemelt, Sonnewald, 2006; Bonfig et al., 2006; Kocal et al., 2008; Liu et al., 2015). Это, в свою очередь, может по-разному сказываться на взаимодействии патогена и хозяина. С одной стороны, индукция апопластных инвертаз в месте инфекции может приводить к увеличению устойчивости растения, которую называют *high sugar resistance* (устойчивость в результате высокого содержания сахаров) (Horsfall, Dimond, 1957). При этом высокий уровень гексоз вызывает подавление фотосинтеза, активацию экспрессии генов защитных PR-белков и генерацию активных форм кислорода (АФК) (Biemelt, Sonnewald, 2006; Seo et al., 2007; Essmann et al., 2008; Proels, Huckelhoven, 2014). Кроме того, интенсивный отток ассимилятов к сайту инфекции влечет за собой истощение энергетических ресурсов растения в целом. В результате этого формируется дисбаланс углерода в растении, который, как предполагают, служит причиной активации фитоиммунных ответов (Seo et al., 2007). Действительно, на примере ряда растительно-микробных патосистем показано участие инвертаз в фитоиммунитете (Essmann et al., 2008; Bonfig et al., 2010; Sonnewald et al., 2012; Sun et al., 2013). Но, с другой стороны, продемонстрировано, что активация инвертаз может служить и критерием восприимчивого ответа растений к ряду фитопатогенов (Conrath et al., 2003; Biemelt, Sonnewald, 2006; Berger et al., 2007; Kocal et al., 2008; Siemens et al., 2011; Liu et al., 2015). При этом индукция инвертазной активности, по всей видимости, обеспечивает микроорганизмы легкодоступным питательным субстратом.

Особенно важную роль инвертазы играют в развитии симптомов гипертрофии и гиперплазии, в том числе при формировании галлов, вызываемых фитопатогенными агробактериями (см. главы 3.7, 7.7). Патологическое разрастание тканей растения не было бы возможным без интенсивного притока к инфицированной области фотоассимилятов, который и обеспечивается активацией апопластных

инвертаз (Deeken et al., 2006; Siemens et al., 2011). Снижение инвертазной активности в растениях (с помощью гетерологичной экспрессии ингибиторов этих ферментов) подавляет развитие симптомов гипертрофии и гиперплазии (Siemens et al., 2011). Кроме того, инвертазы участвуют в развитии мягких гнилей и черной пятнистости, вызываемых пектобактериями и ксантомонадами соответственно (Conrath et al., 2003; Kocal et al., 2008). Таким образом, несмотря на то, что инвертазы опосредуют защитные ответы растений, индукция этих ферментов при патогенезе является и важным критерием восприимчивости.

Поступление простых углеводов в колонизированную патогеном область растения-хозяина может обеспечиваться работой не только инвертаз, но и транспортеров, названных SWEET. Эти транспортеры переносят простые сахара из цитоплазмы в апопласт, где они могут «перехватываться» паразитом (Chen et al., 2010; Cohn et al., 2014; Eom et al., 2015; Zhou et al., 2015). Мутации в генах SWEET или их сайленсинг лишает патоген возможности индуцировать эффлюкс питательного субстрата из протопластов хозяина, что выражается в увеличении устойчивости растений (Yuan et al., 2010; Chen et al., 2010; Chong et al., 2014). В связи с этим транспортеры SWEET относят к факторам восприимчивости растений ко многим фитопатогенам.

Для размножения в организме хозяина некоторые фитопатогены могут «притягивать» к себе не только простые углеводы, но и органические кислоты. Так, *Xanthomonas oryzae* индуцирует выброс в апопласт (где располагаются клетки патогена) α -кетоглутаровой кислоты из протопласта. Для этого ксантомонады синтезируют белок KgtP, который секретируется из клеток бактерий с помощью системы секреции третьего типа и встраивается в плазматическую мембрану клеток растений (Guo et al., 2012). KgtP в мембране работает как порин, обеспечивая утечку α -кетоглутаровой кислоты из растительных клеток. В свою очередь, истощение резерва α -кетоглутаровой кислоты в растительной клетке приводит к активации экспрессии генов ферментов ее биосинтеза, что позволяет патогену непрерывно снабжать себя ростовым субстратом за счет «эксплуатирования» своего хозяина.

Таким образом, перераспределение фотоассимилятов и других низкомолекулярных продуктов первичного метаболизма в растительных тканях при инфекции представляет собой важный аспект восприимчивого ответа хозяина, который обеспечивает патоген питательным субстратом и приводит к развитию симптомов заболевания.

Литература:

- Beattie, G. A. (2011). Water relations in the interaction of foliar bacterial pathogens with plants. *Annual Review of Phytopathology*, 49, 533–555.
- Berger, S., Sinha, A. K., & Roitsch, T. (2007). Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant — pathogen interactions. *Journal of Experimental Botany*, 58(15–16), 4019–4026.

Biemelt, S., & Sonnewald, U. (2006). Plant — microbe interactions to probe regulation of plant carbon metabolism. *Journal of Plant Physiology*, 163(3), 307–318.

Bonfig, K. B., Schreiber, U., Gabler, A., Roitsch, T., & Berger, S. (2006). Infection with virulent and avirulent *P. syringae* strains differentially affects photosynthesis and sink metabolism in *Arabidopsis* leaves. *Planta*, 225(1), 1–12.

Bonfig, K. B., Gabler, A., Simon, U. K., Luschin-Ebengreuth, N., Hatz, M., Berger, S., ... & Roitsch, T. (2010). Post-translational derepression of invertase activity in source leaves via down-regulation of invertase inhibitor expression is part of the plant defense response. *Molecular Plant*, 3(6), 1037–1048.

Chen, L. Q., Hou, B. H., Lalonde, S., Takanaga, H., Hartung, M. L., Qu, X. Q., ... & Chermak, D. (2010). Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature*, 468(7323), 527–532.

Chen, L. Q., Qu, X. Q., Hou, B. H., Sosso, D., Osorio, S., Fernie, A. R., & Frommer, W. B. (2012). Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport. *Science*, 335(6065), 207–211.

Chong, J., Piron, M. C., Meyer, S., Merdinoglu, D., Bertsch, C., & Mestre, P. (2014). The SWEET family of sugar transporters in grapevine: VvSWEET4 is involved in the interaction with *Botrytis cinerea*. *Journal of Experimental Botany*, 65(22), 6589–6601.

Cohn, M., Bart, R. S., Shybut, M., Dahlbeck, D., Gomez, M., Morbitzer, R., ... & Staskawicz, B. J. (2014). *Xanthomonas axonopodis* virulence is promoted by a transcription activator-like effector — mediated induction of a SWEET sugar transporter in cassava. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(11), 1186–1198.

Conrath, U., Linke, C., Jeblick, W., Geigenberger, P., Quick, W. P., & Neuhaus, H. E. (2003). Enhanced resistance to *Phytophthora infestans* and *Alternaria solani* in leaves and tubers, respectively, of potato plants with decreased activity of the plastidic ATP/ADP transporter. *Planta*, 217(1), 75–83.

Deeken, R., Engelmann, J. C., Efetova, M., Czirjak, T., Müller, T., Kaiser, W. M., ... & Dandekar, T. (2006). An integrated view of gene expression and solute profiles of *Arabidopsis* tumors: a genome-wide approach. *The Plant Cell*, 18(12), 3617–3634.

Eom, J. S., Chen, L. Q., Sosso, D., Julius, B. T., Lin, I. W., Qu, X. Q., ... & Frommer, W. B. (2015). SWEETs, transporters for intracellular and intercellular sugar translocation. *Current Opinion in Plant Biology*, 25, 53–62.

Essmann, J., Schmitz-Thom, I., Schön, H., Sonnewald, S., Weis, E., & Scharte, J. (2008). RNA interference-mediated repression of cell wall invertase impairs defense in source leaves of tobacco. *Plant Physiology*, 147(3), 1288–1299.

Guo, W., Cai, L. L., Zou, H. S., Ma, W. X., Liu, X. L., Zou, L. F., ... & Chen, G. Y. (2012). Ketoglutarate transport protein KgtP is secreted through the type III secretion system and contributes to virulence in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(16), 5672–5681.

Horsfall, J., Dimond, A. (1957). Interaction of tissue sugar, growth substances and disease susceptibility. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten (Pflanzenpathologie) und Pflanzenschutz*, 64, 415–421.

- Kocal, N., Sonnewald, U., & Sonnewald, S. (2008). Cell wall-bound invertase limits sucrose export and is involved in symptom development and inhibition of photosynthesis during compatible interaction between tomato and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Plant Physiology*, 148(3), 1523–1536.
- Liu, S., Lan, J., Zhou, B., Qin, Y., Zhou, Y., Xiao, X., ... & Tang, C. (2015). HbNIN2, a cytosolic alkaline/neutral-invertase, is responsible for sucrose catabolism in rubber-producing laticifers of *Hevea brasiliensis* (para rubber tree). *New Phytologist*, 206(2), 709–725.
- Proels, R. K., Hüchelhoven, R. (2014). Cell-wall invertases, key enzymes in the modulation of plant metabolism during defence responses. *Molecular Plant Pathology*, 15(8), 858–864.
- Seo, Y. S., Cho, J. I., Lee, S. K., Ryu, H. S., Han, M., Hahn, T. R., ... & Jeon, J. S. (2007). Current insights into the primary carbon metabolic flux that occurs in plants undergoing a defense response. *Plant Stress*, 1(1), 42–49.
- Siemens, J., Gonzalez, M. C., Wolf, S., Hofmann, C., Greiner, S., Du, Y., ... & Ludwig-Muller J. U. (2011). Extracellular invertase is involved in the regulation of clubroot disease in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant Pathology*, 12(3), 247–262.
- Sonnewald, S., Priller, J. P., Schuster, J., Glickmann, E., Hajirezaei, M. R., Siebig, S., ... & Sonnewald, U. (2012). Regulation of cell wall-bound invertase in pepper leaves by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* type three effectors. *PLoS ONE*, 7(12), e51763.
- Sun, Q., Sun, Y., Walker, M. A., & Labavitch, J. M. (2013). Vascular occlusions in grapevines with Pierce's disease make disease symptom development worse. *Plant Physiology*, 161(3), 1529–1541.
- Turgeon, R. (2000). Plasmodesmata and solute exchange in the phloem. *Functional Plant Biology*, 27(6), 521–529.
- Williams, L. E., Lemoine, R., & Sauer, N. (2000). Sugar transporters in higher plants — a diversity of roles and complex regulation. *Trends in Plant Science*, 5(7), 283–290.
- Yuan, M., Chu, Z., Li, X., Xu, C., & Wang, S. (2010). The bacterial pathogen *Xanthomonas oryzae* overcomes rice defenses by regulating host copper redistribution. *The Plant Cell*, 22(9), 3164–3176.
- Zhou, J., Peng, Z., Long, J., Sosso, D., Liu, B., Eom, J. S., ... & White, F. F. (2015). Gene targeting by the TAL effector PthXo2 reveals cryptic resistance gene for bacterial blight of rice. *The Plant Journal*, 82(4), 632–643.

7.5. Программируемая клеточная смерть

Разные формы программируемой клеточной смерти (ПКС) растительных клеток — смерть по принципу аутофагии, апоптозоподобная смерть и реакция гиперчувствительности (рассмотренные с точки зрения факторов устойчивости растений в главах 5.3 и 6.2) могут служить и в качестве критериев восприимчивости. Считается, что некротрофные фитопатогены направленно индуцируют ПКС у растений, чтобы убить клетки хозяина силами самого макроорганизма и использовать высвобождающиеся из них метаболиты в качестве ростового субстрата. При этом для биотрофов, питающихся содержимым живых клеток растений, индукция ПКС у хозяина рассматривается как негативный для микроорганизмов фактор (van Kan, 2006; Coll et al., 2011; Huysmans et al., 2017). В действительности же разные формы ПКС могут определять как устойчивость, так и восприимчивость и к биотрофам, и к некротрофам в зависимости от таксономической принадлежности макро- и микроорганизмов, а также стратегии их взаимодействия и типа индуцируемой ПКС (Greenberg, Yao, 2004; Lai et al., 2011; Lenz et al., 2011a; Dickman, Fluhr, 2013; Kabbage et al., 2013).

Индукция аутофагии (см. главу 5.3) обычно определяет восприимчивость растений к биотрофным патогенам (Wang et al., 2011; Lenz et al., 2011a, б; Dagdas et al., 2016). Уровень экспрессии генов, продукты которых участвуют в образовании аутофагосом, повышается при развитии инфекции, а нокаут этих генов (или их сайленсинг) увеличивает устойчивость растений к биотрофным фитопатогенам, но при этом может снижать устойчивость к некротрофным (Patel, Dinesh-Kumar, 2008; Lenz et al., 2011a, б; Wang et al., 2011). Роль аутофагии в восприимчивости растений в первую очередь связывают с ее негативным влиянием на накопление салициловой кислоты (которая обычно определяет устойчивость к биотрофам), а также активных форм кислорода (Yoshimoto et al., 2009; Wang et al., 2011; Lenz et al., 2011б). Кроме того, аутофагия подавляет развитие реакции гиперчувствительности — наиболее «губительной» для большинства фитопатогенов (в особенности биотрофных) формы ПКС (Liu et al., 2005; Patel, Dinesh-Kumar, 2008; Yoshimoto et al., 2009). Существуют также предположения, что индукция аутофагии повышает восприимчивость растений вследствие высвобождения из клеток хозяина питательного субстрата при ее развитии, а также за счет селективного разрушения антимикробных метаболитов; однако четких доказательств этого пока получено не было (Lenz et al., 2011a; Dagdas, Belhaj, 2016).

Апоптозоподобная клеточная смерть (см. главу 5.3) тоже способна повышать восприимчивость растений к фитопатогенам. Показано, что действие фитаспаз (каспазоподобные протеазы растений), участвующих в этом типе ПКС, способствует размножению фитопатогенов *in planta* и усугубляет развитие симптомов заболевания у хозяина, а гетерологичная экспрессия генов антиапоптозных белков, наоборот, повышает устойчивость растений к некоторым фитопатогенам (Richael et al., 2001; Lincoln et al., 2002; van Baarlen et al., 2007; Kabbage et al., 2013; Zhang et al., 2014). Конкретная роль апоптозоподобной клеточной смерти в восприимчивости растений

остаётся пока не выясненной; однако, вероятнее всего, что этот тип ПКС, как и аутофагия, помогает патогену «переваривать» содержимое клеток хозяина и/или избавляться от защитных метаболитов растения.

Даже реакция гиперчувствительности, которая обычно рассматривается как однозначный критерий мощного фитоиммунного ответа (см. главы 5.3 и 6.2), как оказалось, в некоторых случаях способна обеспечивать увеличение восприимчивости растений к паразитическим грибам (Govrin, Levine, 2000; Lorang et al., 2007). Так, в мутантных растениях, в которых реакция гиперчувствительности не развивается, подавляется рост *Cochliobolus victoriae*, а предынфекционная индукция этого типа ПКС с помощью эфффекторов псевдомонад, наоборот, повышает восприимчивость растений к этому патогену (Govrin, Levine, 2000).

Разные типы ПКС могут приводить к разным и даже противоположным последствиям при взаимодействии растений и фитопатогенов: при этом один тип ПКС может определять восприимчивость, а другой — устойчивость. Так, фитопатогенный гриб *Sclerotinia sclerotiorum* с помощью фитотоксина (оксалоовая кислота) индуцирует апоптозоподобную ПКС в восприимчивом хозяине. Авирулентный штамм этого микроорганизма, не синтезирующий оксалоовую кислоту, тоже индуцирует ПКС, но по механизму аутофагии. При этом штамм, не продуцирующий фитотоксин, проявляет вирулентность в отношении мутантных по «аутофагическим» генам растений (Kabbage et al., 2013). Следовательно, не сама по себе смерть растительных клеток определяет исход взаимодействия паразита и хозяина (устойчивость или восприимчивость хозяина), а то, по какому механизму она осуществляется. Таким образом, несмотря на то, что индукция ПКС часто сопряжена с формированием устойчивости растений и многие паразиты стремятся препятствовать ее развитию (см. главу 6.2), некоторые патогены, наоборот, «подталкивают» клетки хозяина к «суициду», чтобы эффективно его колонизировать.

Литература:

- Coll, N. S., Epple, P., & Dangl, J. L. (2011). Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death & Differentiation*, 18(8), 1247–1256.
- Dagdas, Y. F., Belhaj, K., Maqbool, A., Chaparro-Garcia, A., Pandey, P., Petre, B., ... & Win, J. (2016). An effector of the Irish potato famine pathogen antagonizes a host autophagy cargo receptor. *Elife*, 5, e10856.
- Dickman, M. B., & Fluhr, R. (2013). Centrality of host cell death in plant-microbe interactions. *Annual Review of Phytopathology*, 51, 543–570.
- Govrin, E. M., & Levine, A. (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology*, 10(13), 751–757.
- Greenberg, J. T., & Yao, N. (2004). The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cellular Microbiology*, 6(3), 201–211.
- Huysmans, M., Lema, S., Coll, N. S., & Nowack, M. K. (2017). Dying two deaths — programmed cell death regulation in development and disease. *Current Opinion in Plant Biology*, 35, 37–44.

Kabbage, M., Williams, B., & Dickman, M. B. (2013). Cell death control: the interplay of apoptosis and autophagy in the pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum*. *PLoS Pathogens*, 9(4), e1003287.

Lai, Z., Wang, F., Zheng, Z., Fan, B., & Chen, Z. (2011). A critical role of autophagy in plant resistance to necrotrophic fungal pathogens. *The Plant Journal*, 66(6), 953–968.

Lenz, H. D., Haller, E., Melzer, E., Gust, A. A., & Nürnberger, T. (2011a). Autophagy controls plant basal immunity in a pathogenic lifestyle-dependent manner. *Autophagy*, 7(7), 773–774.

Lenz, H. D., Haller, E., Melzer, E., Kober, K., Wurster, K., Stahl, M., ... & Molina, A. (2011b). Autophagy differentially controls plant basal immunity to biotrophic and necrotrophic pathogens. *The Plant Journal*, 66(5), 818–830.

Lincoln, J. E., Richael, C., Overduin, B., Smith, K., Bostock, R., & Gilchrist, D. G. (2002). Expression of the antiapoptotic baculovirus p35 gene in tomato blocks programmed cell death and provides broad-spectrum resistance to disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(23), 15217–15221.

Liu, Y., Schiff, M., Czymmek, K., Tallóczy, Z., Levine, B., & Dinesh-Kumar, S. P. (2005). Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response. *Cell*, 121(4), 567–577.

Lorang, J. M., Sweat, T. A., & Wolpert, T. J. (2007). Plant disease susceptibility conferred by a «resistance» gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(37), 14861–14866.

Patel, S., & Dinesh-Kumar, S. P. (2008). Arabidopsis ATG6 is required to limit the pathogen-associated cell death response. *Autophagy*, 4(1), 20–27.

Richael, C., Lincoln, J. E., Bostock, R. M., & Gilchrist, D. G. (2001). Caspase inhibitors reduce symptom development and limit bacterial proliferation in susceptible plant tissues. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 59(4), 213–221.

van Baarlen, P., Woltering, E. J., Staats, M., & van Kan, J. A. (2007). Histochemical and genetic analysis of host and non-host interactions of *Arabidopsis* with three *Botrytis* species: an important role for cell death control. *Molecular Plant Pathology*, 8(1), 41–54.

van Kan, J. A. (2006). Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends Plant Science*, 11, 247–253.

Wang, Y., Nishimura, M. T., Zhao, T., & Tang, D. (2011). ATG2, an autophagy-related protein, negatively affects powdery mildew resistance and mildew-induced cell death in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 68(1), 74–87.

Yoshimoto, K., Jikumaru, Y., Kamiya, Y., Kusano, M., Consonni, C., Panstruga, R., ... & Shirasu, K. (2009). Autophagy negatively regulates cell death by controlling NPR1-dependent salicylic acid signaling during senescence and the innate immune response in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 21(9), 2914–2927.

Zhang, B., Tremousaygue, D., Denance, N., Esse, H. P., Hörger, A. C., Dabos, P., ... & Tuominen, H. (2014). PIRIN2 stabilizes cysteine protease XCP2 and increases susceptibility to the vascular pathogen *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 79(6), 1009–1019.

7.6. Модуляция баланса некоторых металлов

Содержание металлов в растительном организме до развития инфекции может быть неоптимальным для активного размножения патогенного организма *in planta*. Для того чтобы оптимизировать концентрацию металлов внутри растения, некоторые патогены способны индуцировать особые восприимчивые ответы, которые обеспечивают ассимиляцию этих элементов и их перераспределение по тканям растения.

Для проявления вирулентности дикеем (*Dickeya dadantii*) требуется большое количество железа, которое, в частности, является кофактором ферментов, разрушающих полимеры растительных клеточных стенок. Чтобы повысить концентрацию этого металла в растении, дикееи индуцируют у хозяина восприимчивый ответ, связанный с активацией ферментов и транспортных систем, ответственных за ассимиляцию железа из окружающей среды (Dellagi et al., 2009; Segond et al., 2009). В пользу роли индукции ассимиляции железа в восприимчивости свидетельствует повышенная устойчивость к дикеем растений, выращенных в условиях дефицита этого металла, а также то, что нокаут генов сидерофоров (индукторы ассимиляции железа) снижает вирулентность дикееи (Franza et al., 2005; Kieu et al., 2012). При этом предынфекционная инфильтрация сидерофоров в растения, наоборот, повышает их восприимчивость (Dellagi et al., 2009).

Железо, а также медь могут и негативным образом сказываться на размножении ряда патогенов *in planta*. Для снижения содержания определенных металлов в колонизируемом патогеном участке микроорганизмы регулируют процесс их транспорта в растении. Патогенный грибок *Magnaporthe oryzae* активирует у хозяина транспортер, переносящий железо и марганец из апопласта внутрь растительных клеток. Мутация в гене, кодирующем этот транспортер, выражается в устойчивости растений к *M. oryzae* (Peris-Peris et al., 2017).

Ксантомонады (*Xanthomonas oryzae*) при колонизации сосудов ксилемы координируют работу растительных транспортеров меди, токсичной для этих патогенов, благодаря чему она выводится из ксилемы и перераспределяется в других тканях. В результате этого среда ксилемных сосудов становится пригодной для размножения патогена (Yuan et al., 2010).

Литература:

Dellagi, A., Segond, D., Rigault, M., Fagard, M., Simon, C., Saindrenan, P., & Expert, D. (2009). Microbial siderophores exert a subtle role in *Arabidopsis* during infection by manipulating the immune response and the iron status. *Plant Physiology*, 150(4), 1687–1696.

Franza, T., Mahé, B., & Expert, D. (2005). *Erwinia chrysanthemi* requires a second iron transport route dependent of the siderophore achromobactin for extracellular growth and plant infection. *Molecular Microbiology*, 55(1), 261–275.

Kieu, N. P., Aznar, A., Segond, D., Rigault, M., Simond-Cote, E. H., Kunz, C., ... & Dellagi, A. (2012). Iron deficiency affects plant defence responses and confers resistance to *Dickeya dadantii* and *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology*, 13(8), 816–827.

Peris-Peris, C., Serra-Cardona, A., Sánchez-Sanuy, F., Campo, S., Ariño, J., & San Segundo, B. (2017). Two NRAMP6 isoforms function as iron and manganese transporters and contribute to disease resistance in rice. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 30(5), 385–398.

Segond, D., Dellagi, A., Lanquar, V., Rigault, M., Patrit, O., Thomine, S., & Expert, D. (2009). NRAMP genes function in *Arabidopsis thaliana* resistance to *Erwinia chrysanthemi* infection. *The Plant Journal*, 58(2), 195–207.

Yuan, M., Chu, Z., Li, X., Xu, C., & Wang, S. (2010). The bacterial pathogen *Xanthomonas oryzae* overcomes rice defenses by regulating host copper redistribution. *The Plant Cell*, 22(9), 3164–3176.

7.7. Неопластический рост: симптомы гипертрофии и гиперплазии

Свойства «инженеров-конструкторов» растительного организма, пожалуй, в наибольшей степени выражены у таких фитопатогенов, которые посредством индукции восприимчивых ответов хозяина, вызывают у него симптомы неопластического роста: гипертрофии (патологического увеличения размеров клеток) и гиперплазии (патологического увеличения количества клеток). При неопластическом росте у растения происходит морфофизиологическое преобразование органов и тканей, что выражается, например, симптомами «бородатых корней» и «ведьминых метел», а также формированием новообразований — опухолей или галлов. В таких видоизмененных органах и новообразованиях создается благоприятная ниша для индуцирующих неопластический рост фитопатогенов, и в рамках этих ниш такие паразиты, по всей видимости, имеют конкурентное преимущество по сравнению с другими микроорганизмами, потенциально способными колонизировать растения (Kado, 2014). Кроме того, области растений, где осуществляется неопластический рост, представляют собой мощные атрагирующие центры, которые «притягивают» продукты фотосинтеза, необходимые для обеспечения ростовых процессов (Deeken et al., 2006; Siemens et al., 2011; Gohlke, Deeken, 2014) (см. главу 7.4). Активный приток фотоассимилятов к инфицированному участку, во-первых, поддерживает его жизнеспособность и активный метаболизм, которые необходимы для правильного функционирования патологической системы (например, интенсивный синтез опинов), и, во-вторых, снабжает микроорганизм легкодоступным ростовым субстратом. В дополнение к этому развитие гипертрофии и гиперплазии, вероятно, негативно сказывается на фитоиммунитете, поскольку приводит к расходованию энергетических ресурсов на ростовые процессы в ущерб работе защитных систем. Существует также предположение, что патологические новообразования обеспечивают более эффективную диссеминацию патогена из организма хозяина и его распространение в окружающей среде (Agrios, 1988; Marois et al., 2002).

Наиболее известным примером патологических новообразований, формирующихся при фитопатогенезе, являются корончатые галлы, вызываемые *Agrobacterium tumefaciens* (Escobar, Dandekar, 2003; Pitzschke, Hirt, 2010) (см. главу 3.7). Образование этих структур связано с гипертрофией и гиперплазией клеток и тканей хозяина в результате повышения содержания ауксина и цитокининов, которое достигается благодаря интегрированию в растительный геном в составе агробактериальной Т-ДНК генов, кодирующих ферменты биосинтеза этих фитогормонов (см. главу 3.7). Агробактерии, способные, в отличие от других фитопатогенов, трансформировать клетки растений (внедрять участок своей ДНК в геном хозяина), являются далеко не единственными паразитами, индуцирующими симптомы гипертрофии и гиперплазии. Многие другие фитопатогены (бактерии, грибы, протисты, нематоды) вызывают похожие симптомы, используя эффектор-ные белки, а также продуцируемые паразитами фитогормоны и их аналоги, благодаря которым микроорганизмы способны приводить к неконтролируемому де-

лению и росту клеток хозяина (Jameson, 2000; Kay et al., 2007; Robert-Seilaniantz et al., 2007). Таким образом, активация неопластического роста представляет собой восприимчивый ответ, необходимый для формирования многих растительно-микробных патосистем.

Патоген-индуцируемый неопластический рост фактически представляет собой совокупность разноплановых восприимчивых ответов растения, в том числе связанных с описанными выше процессами: модификацией растительных клеточных стенок, без которой растительные клетки не способны делиться, расти растяжением и дифференцироваться (Marois et al., 2002; Kay et al., 2007) (см. главу 7.2), а также изменением направленности транспорта ассимилятов, обеспечивающим приток продуктов фотосинтеза в инфицированный участок, в частности, из-за активации апопластных инвертаз (Deeken et al., 2006; Siemens et al., 2011; Gohlke, Deeken, 2014) (см. главу 7.4). Кроме того, при формировании галлов у растений индуцируется экспрессия генов, кодирующих гистоно-подобные белки, которые, как предполагают, отвечают за эндоредупликацию, являющуюся частым атрибутом неопластического роста (Yi et al., 2002; Jiang et al., 2003).

К восприимчивым ответам можно также отнести и те реакции растения, которые «продлевают жизнь» патологической системы, а не просто способствуют развитию симптомов заболевания и/или повышают эффективность колонизации макроорганизма фитопатогеном. При формировании галлов (и, вероятно, при других формах неопластического роста) растения испытывают стресс, связанный не только с расходом потребляемой паразитом энергии, но и с водным дефицитом, который может оказаться фатальным и привести к быстрой гибели (высыханию) либо гипертрофированного/гиперплазированного участка, либо всего растения-хозяина, а значит, и негативно сказаться на благополучии патогена. Водный дефицит при формировании галлов возникает вследствие разрыва и «слущивания» покровных тканей (эпидермиса) в результате разрастания нижележащей области коровой паренхимы, что, в свою очередь, может приводить к чрезмерному испарению воды. Это дополнительно усугубляется еще и тем, что активация ростовых процессов в инфицированном участке требует дополнительных расходов воды (Aloni et al., 1995; Ullrich, Aloni, 2000; Efetova et al., 2007).

Чтобы нейтрализовать проблему водного дефицита при неопластическом росте, в растении индуцируется целый комплекс адаптивных ответов. Во-первых, в галле осуществляется процесс неоваскуляризации — новообразования проводящей системы посредством дедифференцировки клеток паренхимы в сосуды и ситовидные элементы (Aloni et al., 1995; Ullrich, Aloni, 2000). Это обеспечивает поступление в галл воды и фотоассимилятов. Во-вторых, в галле индуцируется продукция осмотически активных соединений, повышающая его водоатрагирующие свойства (Efetova et al., 2007). В-третьих, для предотвращения избыточного испарения воды и, вероятно, инвазии других патогенов в клетках галла активируется синтез суберина, и на поверхности новообразования формируется слой, напоминающий перидерму — вторичную покровную ткань, которая компенсирует утрату эпидермиса — первичной покровной ткани (Efetova et al., 2007).

В-четвертых, в галле повышается уровень транскриптов генов аквапоринов — белков, формирующих каналы для транспорта воды (Efetova et al., 2007). Все эти реакции, по крайней мере частично, решают проблему потенциальной возможности развития водного дефицита при неопластическом росте и обеспечивают длительное сосуществование паразита и хозяина в рамках патологической системы.

В ряде случаев патоген-индуцируемый неопластический рост сам по себе может обеспечивать защиту растения от развития водного дефицита. Так, гиперплазия ксилемы, развивающаяся, в том числе, вследствие увеличения активности камбия при колонизации растений некоторыми патогенами, компенсирует дисфункцию заселенных паразитом сосудов и даже увеличивает устойчивость хозяев к засухе (Baayen, 1986; Reusche et al., 2012) (см. главу 7.3). Таким образом, индуцируя неопластический рост у хозяина, многие фитопатогены способны «конструировать» из растения комфортную экологическую нишу и поддерживать ее функциональное состояние в течение продолжительного периода.

Литература:

Agrios, G. N. (2005). Plant pathology. 5th eds. Department of Plant Pathology. University of Florida. United States of America.

Aloni, R., Pradel, K. S., & Ullrich, C. I. (1995). The three-dimensional structure of vascular tissues in *Agrobacterium tumefaciens*-induced crown galls and in the host stems of *Ricinus communis* L. *Planta*, 196(3), 597–605.

Baayen, R. P. (1986). Regeneration of vascular tissues in relation to *Fusarium* wilt resistance of carnation. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 92(6), 273–285.

Deeken, R., Engelmann, J. C., Efetova, M., Czirjak, T., Müller, T., Kaiser, W. M., ... & Dandekar, T. (2006). An integrated view of gene expression and solute profiles of *Arabidopsis* tumors: a genome-wide approach. *The Plant Cell*, 18(12), 3617–3634.

Efetova, M., Zeier, J., Riederer, M., Lee, C. W., Stingl, N., Mueller, M., ... & Deeken, R. (2007). A central role of abscisic acid in drought stress protection of *Agrobacterium*-induced tumors on *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 145(3), 853–862.

Escobar, M. A., & Dandekar, A. M. (2003). *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. *Trends in Plant Science*, 8(8), 380–386.

Gohlke, J., & Deeken, R. (2014). Plant responses to *Agrobacterium tumefaciens* and crown gall development. *Frontiers in Plant Science*, 5, 155.

Jameson, P. E. (2000). Cytokinins and auxins in plant-pathogen interactions — An overview. *Plant Growth Regulation*, 32(2–3), 369–380.

Jiang, H., Doerge, R. W., & Gelvin, S. B. (2003). Transfer of T-DNA and Vir proteins to plant cells by *Agrobacterium tumefaciens* induces expression of host genes involved in mediating transformation and suppresses host defense gene expression. *The Plant Journal*, 35(2), 219–236.

Kado, C. I. (2014). Historical account on gaining insights on the mechanism of crown gall tumorigenesis induced by *Agrobacterium tumefaciens*. *Frontiers in Microbiology*, 5, 340.

Kay, S., Hahn, S., Marois, E., Hause, G., & Bonas, U. (2007). A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science*, 318(5850), 648–651.

Marois, E., Van den Ackerveken, G., & Bonas, U. (2002). The *Xanthomonas* type III effector protein AvrBs3 modulates plant gene expression and induces cell hypertrophy in the susceptible host. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15(7), 637–646.

Pitzschke, A., & Hirt, H. (2010). New insights into an old story: *Agrobacterium*-induced tumour formation in plants by plant transformation. *The EMBO Journal*, 29(6), 1021–1032.

Reusche, M., Thole, K., Janz, D., Truskina, J., Rindfleisch, S., Drübert, C., ... & Teichmann, T. (2012). *Verticillium* infection triggers VASCULAR-RELATED NAC DOMAIN7 — dependent *de novo* xylem formation and enhances drought tolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 24(9), 3823–3837.

Robert-Seilantantz, A., Navarro, L., Bari, R., & Jones, J. D. (2007). Pathological hormone imbalances. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(4), 372–379.

Siemens, J., Gonzalez, M. C., Wolf, S., Hofmann, C., Greiner, S., Du, Y., ... & Ludwig-Muller, J. U. (2011). Extracellular invertase is involved in the regulation of clubroot disease in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant Pathology*, 12(3), 247–262.

Ullrich, C. I., & Aloni, R. (2000). Vascularization is a general requirement for growth of plant and animal tumours. *Journal of Experimental Botany*, 51(353), 1951–1960.

Yi, H., Mysore, K. S., & Gelvin, S. B. (2002). Expression of the *Arabidopsis* histone H2A-1 gene correlates with susceptibility to *Agrobacterium* transformation. *The Plant Journal*, 32(3), 285–298.

7.8. Регуляторы растений, опосредующие индукцию восприимчивых ответов

Для индукции восприимчивых ответов у хозяина фитопатогены часто воздействуют на регуляторные системы растения, модуляция которых, в свою очередь, приводит к «правильному» физиологическому преобразованию макроорганизма. При этом паразиты координируют работу гормональных систем хозяина, а также оптимизируют уровень активных форм кислорода и азота (АФК, АФА) в растении.

Среди фитогормонов главную роль во взаимодействии растений с патогенами отводят салициловой кислоте (СК), жасмоновой кислоте (ЖК) и этилену (Robert-Seilaniantz et al., 2011; Kazan, Lyons, 2014). Обычно СК-, ЖК- и этилен-опосредуемые гормональные системы рассматривают как регуляторы защитных ответов (см. главу 6.3). Однако в некоторых случаях индукция этих же систем при патогенезе может определять восприимчивость растений к биотическим стрессорам.

ЖК и этилен, которые обычно действуют «в тандеме», совместно активируя один из типов защитных ответов, как правило (но не всегда), работают в антагонизме с СК, регулирующей другой тип защитных ответов (Beckers, Spoel, 2006; Halim et al., 2006). Из-за антагонистического взаимодействия двух систем (СК- и ЖК/этилен-опосредуемых) в растениях при инвазии патогенов преимущественно запускается только один тип защитных ответов, но не оба сразу. Каждый конкретный вид патогена, в свою очередь, как правило, неустойчив к одному из типов защитных ответов (либо к СК-, либо к ЖК/этилен-регулируемому), а ко второму оказывается толерантным или менее восприимчивым (Zhao et al., 2003; Rahman et al., 2012). Поэтому некоторые фитопатогены «научились» в процессе эволюции индуцировать в растении ту защитную систему, которая не препятствует их размножению *in planta*, для того чтобы «силами» самого хозяина репрессировать другую — «губительную» для паразита защитную систему макроорганизма (Feys et al., 1994; Dellagi et al., 2009; Robert-Seilaniantz et al., 2011; Pieterse et al., 2012; Zheng et al., 2012; Lu et al., 2015). В связи с этим патоген-индуцируемую активацию той защитной системы, к которой микроорганизм проявляет толерантность, можно рассматривать как восприимчивый ответ, способствующий интенсивной колонизации паразитом организма хозяина.

Несмотря на то, что репрессия СК-, или ЖК-, или этилен-опосредуемых гормональных систем часто приводит к снижению устойчивости растений к биотическим стрессорам (Gaffney et al., 1993; Shores et al., 2005; van Loon et al., 2006), «отключение» этих же систем в некоторых случаях, наоборот, может повышать устойчивость хозяев к паразитическим организмам, что как раз и подтверждает возможность участия СК, ЖК и этилена в индуцируемой восприимчивости растений. Так, бактерия *Pseudomonas syringae*, индуцирующая при типичной инфекции ЖК-регулируемые ответы растения-хозяина, не вызывает симптомов заболевания у ЖК-нечувствительных мутантов, в которых, в отличие от растений дикого типа, при инфицировании этим патогеном содержание СК увеличивается (Kloek et al., 2001; Nickstadt et al., 2004; Laurie-Berry et al., 2006; Wangdi et al., 2010; Zheng et al.,

2012). На СК-нечувствительных мутантах не развиваются симптомы заболевания при инфицировании бактерией *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, которая при индукции типичной формы инфекционного процесса вызывает повышение уровня СК в растении (O'Donnell et al., 2001).

Другие фитогормональные системы (опосредуемые ауксином, цитокининами, гиббереллинами, абсцизовой кислотой) тоже могут быть задействованы в развитии острых патологий у инфицированных растений и таким образом определять восприимчивость хозяина к паразиту (Audenaert et al., 2002; Navarro et al., 2006; Deruydt et al., 2008; Yang et al., 2008). Во многих случаях положительный эффект ауксина, гиббереллинов и абсцизовой кислоты на развитие симптомов заболевания и размножение патогена *in planta* связывают с негативным влиянием этих фитогормонов на СК-, ЖК-, этилен-опосредуемые гормональные системы, то есть на защитные системы растения. Например, ауксин, благодаря негативному влиянию на СК-регулируемые ответы, увеличивает восприимчивость растений к фитопатогенным псевдомонадам — паразитам, которые при колонизации хозяев вызывают повышение содержания этого фитогормона (Chen et al., 2007; Wang et al., 2007). Предынфекционная обработка растений ауксином (или его аналогами) подавляет экспрессию СК-регулируемых PR-генов и снижает устойчивость к этим патогенам, а ауксин-нечувствительные мутанты более устойчивы к псевдомонадам, чем растения дикого типа. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* индуцирует гиббереллин-опосредуемую гормональную систему хозяина, благодаря чему в растении подавляются губительные для этих патогенов ЖК-регулируемые ответы (Lu et al., 2015).

АБК, активирующая, в частности, адаптивные реакции растений на абиотические стресс-факторы, как правило, репрессирует работу систем защиты от паразитов (СК- и ЖК-опосредуемые гормональные системы), что связывают с иерархическим принципом регуляции ответов на различные стрессоры (Mauch-Mani, Mauch, 2005; Navarro et al., 2006; Truman et al., 2006; de Torres-Zabala et al., 2007; Cao et al., 2011; Lievens et al., 2017). При этом, согласно традиционному представлению, ответы на абиотические стрессоры, с которыми растения, как считается, сталкиваются чаще, чем с паразитами, находятся в приоритете. Поэтому индукцию АБК-опосредуемой гормональной системы при патогенезе в большинстве случаев рассматривают как восприимчивый ответ хозяина, который «переориентирует» растение с сопротивления нападающему патогену на противостояние «мнимому» абиотическому стрессору. Подобное представление о роли АБК в патогенезе подтверждается рядом экспериментальных работ. Во-первых, у мутантов по генам ферментов биосинтеза АБК повышается уровень экспрессии ЖК/этилен- и салицилат-индуцируемых генов, а обработка растений экзогенной АБК репрессирует транскрипцию этих генов (Anderson et al., 2004; de Torres-Zabala et al., 2009). Во-вторых, АБК-нечувствительные мутанты или мутанты по генам ферментов биосинтеза АБК более устойчивы к ряду фитопатогенов, чем растения дикого типа (Audenaert et al., 2002; Thaler, Bostock, 2004; Achuo et al., 2006; de Torres-Zabala et al., 2007, 2009; Asselbergh et al., 2008). В-третьих, увеличение содержания АБК

при инфекции, вызываемой *Pseudomonas syringae*, обеспечивает подавление ПАМП-индуцируемой активации биосинтеза СК и СК-регулируемых ответов. При этом нокаут гена фермента биосинтеза АБК приводит к гораздо большему повышению уровня СК в мутантах, чем в растениях дикого типа, что выражается увеличением устойчивости к псевдомонадам (de Torres Zabala et al., 2009). В-четвертых, обработка АБК подавляет развитие регулируемой СК системной приобретенной устойчивости (Yasuda et al., 2008).

Ауксин, цитокинины, гиббереллины и АБК могут влиять на уровень восприимчивости растений не только опосредованно, репрессировав СК- и ЖК-индуцируемые ответы, но и напрямую — координируя процессы метаболизма и активность различных белков растений. Для запуска «нужного» для патогена физиологического процесса в инфицированном растении работы одного или нескольких белков хозяина обычно недостаточно, поскольку в реализацию восприимчивого ответа может быть вовлечено множество «участников». Поэтому воздействие на фитогормональную систему, которое позволяет патогену комплексно координировать протекание той или иной физиологической реакции макроорганизма, представляется более целесообразной стратегией «реконструирования» организма хозяина, чем прямой контроль активности каждого отдельного белка, задействованного в определенном метаболическом процессе.

Так, например, разрыхление растительной клеточной стенки «силами» организма хозяина, которое является критерием развития многих патологий (см. главу 7.2), требует координированного действия большой группы растительных белков. Индукция этих белков при патогенезе, по всей видимости, обеспечивается активацией некоторыми паразитами ауксин-, гиббереллин- и цитокинин-опосредуемых гормональных систем растений. Эти фитогормоны индуцируют ростовые процессы растительных клеток, протекание которых невозможно без разрыхления и растяжения клеточных стенок. Разрыхление клеточной стенки при действии этих фитогормонов обеспечивается тем, что многие растительные гены, кодирующие ферменты, модифицирующие сложные углеводы, и белки, нарушающие связи между полисахаридами, являются ауксин-, или гиббереллин-, или цитокинин-индуцируемыми (Cosgrove, 2005; Sánchez-Rodríguez et al., 2010). Кроме того, ауксин вызывает эффект так называемого «кислого роста» клеток, который связан с активацией «клеточностеночных» углевод-гидролаз и экспансинов из-за снижения pH апопласта в результате ауксин-зависимой активации протонных помп (Полевой, 1989; Cosgrove, 1999; Медведев, Шарова, 2011).

Преобразование растительной клеточной стенки при инфекции, вызываемой ксантомонадами, по крайней мере отчасти, осуществляется посредством индукции патогеном ауксин- и гиббереллин-опосредуемых гормональных систем хозяина. Содержание этих фитогормонов в инфицированных растениях увеличивается, что влечет за собой активацию экспрессии ауксин- и гиббереллин-индуцируемых генов, кодирующих белки, которые участвуют в разрыхлении клеточной стенки: экспансины, эндо- β -1,4-глюканызы, ксилоглюканэндотрансгликозилазы (Marois et al., 2002; Ding et al., 2008; Cernades, Benedetti, 2009). Протист *Plasmodiophora*

brassicae, синтезируя цитокинины, активирует экспрессию гена ксилоглюкан-эндотрансгликозилазы. Гипертрофия растительных клеток при развитии агро-бактериальных галлов (см. главы 3.7, 7.7), по всей видимости, также не обходится без ауксин- и цитокинин-зависимого разрыхления растительной клеточной стенки. АБК тоже является потенциальным посредником при контроле свойств растительной клеточной стенки. Показано, что у АБК-дефектных мутантов увеличивается степень метилирования пектинов, которая, вероятно из-за снижения эффективности разложения этих полимеров при инфекции, выражается повышением устойчивости растений к фитопатогенному грибу *Botrytis cinerea* (Curvers et al., 2010).

Патоген-регулируемая блокировка ксилемного потока в растении за счет образования тилл и гелей (см. главу 7.3) тоже осуществляется через воздействие паразита на гормональную систему хозяина, а именно на этилен-опосредуемую. Обитающая в ксилеме бактерия *Xylella fastidiosa* индуцирует продукцию этого фитогормона в растении, а в мутантах, нечувствительных к этилену, в отличие от растений дикого типа, образования тилл при инвазии ксилелл не происходит, что выражается устойчивостью мутантных растений и неспособностью паразита системно колонизировать организм хозяина. Определяющая роль этилена в образовании тилл подтверждается еще и тем, что обработка растений этим фитогормоном индуцирует их формирование даже в отсутствие патогенного микроорганизма (Lund et al., 1998; Perez-Donoso et al., 2007; Balaji et al., 2008).

Активное «притягивание» к месту инфицирования продуктов фотосинтеза, необходимое для нормального развития некоторых фитопатогенов *in planta* (см. главу 7.4), может обеспечиваться благодаря активации паразитом цитокинин-опосредуемой гормональной системы хозяина. Хорошо известно, что цитокинины, регулирующие донорно-акцепторные взаимоотношения в растении, повышают аттрагирующие свойства ткани, способствуя поступлению в них питательных веществ. Такие свойства, в частности, определяются цитокинин-зависимой активацией апопластных инвертаз (Walters, McRoberts, 2006) (см. главу 7.4).

Цитокинины ответственны за формирование так называемых «зеленых островков» — инфицированных областей, где растительные клетки долго сохраняют жизнеспособность и высокую метаболическую активность, которая необходима патогенам для непрерывного поступления ростового субстрата, синтезируемого организмом хозяина (Ashby, 2000; Walters et al., 2008; Zwack et al., 2013). Роль цитокининов в восприимчивости растений к паразитам особенно наглядно продемонстрирована на примере развития симптомов гипертрофии и гиперплазии (см. главы 3.7, 7.7) (Jameson, 2000; Robert-Seilaniantz et al., 2007). Формирование симптомов неопластического роста невозможно, если количество фотоассимилятов, транспортируемых в колонизируемую патогеном область, недостаточно для обеспечения пролиферации и увеличения размеров клеток растений. Фитопатогены, вызывающие патологическое разрастание тканей, индуцируют цитокинин-регулируемые ответы хозяина, благодаря чему повышаются акцепторные свойства инфицированного участка и обеспечивается интенсивный приток продуктов фотосинтеза в пораженную паразитом область (Robert-Seilaniantz et al., 2007;

Walters, McRoberts, 2008; Depuydt et al., 2009). Инактивация рецепторов цитокининов у растений делает их устойчивыми к паразитам, вызывающим неопластический рост (Pertry et al., 2009).

Индукция неопластического роста при патогенезе служит наиболее ярким примером воздействия фитопатогенов на гормональные системы растений. Патологическое деление и рост растительных клеток — ключевые характеристики гипертрофии и гиперплазии — это прямое следствие действия «ростовых» гормонов — ауксина и цитокининов (Tzfira, Citovsky, 2003). Для активации ауксин- и цитокинин-опосредуемых гормональных систем хозяина фитопатогены используют разные стратегии. Агробактерии переносят располагающиеся в области Т-ДНК гены ферментов биосинтеза ауксина и цитокининов в растительный геном, «заставляя» таким образом хозяина интенсивно продуцировать фитогормоны бактериального происхождения (см. главы 3.7, 7.7). «Удаление» этих генов из Т-ДНК приводит к неспособности агробактерий вызывать симптомы неопластического роста (Zupan et al., 2000). Большинство вызывающих неопластический рост бактерий (например, *Rhodococcus fascians*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas savastanoi*) «не умеют» встраивать собственные гены в геном растений и сами продуцируют ауксины и цитокинины, индуцируя ауксин- и цитокинин-регулируемые ответы растений (Jameson, 2000; Tzfira, Citovsky, 2003; Barash, Manulis-Sasson, 2009) (см. главу 7.9). Микроорганизмы могут также индуцировать ауксин- и цитокинин-регулируемые ответы и повышать уровень этих фитогормонов в растении, специфическим образом воздействуя на организм хозяина при помощи эффекторных белков (Marois et al., 2002; Chen et al., 2007; Chalupowicz et al., 2013; Cui et al., 2013; Hann et al., 2014).

Роль производимых растением ауксина и цитокининов в патоген-индуцируемом развитии гипертрофии и гиперплазии неоднозначна. В большинстве случаев синтезируемые растениями «собственные» гормоны (ауксин и цитокинины) не рассматриваются как факторы, определяющие симптомы неопластического роста. Считается, что цепи передачи сигналов ауксина и цитокининов при гипертрофии и гиперплазии активируются в первую очередь фитогормонами, продуцируемыми бактериями, или (в случае агробактериальной инфекции) за счет «работы» бактериальных генов, интегрированных в растительный геном (Jameson, 2000; Pertry et al., 2009; Chalupowicz et al., 2013). В то же время для некоторых патосистем показано, что ауксин и цитокинины растительного происхождения вносят существенный вклад в патологическое разрастание тканей. «Отключение» растительных генов, кодирующих ферменты биосинтеза ауксина, подавляет развитие листовых галлов, вызываемых бактерией *Rhodococcus fascians* (Stes et al., 2012, 2013). В пользу участия «растительного» ауксина в развитии опухолей также свидетельствует то, что при инфекции, вызываемой *Pantoea agglomerans*, повышается уровень экспрессии генов, кодирующих белки-переносчики этого фитогормона (PIN2), а ингибирование полярного транспорта ауксина в растении негативным образом сказывается на неопластическом росте, индуцируемом этим патогеном (Chalupowicz et al., 2013). В связи с этим предположено, что ауксина,

синтезируемого бактерией *Pantoea agglomerans*, недостаточно для полноценного развития инфекционного процесса, и для повышения содержания этого фитогормона до уровня, необходимого для роста опухоли, требуется интенсивный транспорт производимого растением ауксина в пораженный участок. Это предположение дополнительно подкрепляется еще и тем, что мутантные бактерии *Pantoea agglomerans* с инактивированными генами ферментов биосинтеза ауксина сохраняют способность индуцировать неопластический рост у растений; хотя опухоли при колонизации растений такими мутантными формами по размерам уступают галлам, формирующимся при инфицировании дикими штаммами бактерий (Manulis et al., 1998; Chalupowicz et al., 2006). В то же время нокаут генов белков системы секреции третьего типа у *Pantoea agglomerans* и *Pseudomonas savastanoi* выражается неспособностью мутантных бактерий вызывать симптомы гипертрофии и гиперплазии. Это, по всей видимости, указывает на то, что активация гормональных систем растения-хозяина при неопластическом росте, индуцируемом пантойями и псевдомонадами, осуществляется в первую очередь благодаря «работе» эффекторных белков бактерий, которые способствуют повышению уровня «растительных» фитогормонов (ауксина и цитокининов); при этом синтезируемые бактериями фитогормоны только усиливают действие эффекторных белков, но сами не индуцируют развитие опухоли (Manulis, Barash, 2003; Nizan-Koren et al., 2003; Sisto et al., 2004; Pérez-Martínez et al., 2010).

Интересно, что подавление полярного транспорта ауксина (которое негативно влияет на формирование опухолей, вызываемых *Pantoea agglomerans*) не сказывается на развитии корончатых галлов, вызываемых *Agrobacterium tumefaciens* (Chalupowicz et al., 2013). Это связывают с разными механизмами патогенеза, индуцируемого агробактериями и пантойями. Эффект фитогормонов, синтезируемых в результате «работы» встроенных в хромосому хозяина агробактериальных генов, по всей вероятности, эквивалентен действию «собственных» фитогормонов растения. При этом непрерывный синтез фитогормонов в трансформированных клетках не требует постоянного присутствия микроорганизма, поскольку бактериальные гены ферментов биосинтеза фитогормонов интегрируются в растительный геном, и каждая трансформированная клетка становится способной синтезировать фитогормоны в достаточном для развития гипертрофии количестве. Вероятно, поэтому для роста агробактериального галла отсутствует необходимость в транспортировке в пораженный участок «собственного» ауксина растения, который в норме синтезируется преимущественно в апексе побега и распространяется по организму с помощью переносчиков. Пантойи, «не умеющие» трансформировать растительные клетки, не способны «дистанционно» активировать ауксин-регулируемые ответы у клеток хозяина. Поэтому для полноценного роста опухоли, вызываемой пантойями, требуется транспорт производимого растением ауксина в инфицированный участок (Chalupowicz et al., 2013).

Таким образом, для индукции неопластического роста фитопатогены активируют ауксин- и цитокинин-опосредуемые гормональные системы хозяина. Активация этих систем в пораженной области может осуществляться как за счет

продукции ауксина и цитокининов клетками патогена, так и посредством индукции синтеза и транспорта фитогормонов, производимых растительным организмом. Механизмы индукции ауксин- и цитокинин-регулируемых ответов при неопластическом росте различаются в зависимости от стратегии взаимодействия определенного вида патогена с растением.

Повышение содержания ауксина и цитокининов при неопластическом росте не только индуцирует деление и рост клеток растений, а также способствует притоку фотоассимилятов и разрыхлению растительной клеточной стенки (см. выше), но и влечет за собой формирование сильного гормонального дисбаланса в растении, который приводит к изменениям в работе гормональных систем, опосредованных и другими гормонами (этиленом и АБК) (Chalupowicz et al., 2006; Efetova et al., 2007; Gohlke, Deeken, 2014). Причем эти изменения, по всей видимости, являются «не случайными», а представляют собой закономерную последовательность физиологического преобразования хозяина, необходимого для эффективного функционирования патологической системы. Вследствие накопления большого количества ауксина в новообразованиях активируется биосинтез этилена, который, в свою очередь, стимулирует продукцию АБК в листьях. В дальнейшем АБК из листьев транспортируется в галл, где индуцирует «классические» АБК-регулируемые ответы: синтез осмотически активных соединений и суберина (Chalupowicz et al., 2006; Efetova et al., 2007; Gohlke, Deeken, 2014). Эти реакции компенсируют разрушение покровных тканей при неопластическом росте, препятствуя избыточной потере влаги и формированию водного дефицита (см. главу 6.3). Кроме того, гормональные перестройки также обеспечивают «правильную» дифференцировку растительных клеток в новообразованиях, результатом которой является неоваскуляризация (*de novo* образование сосудистой системы) и появление механических тканей (Aloni et al., 1995; Ullrich, Aloni, 2000; Gohlke, Deeken, 2014) (см. главы 6.3, 7.7).

Фитопатогены способны комплексно координировать процессы метаболизма растения, не только манипулируя гормональными системами хозяина, но и влияя на уровень активных форм кислорода (АФК) и, возможно, азота (АФА), которые служат в качестве глобальных регуляторов разнообразных физиологических процессов (Neill et al., 2002; Luis et al., 2006; del Rio, 2015). Роль АФК, как и фитогормонов, во взаимодействии растений и патогенов дуалистична. С одной стороны, АФК могут определять устойчивость растений к биотическим стрессорам (см. главы 5.3, 6.1, 6.2), но с другой стороны, эти регуляторы запускают и такие реакции в клетках хозяина, которые определяют восприимчивость макроорганизмов к фитопатогенам. К восприимчивым ответам, которые регулируются опосредовано АФК, относятся программируемая клеточная смерть (ПКС) и разрыхление растительной клеточной стенки.

АФК-опосредуемая индукция ПКС при патогенезе как фактор восприимчивости растений была описана на примере ряда патосистем, включающих некротрофные фитопатогенные грибы. В основном АФК и ПКС в качестве факторов восприимчивости «работают» на поздних стадиях инфекций, когда патогены

способствуют накоплению АФК, чтобы убить клетки хозяина его собственными силами (Williams et al., 2011). При обработке растений прооксидантами, приводящей к развитию ПКС, повышается их восприимчивость к некротрофным грибам *Botrytis cinerea* и *Sclerotinia sclerotiorum*, а мутантные растения, в которых процессы ПКС подавлены, проявляют устойчивость к этим патогенам (Govrin, Levine, 2000). У мутантных растений с инактивированным геном НАДФН-оксидазы RbohV из-за сниженного уровня АФК формируется устойчивость к *Botrytis cinerea* (Asai, Yoshioka, 2009), а повышение уровня АФК в результате сверхэкспрессии гена циклин-зависимой протеинкиназы СDRK5 индуцирует в растениях ПКС и снижает их устойчивость к *Alternaria solani* (Kobayashi et al., 2012). ПКС может запускаться в инфицированных растениях опосредовано не только АФК, но и АФА, содержание которых при развитии патологий может сильно увеличиваться (Van Baarlen et al., 2004; Wang et al., 2010; Sarkar et al., 2014). В связи с этим некоторые исследователи предполагают, что АФА, активируя ПКС, тоже могут выступать в качестве факторов восприимчивости.

Одной из наиболее известных функций АФК при патогенезе является укрепление растительной клеточной стенки за счет сшивки полимеров, входящих в состав этого компартмента (см. главы 5.3, 6.1, 6.2). Однако АФК могут не только повышать, но и понижать барьерные свойства клеточных стенок. Например, при росте растительных клеток, для обеспечения которого требуется разрыхление и растяжение клеточной стенки, АФК вызывают неферментативный распад входящих в ее состав полисахаридов, благодаря чему стенка, становясь более эластичной, не препятствует увеличению размеров клетки (Fry, 1998; Schopfer, 2001; Müller et al., 2009). Вероятно, что сходным образом АФК могут разрыхлять растительные клеточные стенки и при патогенезе и служить таким образом в качестве факторов восприимчивости растений к паразитам. В пользу этого свидетельствует то, что специфическое преобразование стенок сосудов ксилемы, необходимое для успешной колонизации растений пектобактериями, сопряжено с накоплением АФК (Gorshkov et al., 2016). При этом АФК, по всей видимости, способствуют «вымыванию» из клеточных стенок в полость сосудов рамногалактурона I — пектинового полисахарида, который используется бактериями в качестве компонента внеклеточного матрикса.

Таким образом, фитопатогены способны комплексно воздействовать на метаболизм растения-хозяина, используя в качестве мишеней гормональные системы и «аппарат» синтеза АФК и АФА. Оптимизируя уровень фитогормонов и АФК в растениях, микроорганизмы координируют обширный спектр физиологических процессов хозяина и эффективно преобразуют таким образом его внутреннюю среду в удобную для своего развития эконишу.

Литература:

Медведев, С. С., & Шарова, Е. И. (2011). Биология развития растений. В 2-х т. Том 1. Начала биологии развития растений. Фитогормоны. Санкт-Петербург. Изд-во Санкт-Петербургского университета.

Полевой, В. В. (1989). Физиология растений. Москва. Высшая школа.

Achuo, E. A., Prinsen, E., & Höfte, M. (2006). Influence of drought, salt stress and abscisic acid on the resistance of tomato to *Botrytis cinerea* and *Oidium neolycopersici*. *Plant Pathology*, 55(2), 178–186.

Aloni, R., Pradel, K. S., & Ullrich, C. I. (1995). The three-dimensional structure of vascular tissues in *Agrobacterium tumefaciens*-induced crown galls and in the host stems of *Ricinus communis* L. *Planta*, 196(3), 597–605.

Anderson, J. P., Badruzaufari, E., Schenk, P. M., Manners, J. M., Desmond, O. J., Ehlert, C., ... & Kazan, K. (2004). Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 16(12), 3460–3479.

Asai, S., & Yoshioka, H. (2009). Nitric oxide as a partner of reactive oxygen species participates in disease resistance to necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea* in *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(6), 619–629.

Ashby, A. M. (2000). Biotrophy and the cytokinin conundrum. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 57(4), 147–158.

Asselbergh, B. O. B., Achuo, A. E., Höfte, M., & Van Gijsegem, F. (2008). Abscisic acid deficiency leads to rapid activation of tomato defence responses upon infection with *Erwinia chrysanthemi*. *Molecular Plant Pathology*, 9(1), 11–24.

Audenaert, K., De Meyer, G. B., & Höfte, M. M. (2002). Abscisic acid determines basal susceptibility of tomato to *Botrytis cinerea* and suppresses salicylic acid-dependent signaling mechanisms. *Plant Physiology*, 128(2), 491–501.

Balaji, V., Mayrose, M., Sherf, O., Jacob-Hirsch, J., Eichenlaub, R., Iraki, N., ... & Sessa, G. (2008). Tomato transcriptional changes in response to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* reveal a role for ethylene in disease development. *Plant Physiology*, 146(4), 1797–1809.

Barash, I., & Manulis-Sasson, S. (2009). Recent evolution of bacterial pathogens: the gall-forming *Pantoea agglomerans* case. *Annual Review of Phytopathology*, 47, 133–152.

Beckers, G. J. M., & Spoel, S. H. (2006). Fine-tuning plant defence signalling: salicylate versus jasmonate. *Plant Biology*, 8(01), 1–10.

Cao, F. Y., Yoshioka, K., & Desveaux, D. (2011). The roles of ABA in plant-pathogen interactions. *Journal of Plant Research*, 124(4), 489–499.

Cernadas, R. A., & Benedetti, C. E. (2009). Role of auxin and gibberellin in citrus canker development and in the transcriptional control of cell-wall remodeling genes modulated by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Plant Science*, 177(3), 190–195.

Chalupowicz, L., Barash, I., Schwartz, M., Aloni, R., & Manulis, S. (2006). Comparative anatomy of gall development on *Gypsophila paniculata* induced by bacteria with different mechanisms of pathogenicity. *Planta*, 224(2), 429–437.

Chalupowicz, L., Weinthal, D., Gaba, V., Sessa, G., Barash, I., & Manulis-Sasson, S. (2013). Polar auxin transport is essential for gall formation by *Pantoea agglomerans* on gypsophila. *Molecular Plant Pathology*, 14(2), 185–190.

Chen, Z., Agnew, J. L., Cohen, J. D., He, P., Shan, L., Sheen, J., & Kunkel, B. N. (2007). *Pseudomonas syringae* type III effector AvrRpt2 alters *Arabidopsis thaliana* auxin physiology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(50), 20131–20136.

Cosgrove, D. J. (1999). Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. *Annual Review of Plant Biology*, 50(1), 391–417.

Cosgrove, D. J. (2005). Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(11), 850–861.

Cui, F., Wu, S., Sun, W., Coaker, G., Kunkel, B., He, P., & Shan, L. (2013). The *Pseudomonas syringae* type III effector AvrRpt2 promotes pathogen virulence via stimulating *Arabidopsis* auxin/indole acetic acid protein turnover. *Plant Physiology*, 162(2), 1018–1029.

Curvers, K., Seifi, H., Mouille, G., De Rycke, R., Asselbergh, B., Van Hecke, A., ... & Höfte, M. (2010). Abscisic acid deficiency causes changes in cuticle permeability and pectin composition that influence tomato resistance to *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology*, 154(2), 847–860.

Dellagi, A., Segond, D., Rigault, M., Fagard, M., Simon, C., Saindrenan, P., & Expert, D. (2009). Microbial siderophores exert a subtle role in *Arabidopsis* during infection by manipulating the immune response and the iron status. *Plant Physiology*, 150(4), 1687–1696.

Depuydt, S., Dolezal, K., Van Lijsebettens, M., Moritz, T., Holsters, M., & Vereecke, D. (2008). Modulation of the hormone setting by *Rhodococcus fascians* results in ectopic KNOX activation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 146(3), 1267–1281.

Depuydt, S., Trenkamp, S., Fernie, A. R., Elftieh, S., Renou, J. P., Vuylsteke, M., ... & Vereecke, D. (2009). An integrated genomics approach to define niche establishment by *Rhodococcus fascians*. *Plant Physiology*, 149(3), 1366–1386.

Ding, X., Cao, Y., Huang, L., Zhao, J., Xu, C., Li, X., & Wang, S. (2008). Activation of the indole-3-acetic acid — amido synthetase GH3-8 suppresses expansin expression and promotes salicylate- and jasmonate-independent basal immunity in rice. *The Plant Cell*, 20(1), 228–240.

Efetova, M., Zeier, J., Riederer, M., Lee, C. W., Stingl, N., Mueller, M., ... & Deeken, R. (2007). A central role of abscisic acid in drought stress protection of *Agrobacterium*-induced tumors on *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 145(3), 853–862.

Feys, B. J., Benedetti, C. E., Penfold, C. N., & Turner, J. G. (1994). *Arabidopsis* mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. *The Plant Cell*, 6(5), 751–759.

Fry, S. C. (1998). Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals. *Biochemical Journal*, 332(2), 507.

Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., ... & Ryals, J. (1993). Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science*, 261(5122), 754–756.

Gohlke, J., & Deeken, R. (2014). Plant responses to *Agrobacterium tumefaciens* and crown gall development. *Frontiers in Plant Science*, 5, 155.

Gorshkov, V. Y., Daminova, A. G., Mikshina, P. V., Petrova, O. E., Ageeva, M. V., Salnikov, V. V., ... & Gogolev, Y. V. (2016). Pathogen-induced conditioning of the primary xylem vessels — a prerequisite for the formation of bacterial emboli by *Pectobacterium atrosepticum*. *Plant Biology*, 18(4), 609–617.

Govrin, E. M., & Levine, A. (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology*, 10(13), 751–757.

Halim, V. A., Vess, A., Scheel, D., & Rosahl, S. (2006). The role of salicylic acid and jasmonic acid in pathogen defence. *Plant Biology*, 8(03), 307–313.

Hann, D. R., Domínguez-Ferreras, A., Motyka, V., Dobrev, P. I., Schornack, S., Jehle, A., ... & Boller, T. (2014). The *Pseudomonas* type III effector HopQ1 activates cytokinin signaling and interferes with plant innate immunity. *New Phytologist*, 201(2), 585–598.

Jameson, P. E. (2000). Cytokinins and auxins in plant-pathogen interactions — An overview. *Plant Growth Regulation*, 32(2), 369–380.

Kazan, K., & Lyons, R. (2014). Intervention of phytohormone pathways by pathogen effectors. *The Plant Cell*, 26(6), 2285–2309.

Kloek, A. P., Verbsky, M. L., Sharma, S. B., Schoelz, J. E., Vogel, J., Klessig, D. F., & Kunkel, B. N. (2001). Resistance to *Pseudomonas syringae* conferred by an *Arabidopsis thaliana* coronatine-insensitive (*coi1*) mutation occurs through two distinct mechanisms. *The Plant Journal*, 26(5), 509–522.

Kobayashi, M., Yoshioka, M., Asai, S., Nomura, H., Kuchimura, K., Mori, H., ... & Yoshioka, H. (2012). StCDPK5 confers resistance to late blight pathogen but increases susceptibility to early blight pathogen in potato via reactive oxygen species burst. *New Phytologist*, 196(1), 223–237.

Laurie-Berry, N., Joardar, V., Street, I. H., & Kunkel, B. N. (2006). The *Arabidopsis thaliana* JASMONATE INSENSITIVE 1 gene is required for suppression of salicylic acid-dependent defenses during infection by *Pseudomonas syringae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(7), 789–800.

Lievens, L., Pollier, J., Goossens, A., Beyaert, R., & Staal, J. (2017). Abscisic acid as pathogen effector and immune regulator. *Frontiers in Plant Science*, 8, 587.

Lu, X., Hershey, D. M., Wang, L., Bogdanove, A. J., & Peters, R. J. (2015). An ent-kaurene-derived diterpenoid virulence factor from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. *New Phytologist*, 206(1), 295–302.

Luis, A., Sandalio, L. M., Corpas, F. J., Palma, J. M., & Barroso, J. B. (2006). Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiology*, 141(2), 330–335.

Lund, S. T., Stall, R. E., & Klee, H. J. (1998). Ethylene regulates the susceptible response to pathogen infection in tomato. *The Plant Cell*, 10(3), 371–382.

Manulis, S., Haviv-Chesner, A., Brandl, M. T., Lindow, S. E., & Barash, I. (1998). Differential involvement of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in pathogenicity and epiphytic fitness of *Erwinia herbicola* pv. *gypsophila*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11(7), 634–642.

Manulis, M., & Barash, I. (2003). The molecular basis for transformation of an epiphyte into a gall-forming pathogen as exemplified by *Erwinia herbicola* pv. *gypsophila*. *Plant-Microbe Interactions*, 6, 19–52.

Marois, E., Van den Ackerveken, G., & Bonas, U. (2002). The *Xanthomonas* type III effector protein AvrBs3 modulates plant gene expression and induces cell hypertrophy in the susceptible host. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15(7), 637–646.

Mauch-Mani, B., & Mauch, F. (2005). The role of abscisic acid in plant — pathogen interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(4), 409–414.

Müller, K., Linkies, A., Vreeburg, R. A., Fry, S. C., Krieger-Liszkay, A., & Leubner-Metzger, G. (2009). *In vivo* cell wall loosening by hydroxyl radicals during cress seed germination and elongation growth. *Plant Physiology*, 150(4), 1855–1865.

Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F., Arnold, B., Dharmasiri, N., Estelle, M., ... & Jones, J. D. (2006). A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science*, 312(5772), 436–439.

Neill, S. J., Desikan, R., Clarke, A., Hurst, R. D., & Hancock, J. T. (2002). Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53(372), 1237–1247.

Nickstadt, A., Thomma, B. P., Feussner, I. V. O., Kangasjarvi, J., Zeier, J., Loeffler, C., ... & Berger, S. (2004). The jasmonate-insensitive mutant *jin1* shows increased resistance to biotrophic as well as necrotrophic pathogens. *Molecular Plant Pathology*, 5(5), 425–434.

Nizan-Koren, R., Manulis, S., Mor, H., Iraki, N. M., & Barash, I. (2003). The regulatory cascade that activates the Hrp regulon in *Erwinia herbicola* pv. *gypsophila*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16(3), 249–260.

O'Donnell, P. J., Jones, J. B., Antoine, F. R., Ciardi, J., & Klee, H. J. (2001). Ethylene-dependent salicylic acid regulates an expanded cell death response to a plant pathogen. *The Plant Journal*, 25(3), 315–323.

Pérez-Donoso, A. G., Greve, L. C., Walton, J. H., Shackel, K. A., & Labavitch, J. M. (2007). *Xylella fastidiosa* infection and ethylene exposure result in xylem and water movement disruption in grapevine shoots. *Plant Physiology*, 143(2), 1024–1036.

Pérez-Martínez, I., Rodríguez-Moreno, L., Lambertsen, L., Matas, I. M., Murillo, J., Tegli, S., ... & Ramos, C. (2010). Fate of a *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* type III secretion system mutant in olive plants (*Olea europaea* L.). *Applied and Environmental Microbiology*, 76(11), 3611–3619.

Pertry, I., Václavíková, K., Depuydt, S., Galuszka, P., Spíchal, L., Temmerman, W., ... & Strnad, M. (2009). Identification of *Rhodococcus fascians* cytokinins and their modus operandi to reshape the plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(3), 929–934.

Pieterse, C. M., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., & Van Wees, S. C. (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28, 489–521.

Rahman, T. A. E., Oirdi, M. E., Gonzalez-Lamothe, R., & Bouarab, K. (2012). Necrotrophic pathogens use the salicylic acid signaling pathway to promote disease development in tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(12), 1584–1593.

Robert-Seilaniantz, A., Navarro, L., Bari, R., & Jones, J. D. (2007). Pathological hormone imbalances. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(4), 372–379.

Robert-Seilaniantz, A., Grant, M., & Jones, J. D. (2011). Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annual Review of Phytopathology*, 49, 317–343.

Sánchez-Rodríguez, C., Rubio-Somoza, I., Sibout, R., & Persson, S. (2010). Phytohormones and the cell wall in *Arabidopsis* during seedling growth. *Trends in Plant Science*, 15(5), 291–301.

Sarkar, T. S., Biswas, P., Ghosh, S. K., & Ghosh, S. (2014). Nitric oxide production by necrotrophic pathogen *Macrophomina phaseolina* and the host plant in charcoal rot disease of jute: complexity of the interplay between necrotroph-host plant interactions. *PLoS ONE*, 9(9), e107348.

Schopfer, P. (2001). Hydroxyl radical-induced cell wall loosening *in vitro* and *in vivo*: implications for the control of elongation growth. *The Plant Journal*, 28(6), 679–688.

Shoresh, M., Yedidia, I., & Chet, I. (2005). Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Phytopathology*, 95(1), 76–84.

Sisto, A., Cipriani, M. G., & Morea, M. (2004). Knot formation caused by *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* on olive plants is *hrp*-dependent. *Phytopathology*, 94(5), 484–489.

Stes, E., Prinsen, E., Holsters, M., & Vereecke, D. (2012). Plant-derived auxin plays an accessory role in symptom development upon *Rhodococcus fascians* infection. *The Plant Journal*, 70(3), 513–527.

Stes, E., Francis, I., Pertry, I., Dolzblasz, A., Depuydt, S., & Vereecke, D. (2013). The leafy gall syndrome induced by *Rhodococcus fascians*. *FEMS Microbiology Letters*, 342(2), 187–194.

Thaler, J. S., & Bostock, R. M. (2004). Interactions between abscisic-acid-mediated responses and plant resistance to pathogens and insects. *Ecology*, 85(1), 48–58.

de Torres Zabala, M., Bennett, M. H., Truman, W. H., & Grant, M. R. (2009). Antagonism between salicylic and abscisic acid reflects early host-pathogen conflict and moulds plant defence responses. *The Plant Journal*, 59(3), 375–386.

de Torres-Zabala, M., Truman, W., Bennett, M. H., Lafforgue, G., Mansfield, J. W., Egea, P. R., ... & Grant, M. (2007). *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* hijacks the *Arabidopsis* abscisic acid signalling pathway to cause disease. *The EMBO Journal*, 26(5), 1434–1443.

Del Río, L. A. (2015). ROS and RNS in plant physiology: an overview. *Journal of Experimental Botany*, 66(10), 2827–2837.

Truman, W., Zabala, M. T., & Grant, M. (2006). Type III effectors orchestrate a complex interplay between transcriptional networks to modify basal defence responses during pathogenesis and resistance. *The Plant Journal*, 46(1), 14–33.

Tzfira, T., & Citovsky, V. (2003). The *Agrobacterium*-plant cell interaction. Taking biology lessons from a bug. *Plant Physiology*, 133, 943–947.

Ullrich, C. I., & Aloni, R. (2000). Vascularization is a general requirement for growth of plant and animal tumours. *Journal of Experimental Botany*, 51(353), 1951–1960.

Van Baarlen, P., Staats, M., & Van Kan, J. A. (2004). Induction of programmed cell death in lily by the fungal pathogen *Botrytis elliptica*. *Molecular Plant Pathology*, 5(6), 559–574.

van Loon, L. C., Geraats, B. P., & Linthorst, H. J. (2006). Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends in Plant Science*, 11(4), 184–191.

Walters, D. R., & McRoberts, N. (2006). Plants and biotrophs: a pivotal role for cytokinins? *Trends in Plant Science*, 11(12), 581–586.

Walters, D. R., McRoberts, N., & Fitt, B. D. (2008). Are green islands red herrings? Significance of green islands in plant interactions with pathogens and pests. *Biological Reviews*, 83(1), 79–102.

Wang, D., Pajerowska-Mukhtar, K., Culler, A. H., & Dong, X. (2007). Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway. *Current Biology*, 17(20), 1784–1790.

Wang, Y., Chen, C., Loake, G. J., & Chu, C. (2010). Nitric oxide: promoter or suppressor of programmed cell death? *Protein & Cell*, 1(2), 133–142.

Wangdi, T., Uppalapati, S. R., Nagaraj, S., Ryu, C. M., Bender, C. L., & Mysore, K. S. (2010). A virus-induced gene silencing screen identifies a role for Thylakoid Formation 1 in *Pseudomonas syringae* pv *tomato* symptom development in tomato and *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 152(1), 281–292.

Williams, B., Kabbage, M., Kim, H. J., Britt, R., & Dickman, M. B. (2011). Tipping the balance: *Sclerotinia sclerotiorum* secreted oxalic acid suppresses host defenses by manipulating the host redox environment. *PLoS Pathogens*, 7(6), e1002107.

Yang, D. L., Li, Q., Deng, Y. W., Lou, Y. G., Wang, M. Y., Zhou, G. X., ... & He, Z. H. (2008). Altered disease development in the *eui* mutants and *Eui* overexpressors indicates that gibberellins negatively regulate rice basal disease resistance. *Molecular Plant*, 1(3), 528–537.

Yasuda, M., Ishikawa, A., Jikumaru, Y., Seki, M., Umezawa, T., Asami, T., ... & Nakashita, H. (2008). Antagonistic interaction between systemic acquired resistance and the abscisic acid-mediated abiotic stress response in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 20(6), 1678–1692.

Zhao, Y., Thilmony, R., Bender, C. L., Schaller, A., He, S. Y., & Howe, G. A. (2003). Virulence systems of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* promote bacterial speck disease in tomato by targeting the jasmonate signaling pathway. *The Plant Journal*, 36(4), 485–499.

Zheng, X. Y., Spivey, N. W., Zeng, W., Liu, P. P., Fu, Z. Q., Klessig, D. F., ... & Dong, X. (2012). Coronatine promotes *Pseudomonas syringae* virulence in plants by activating a signaling cascade that inhibits salicylic acid accumulation. *Cell Host & Microbe*, *11*(6), 587–596.

Zupan, J., Muth, T. R., Draper, O., & Zambryski, P. (2000). The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *The Plant Journal*, *23*(1), 11–28.

Zwack, P. J., Robinson, B. R., Risley, M. G., & Rashotte, A. M. (2013). Cytokinin response factor 6 negatively regulates leaf senescence and is induced in response to cytokinin and numerous abiotic stresses. *Plant and Cell Physiology*, *54*(6), 971–981.

7.9. Факторы вирулентности бактерий, индуцирующие восприимчивые ответы растений-хозяев

Для индукции восприимчивых ответов у растений-хозяев фитопатогены синтезируют специальные факторы вирулентности, которые влияют на протекание различных физиологических процессов макроорганизма. К таким факторам вирулентности относятся некоторые эффекторные белки, фитогормоны, фитотоксины и сидерофоры.

Большинство описанных на сегодняшний день **эффекторных белков** бактерий нельзя отнести к индукторам восприимчивых ответов растений, поскольку эти эффекторы работают не как активаторы тех или иных физиологических процессов хозяина, а как репрессоры количественной и качественной устойчивости, «разрывающие» цепи передачи сигналов от элиситоров и не позволяющие растению запускать фитоиммунные реакции при инвазии патогена (см. главу 6.2). Однако некоторые эффекторные белки «нацелены» не на подавление систем фитоиммунитета, а на активацию процессов общего метаболизма, которые не связаны напрямую с защитными ответами, но определяют особенности физиологии растения как компонента патологической системы и способствуют преобразованию организма хозяина в комфортную для патогена эконишу. Такие эффекторы функционируют как индукторы восприимчивых ответов.

Некоторые эффекторы активируют работу гормональных систем растений. Так, например, эффекторный белок *AvrRpt2 Pseudomonas syringae* участвует в разрушении репрессоров передачи сигнала ауксина Aux/IAA, вследствие чего в инфицированных растениях индуцируются ауксин-регулируемые ответы (Chen et al., 2007). Белок *HopQ1* этой же бактерии индуцирует цитокинин-регулируемые ответы (Hann et al., 2014). К возможным активаторам ауксин-опосредуемой гормональной системы относят также *PthG Pantoea agglomerans*, поскольку «инактивация» системы секреции третьего типа (ССТТ) у этого патогена делает его авирулентным, а гетерологичная экспрессия гена *pthG* в растении приводит к повышению уровня ауксина (Manulis, Barash, 2003; Chalupowicz et al., 2006; Barash, Manulis-Sasson, 2009). Эффектор *AvrPtoB P. syringae* активирует экспрессию гена фермента биосинтеза АБК, вызывая таким образом повышение уровня этого фитогормона в растении, что, в свою очередь, приводит к подавлению защитных систем хозяина (de Torres-Zabala et al., 2007, 2009).

Эффекторы псевдомонад могут координировать движение замыкающих клеток устьиц. Белки *HopM1*, *HopF2* и *AvrB* препятствуют ПАМП-индуцируемому закрытию устьиц на инвазивной стадии инфекции (Lozano-Duran et al., 2014; Hurley et al., 2014; Zhou et al., 2015), а *HopAM1*, наоборот, обеспечивает АБК-регулируемое закрытие устьиц на постинвазивной стадии (Goel et al., 2008). При этом гетерологичная экспрессия *HopAM1* в растениях повышает их восприимчивость к *P. syringae*. Некоторые эффекторы (*HopG1*, *HopE1 P. syringae*) влияют на организацию цитоскелета, который, в свою очередь, координирует протекание множества метаболических процессов в клетках хозяина (Guo et al., 2016; Shimono et al., 2016).

Многие эффекторы, индуцирующие восприимчивые ответы, относятся к группе так называемых TAL-(transcription activator-like)-эффекторов. TAL-эффекторы, описанные у ксантомонад, служат в качестве активаторов транскрипции растительных S-(susceptibility)-генов восприимчивости, продукты которых и обеспечивают «правильное» для патогена преобразование внутренней среды хозяина в процессе инфекции (Boch et al., 2014). Некоторые TAL-эффекторы могут индуцировать транскрипцию сразу нескольких S-генов (Cernadas et al., 2014). Кроме того, существуют TAL-эффекторы, активирующие экспрессию генов, кодирующих факторы регуляции транскрипции, которые, в свою очередь, индуцируют экспрессию большой группы растительных генов (Kay, Bonas, 2007; Hu et al., 2014). Наиболее известными S-генами, активируемыми TAL-эффекторами, являются SWEET-гены, кодирующие транспортеры простых углеводов (см. главу 7.4) (Verdier et al., 2012; Streubel et al., 2013; Cohn et al., 2014; Chandran, 2015; Huang et al., 2016; Cox et al., 2017).

Для индукции восприимчивых ответов растений-хозяев ряд видов фитопатогенных бактерий синтезирует **фитогормоны**. Обычно бактерии, продуцирующие ауксин и цитокинины, вызывают патологическое разрастание тканей (неопластический рост) у растений, которое и является в той или иной степени результатом действия этих «ростовых» фитогормонов бактериального происхождения (Costacurta, Vanderleyden, 1995; Jameson, 2000). Влияние продуцируемых фитопатогенными бактериями ауксина и цитокининов на формирование патологий у хозяина различается в зависимости от стратегии взаимодействия определенного вида микроорганизма с растением. Бактерии *Pseudomonas savastanoi*, индуцирующие образование опухолей, не способны вызывать инфекционный процесс у растений, если лишить (с помощью мутаций) эти микроорганизмы возможности синтезировать ауксин и цитокинины (Iacobellis et al., 1994). Агробактериям тоже необходимы гены ферментов биосинтеза ауксина и цитокининов для индукции формирования галлов у растений (Zupan et al., 2000); но синтез «агробактериальных» ауксина и цитокининов осуществляется не столько самими микроорганизмами, сколько растениями-хозяевами, поскольку эти гены паразита находятся в составе T-ДНК, которая при инфекции интегрируется в хромосомы клеток хозяина (см. главы 3.7, 7.7). В то же время мутанты *Pantoea agglomerans*, не производящие ауксин и цитокинины, сохраняют способность индуцировать у растений формирование опухолей, хотя их размер оказывается меньше, чем у галлов, образующихся при инфицировании дикими формами микроорганизмов, синтезирующими эти фитогормоны (Manulis, Varash, 2003; Chalupowicz et al., 2006). То есть пантоям производство фитогормонов необходимо, чтобы увеличивать размер опухолей, но не инициировать их формирование.

Гиббереллины тоже могут производиться не только растениями, но и микроорганизмами. Интересно, что впервые эти фитогормоны были обнаружены не в растениях, а в фитопатогенном грибе *Gibberella fujikoroi* (реклассифицирован в *Fusarium fujikoroi*) (Kurosawa, 1926; Yabuta et al., 1934). Именно гибберелли-

ны — фитогормоны, индуцирующие растяжение растительных клеток, — по всей видимости, и определяют развитие типичных симптомов, вызываемых этим грибом, — патологическое удлинение стеблей (Tudzynski, 1999). Позднее гиббереллины, помимо растений и грибов, были обнаружены у диазотрофных (фиксирующих азот) бактериальных эндофитов растений (*Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Bradyrhizobium japonicum*, виды родов *Rhizobium* и *Azospirillum*) (Bastián et al., 1998; Piccoli et al., 2011; Mendez et al., 2014), а также бактерий, обитающих в ризосфере (Barea et al., 1976; Mahmoud et al., 1984; Gutiérrez-Mañero et al., 2001). Недавно были получены весомые аргументы в пользу того, что и фитопатогенные бактерии синтезируют гиббереллины. У некоторых штаммов *Xanthomonas oryzae*, *X. translucens*, *X. bromi* и *Erwinia tracheiphila* обнаружены все необходимые для биосинтеза гиббереллинов гены (Nagel, Peters, 2017a). У *Xanthomonas oryzae* эти гены были клонированы, и с помощью анализа соответствующих им рекомбинантных ферментов было подтверждено, что каталитическое действие этих ферментов обеспечивает биосинтез физиологически активных гиббереллинов (Nagel, Peters, 2017b). «Инактивация» этих генов приводит к снижению вирулентности *X. oryzae*, а у растений, инфицированных мутантными по генам биосинтеза гиббереллинов штаммами, повышается уровень экспрессии жасмонат-индуцируемых генов (Lu et al., 2015). В связи с этим предполагают, что гиббереллины необходимы вышеперечисленным микроорганизмам, чтобы индуцировать опосредуемую этими фитогормонами гормональную систему хозяина и таким образом репрессировать жасмонат-регулируемые защитные ответы растений.

Этилен, являющийся растительным гормоном, могут синтезировать многие виды бактерий, среди которых есть и фитопатогенные (*Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas (Ralstonia) solanacearum*, *Pseudomonas pisi*, виды рода *Xanthomonas*, некоторые подвиды/штаммы *Pseudomonas syringae*) (Swanson et al., 1979; Fukuda et al., 1993; Weingart, Volksch, 1997). Функции, выполняемые этиленом у бактерий, пока не выяснены. Однако логично предположить, что способность синтезировать этилен может позволить фитопатогенным бактериям «манипулировать» растением и индуцировать восприимчивые ответы хозяина. Действительно, на примере инфекций, вызываемых *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* и *P. syringae* pv. *phaseolicola*, было показано, что повышение уровня этилена при развитии симптомов заболевания достигается за счет биосинтеза этого фитогормона бактериями, а не растениями (Weingart, Volksch, 1997). В то же время считается, что этилен, синтезируемый при патологиях, вызываемых *Pseudomonas solanacearum* и *Xanthomonas citri*, является растительным, а не бактериальным по своему происхождению (Pegg, Cronshaw, 1976; Goto et al., 1980; Lu et al., 1989). Это указывает на то, что механизмы индукции патогенами этилен-опосредуемой гормональной системы растений могут различаться в зависимости от стратегии взаимодействия определенного микроорганизма с хозяином.

Продуценты АБК среди фитопатогенных бактерий на сегодняшний день не описаны. Однако некоторые виды фитопатогенных грибов (*Botrytis cinerea*,

Cercospora rosicola и *Magnaporthe oryzae*) синтезируют АБК (Assante et al., 1977; Hirai et al., 2000; Jiang et al., 2010). На примере *Magnaporthe oryzae* была продемонстрирована необходимость производимой патогеном АБК для формирования симптомов заболевания у растений; не синтезирующие АБК мутанты этого патогена оказались авирулентными (Spence et al., 2015). Кроме того, некоторые эндофитные не фитопатогенные бактерии, а также ризосферные бактерии способны продуцировать АБК (Forchetti et al., 2007; Piccoli et al., 2011; Salomon et al., 2014; Lievens et al., 2017). Роль производимой эндофитными и ризосферными бактериями АБК в растительно-микробных взаимодействиях пока не совсем понятна. Однако показано, что синтезирующие АБК азоспириллы способствуют повышению устойчивости растений к водному дефициту, адаптивные реакции на который регулируются этим фитогормоном (Cohen et al., 2009).

Большинство известных на сегодняшний день **фитотоксинов** бактерий представляет собой ингибиторы различных реакций растений (см. главу 3.3). Однако среди синтезируемых фитопатогенными бактериями фитотоксинов описан и такой, который является индуктором восприимчивых ответов хозяина. Этот фитотоксин, продуцируемый *Pseudomonas syringae* и названный коронатином, служит в качестве функционального аналога жасмонатов, обеспечивая COI-1-зависимую деградацию JAZ-белков — репрессоров транскрипции жасмонат-индуцируемых генов (подробнее см. главу 6.3 и рис. 6.3.2). Благодаря синтезу коронатина, псевдомонады активируют жасмонат-регулируемые ответы, которые, в свою очередь, подавляют в растении биосинтез губительной для этих патогенов салициловой кислоты (подробнее см. главы 6.3, 7.7) (Zheng et al., 2012).

Помимо этого, коронатин координирует реакции растения, связанные с движением замыкающих клеток, вызывая повторное открывание устьиц (reopening) после их ПАМП-индуцируемого закрывания при атаке патогена (Melotto et al., 2006, 2008, 2017). Существует несколько гипотез относительно механизма действия коронатина на устьичный аппарат растений. Во-первых, коронатин может предотвращать накопление салициловой кислоты, которая опосредует ПАМП-индуцируемое закрывание устьиц (Zheng et al., 2012). Во-вторых, поскольку жасмонаты, а значит и коронатин, могут подавлять АБК-индуцируемые ответы, этот фитотоксин, вероятно, способен препятствовать АБК-регулируемому закрыванию устьиц (Melotto et al., 2008). В-третьих, существуют аргументы в пользу того, что коронатин может способствовать открыванию устьиц за счет взаимодействия с белком RIN4, ингибирующим Н-АТФазы АНА1 и АНА2, работа которых приводит к гиперполяризации мембран замыкающих клеток (Liu et al., 2009).

Фитотоксины, действующие подобно коронатину, по всей вероятности, есть и у других, помимо псевдомонад, фитопатогенов. Гены, кодирующие ферменты биосинтеза коронатина, обнаружены в геномах пектобактерий и стрептомицетов (Bignell et al., 2014; Panda et al., 2016). При этом показано, что мутанты пектобактерий, у которых эти гены «инактивированы», в отличие от дикого типа, не вызывают индукцию жасмонат-регулируемых генов и развития мягкой гнили (Gorshkov et al., 2018).

Бактериальные **сидерофоры**, основной функцией которых является транспортировка железа из окружающей среды внутрь клеток (см. главу 3.4), как оказалось, тоже могут играть роль индукторов восприимчивых ответов растений. Так, хризобактин — сидерофор, продуцируемый *Dickeya dadantii*, сигнализирует растению о недостатке железа в организме. В результате этого в корнях происходит активация систем ассимиляции этого металла (Dellagi et al., 2009; Segond et al., 2009). Это, в свою очередь, способствует повышению содержания железа в растении, что является необходимым условием для полноценной реализации патогенного потенциала дикей (см. главу 3.4).

Таким образом, фитопатогены в ходе эволюции «научились» производить специальные метаболиты, которые, доставляясь в организм хозяина, «мягко» перестраивают его метаболизм. Благодаря этому растение из «автономной» биологической единицы преобразуется в компонент интегрированной растительно-микробной патосистемы.

Литература:

- Assante, G., Merlini, L., & Nasini, G. (1977). (+)-Abscisic acid, a metabolite of the fungus *Cercospora rosicola*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 33(12), 1556–1557.
- Barash, I., & Manulis-Sasson, S. (2009). Recent evolution of bacterial pathogens: the gall-forming *Pantoea agglomerans* case. *Annual Review of Phytopathology*, 47, 133–152.
- Barea, J. M., Navarro, E., & Montoya, E. (1976). Production of plant growth regulators by rhizosphere phosphate-solubilizing bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 40(2), 129–134.
- Bastián, F., Cohen, A., Piccoli, P., Luna, V., Bottini, R., & Baraldi, R. (1998). Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Regulation*, 24(1), 7–11.
- Bignell, D. R. D., Fyans, J. K., & Cheng, Z. (2014). Phytotoxins produced by plant pathogenic *Streptomyces* species. *Journal of Applied Microbiology*, 116(2), 223–235.
- Boch, J., Bonas, U., & Lahaye, T. (2014). TAL effectors-pathogen strategies and plant resistance engineering. *New Phytologist*, 204(4), 823–832.
- Cernadas, R. A., Doyle, E. L., Niño-Liu, D. O., Wilkins, K. E., Bancroft, T., Wang, L., ... & Nettleton, D. (2014). Code-assisted discovery of TAL effector targets in bacterial leaf streak of rice reveals contrast with bacterial blight and a novel susceptibility gene. *PLoS Pathogens*, 10(2), e1003972.
- Chalupowicz, L., Barash, I., Schwartz, M., Aloni, R., & Manulis, S. (2006). Comparative anatomy of gall development on *Gypsophila paniculata* induced by bacteria with different mechanisms of pathogenicity. *Planta*, 224(2), 429–437.
- Chandran, D. (2015). Co-option of developmentally regulated plant SWEET transporters for pathogen nutrition and abiotic stress tolerance. *IUBMB Life*, 67(7), 461–471.

Chen, Z., Agnew, J. L., Cohen, J. D., He, P., Shan, L., Sheen, J., & Kunkel, B. N. (2007). *Pseudomonas syringae* type III effector AvrRpt2 alters *Arabidopsis thaliana* auxin physiology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(50), 20131–20136.

Cohen, A. C., Travaglia, C. N., Bottini, R., & Piccoli, P. N. (2009). Participation of abscisic acid and gibberellins produced by endophytic *Azospirillum* in the alleviation of drought effects in maize. *Botany*, 87(5), 455–462.

Cohn, M., Bart, R. S., Shybut, M., Dahlbeck, D., Gomez, M., Morbitzer, R., ... & Staskawicz, B. J. (2014). *Xanthomonas axonopodis* virulence is promoted by a transcription activator-like effector-mediated induction of a SWEET sugar transporter in cassava. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(11), 1186–1198.

Costacurta, A., & Vanderleyden, J. (1995). Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 21(1), 1–18.

Cox, K. L., Meng, F., Wilkins, K. E., Li, F., Wang, P., Booher, N. J., ... & Zheng, Y. (2017). TAL effector driven induction of a SWEET gene confers susceptibility to bacterial blight of cotton. *Nature Communications*, 8, 15588.

Dellagi, A., Segond, D., Rigault, M., Fagard, M., Simon, C., Saindrenan, P., & Expert, D. (2009). Microbial siderophores exert a subtle role in *Arabidopsis* during infection by manipulating the immune response and the iron status. *Plant Physiology*, 150(4), 1687–1696.

Forchetti, G., Masciarelli, O., Alemanno, S., Alvarez, D., & Abdala, G. (2007). Endophytic bacteria in sunflower (*Helianthus annuus* L.): isolation, characterization, and production of jasmonates and abscisic acid in culture medium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(5), 1145–1152.

Fukuda, H., Ogawa, T., & Tanase, S. (1993). Ethylene production by micro-organisms. *Advances in Microbial Physiology*, 35, 275–306.

Goel, A. K., Lundberg, D., Torres, M. A., Matthews, R., Akimoto-Tomiya, C., Farmer, L., ... & Grant, S. R. (2008). The *Pseudomonas syringae* type III effector HopAM1 enhances virulence on water-stressed plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(3), 361–370.

Gorshkov, V., Gubaev, R., Petrova, O., Daminova, A., Gogoleva, N., Ageeva, M., Parfirova, O., Prokchorchik, M., Nikolaichik, Y., & Gogolev, Y. (2018). Transcriptome profiling helps to identify potential and true molecular switches of stealth to brute force behavior in *Pectobacterium atrosepticum* during systemic colonization of tobacco plants. *European Journal of Plant Pathology*, in press.

Goto, M., Yaguchi, Y., & Hyodo, H. (1980). Ethylene production in citrus leaves infected with *Xanthomonas citri* and its relation to defoliation. *Physiological Plant Pathology*, 16(3), 343–350.

Guo, M., Kim, P., Li, G., Elowsky, C. G., & Alfano, J. R. (2016). A bacterial effector co-opts calmodulin to target the plant microtubule network. *Cell Host & Microbe*, 19(1), 67–78.

Gutiérrez-Mañero, F. J., Ramos-Solano, B., Probanza, A., Mehouchi, J., R Tadeo, F., & Talon, M. (2001). The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiologia Plantarum*, 111(2), 206–211.

Hann, D. R., Domínguez-Ferreras, A., Motyka, V., Dobrev, P. I., Schornack, S., Jehle, A., ... & Boller, T. (2014). The *Pseudomonas* type III effector HopQ1 activates cytokinin signaling and interferes with plant innate immunity. *New Phytologist*, 201(2), 585–598.

Hirai, N., Yoshida, R., Todoroki, Y., & Ohigashi, H. (2000). Biosynthesis of abscisic acid by the non-mevalonate pathway in plants, and by the mevalonate pathway in fungi. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 64(7), 1448–1458.

Hu, Y., Zhang, J., Jia, H., Sosso, D., Li, T., Frommer, W. B., ... & Jones, J. B. (2014). Lateral organ boundaries 1 is a disease susceptibility gene for citrus bacterial canker disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(4), 521–529.

Huang, S., Antony, G., Li, T., Liu, B., Obasa, K., Yang, B., & White, F. F. (2016). The broadly effective recessive resistance gene xa5 of rice is a virulence effector-dependent quantitative trait for bacterial blight. *The Plant Journal*, 86(2), 186–194.

Hurley, B., Lee, D., Mott, A., Wilton, M., Liu, J., Liu, Y. C., ... & Desveaux, D. (2014). The *Pseudomonas syringae* type III effector HopF2 suppresses *Arabidopsis* stomatal immunity. *PLoS ONE*, 9(12), e114921.

Iacobellis, N. S., Sisto, A., Surico, G., Evidente, A., & DiMaio, E. (1994). Pathogenicity of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* mutants defective in phytohormone production. *Journal of Phytopathology*, 140(3), 238–248.

Jameson, P. E. (2000). Cytokinins and auxins in plant-pathogen interactions — An overview. *Plant Growth Regulation*, 32(2–3), 369–380.

Jiang, C. J., Shimono, M., Sugano, S., Kojima, M., Yazawa, K., Yoshida, R., ... & Takatsuji, H. (2010). Abscisic acid interacts antagonistically with salicylic acid signaling pathway in rice-*Magnaporthe grisea* interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23(6), 791–798.

Kay, S., & Bonas, U. (2009). How *Xanthomonas* type III effectors manipulate the host plant. *Current Opinion in Microbiology*, 12(1), 37–43.

Kurosawa, E. (1926). Experimental studies on the nature of the substance secreted by the «bakanae» fungus. *Natural History Society of Formosa*, 16, 213–227.

Lievens, L., Pollier, J., Goossens, A., Beyaert, R., & Staal, J. (2017). Abscisic acid as pathogen effector and immune regulator. *Frontiers in Plant Science*, 8, 587.

Liu, J., Elmore, J. M., Fuglsang, A. T., Palmgren, M. G., Staskawicz, B. J., & Coaker, G. (2009). RIN4 functions with plasma membrane H⁺-ATPases to regulate stomatal apertures during pathogen attack. *PLoS Biology*, 7 (6), e1000139.

Lozano-Durán, R., Bourdais, G., He, S. Y., & Robatzek, S. (2014). The bacterial effector HopM1 suppresses PAMP-triggered oxidative burst and stomatal immunity. *New Phytologist*, 202(1), 259–269.

Lu, S. F., Tzeng, D. D., & Hsu, S. T. (1989). *In vitro* and *in vivo* ethylene production in relation to pathogenesis of *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith on *Lycopersicon esculentum* M. *Plant Protection Bulletin (Taiwan)*, 31(1), 60–76.

Lu, X., Hershey, D. M., Wang, L., Bogdanove, A. J., & Peters, R. J. (2015). An ent-kaurene-derived diterpenoid virulence factor from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. *New Phytologist*, 206(1), 295–302.

Mahmoud, S. A. Z., Ramadan, E. M., Thabet, F. M., & Khater, T. (1984). Production of plant growth promoting substances by rhizosphere microorganisms. *Zentralblatt für Mikrobiologie*, 139(4), 227–232.

Manulis, M., & Barash, I. (2003). The molecular basis for transformation of an epiphyte into a gall-forming pathogen as exemplified by *Erwinia herbicola* pv. *gypsophilae*. *Plant-Microbe Interactions*, 6, 19–52.

Melotto, M., Underwood, W., & He, S. Y. (2008). Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 46, 101–122.

Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K., & He, S. Y. (2006). Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell*, 126(5), 969–980.

Melotto, M., Zhang, L., Oblessuc, P. R., & He, S. Y. (2017). Stomatal defense a decade later. *Plant Physiology*, 174(2), 561–571.

Méndez, C., Baginsky, C., Hedden, P., Gong, F., Carú, M., & Rojas, M. C. (2014). Gibberellin oxidase activities in *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids. *Phytochemistry*, 98, 101–109.

Nagel, R., & Peters, R. J. (2017a). Investigating the phylogenetic range of gibberellin biosynthesis in bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 30(4), 343–349.

Nagel, R., & Peters, R. J. (2017b). ¹⁸O₂ labeling experiments illuminate the oxidation of ent-kaurene in bacterial gibberellin biosynthesis. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 15(36), 7566–7571.

Panda, P., Vanga, B. R., Lu, A., Fiers, M., Fineran, P. C., Butler, R., ... & Pitman, A. R. (2016). *Pectobacterium atrosepticum* and *Pectobacterium carotovorum* harbor distinct, independently acquired integrative and conjugative elements encoding coronafacic acid that enhance virulence on potato stems. *Frontiers in Microbiology*, 7, 397.

Pegg, G. F., & Cronshaw, D. K. (1976). The relationship of *in vitro* to *in vivo* ethylene production in *Pseudomonas solanacearum* infection of tomato. *Physiological Plant Pathology*, 9(2), 145–154.

Piccoli, P., Travaglia, C., Cohen, A., Sosa, L., Cornejo, P., Masuelli, R., & Bottini, R. (2011). An endophytic bacterium isolated from roots of the halophyte *Prosopis strombulifera* produces ABA, IAA, gibberellins A1 and A3 and jasmonic acid in chemically-defined culture medium. *Plant Growth Regulation*, 64(2), 207–210.

Salomon, M. V., Bottini, R., de Souza Filho, G. A., Cohen, A. C., Moreno, D., Gil, M., & Piccoli, P. (2014). Bacteria isolated from roots and rhizosphere of *Vitis vinifera* retard water losses, induce abscisic acid accumulation and synthesis of defense-related terpenes in *in vitro* cultured grapevine. *Physiologia Plantarum*, 151(4), 359–374.

Segond, D., Dellagi, A., Lanquar, V., Rigault, M., Patrit, O., Thomine, S., & Expert, D. (2009). NRAMP genes function in *Arabidopsis thaliana* resistance to *Erwinia chrysanthemi* infection. *The Plant Journal*, 58(2), 195–207.

Shimono, M., Lu, Y. J., Porter, K., Kvitko, B. H., Henty-Ridilla, J. L., Creason, A., ... & Day, B. (2016). The *Pseudomonas syringae* type-III effector HopG1 induces actin remodeling to promote symptom development and susceptibility during infection. *Plant Physiology*, 171(3), 2239–2255.

Spence, C. A., Lakshmanan, V., Donofrio, N., & Bais, H. P. (2015). Crucial roles of abscisic acid biogenesis in virulence of rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1082.

Streubel, J., Pesce, C., Hutin, M., Koebnik, R., Boch, J., & Szurek, B. (2013). Five phylogenetically close rice SWEET genes confer TAL effector-mediated susceptibility to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *New Phytologist*, 200(3), 808–819.

Swanson, B. T., Wilkins, H. F., & Kennedy, B. W. (1979). Factors affecting ethylene production by some plant pathogenic bacteria. *Plant and Soil*, 51(1), 19–26.

de Torres-Zabala, M., Bennett, M. H., Truman, W. H., & Grant, M. R. (2009). Antagonism between salicylic and abscisic acid reflects early host — pathogen conflict and moulds plant defence responses. *The Plant Journal*, 59(3), 375–386.

de Torres-Zabala, M., Truman, W., Bennett, M. H., Lafforgue, G., Mansfield, J. W., Egea, P. R., ... & Grant, M. (2007). *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* hijacks the *Arabidopsis* abscisic acid signalling pathway to cause disease. *The EMBO Journal*, 26(5), 1434–1443.

Tudzynski, B. (1999). Biosynthesis of gibberellins in *Gibberella fujikuroi*: biomolecular aspects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52(3), 298–310.

Verdier, V., Triplett, L. R., Hummel, A. W., Corral, R., Cernadas, R. A., Schmidt, C. L., ... & Leach, J. E. (2012). Transcription activator-like (TAL) effectors targeting OsSWEET genes enhance virulence on diverse rice (*Oryza sativa*) varieties when expressed individually in a TAL effector-deficient strain of *Xanthomonas oryzae*. *New Phytologist*, 196(4), 1197–1207.

Weingart, H., & Volksch, B. (1997). Ethylene production by *Pseudomonas syringae* pathovars *in vitro* and *in planta*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(1), 156–161.

Yabuta, T., Kobe, K., & Hayashi, T. (1934). Biochemical studies of the «bakanae» fungus of rice. I. Fusarinic acid, a new product of the «Bakanae» fungus. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten (Pflanzenpathologie) und Pflanzenschutz*, 10, 1059–1068.

Zheng, X. Y., Spivey, N. W., Zeng, W., Liu, P. P., Fu, Z. Q., Klessig, D. F., ... & Dong, X. (2012). Coronatine promotes *Pseudomonas syringae* virulence in plants by activating a signaling cascade that inhibits salicylic acid accumulation. *Cell Host & Microbe*, 11(6), 587–596.

Zhou, Z., Wu, Y., Yang, Y., Du, M., Zhang, X., Guo, Y., ... & Zhou, J. M. (2015). An *Arabidopsis* plasma membrane proton ATPase modulates JA signaling and is exploited by the *Pseudomonas syringae* effector protein AvrB for stomatal invasion. *The Plant Cell*, 27(7), 2032–2041.

Zupan, J., Muth, T. R., Draper, O., & Zambryski, P. (2000). The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *The Plant Journal*, 23(1), 11–28.

7.10. Возможные последствия индукции восприимчивых ответов

Восприимчивые ответы растений на фитопатогенные организмы можно условно разделить на два основных типа, в зависимости от последствий, к которым они приводят. К первому типу относятся такие восприимчивые ответы, которые необходимы для размножения патогена в тканях хозяина; без этих ответов нормальное развитие микроорганизма *in planta* невозможно, и поэтому формирование симптомов заболевания не происходит. Так, например, если репрессировать восприимчивый ответ растений, связанный с индукцией программируемой клеточной смерти, то рост псевдомонад в таких растениях подавляется, что, в свою очередь, препятствует развитию инфекционного процесса (Richael et al., 2001). Следовательно, индукция ПКС в растениях необходима для обеспечения нормального развития псевдомонад в теле хозяина. Продукция жасмонатов растениями необходима колонизирующим их ксантомонадам для размножения *in planta*; «инактивация», или сайленсинг, генов ферментов биосинтеза жасмонатов репрессует рост этих бактерий в организме хозяина (O'Donnell et al., 2003).

Второй тип восприимчивых ответов включает такие реакции растений, индукция которых **не** является необходимым условием для нормального развития паразита в растении, но при этом обязательно требуется для формирования симптомов заболевания. Отсутствие таких ответов выражается толерантностью растения к патогену, то есть состоянием, при котором, несмотря на то, что паразит активно размножается в теле макроорганизма, развития патологий и снижения продуктивности у хозяина не происходит (бессимптомная инфекция) (Norman, Alvarez, 1994; Kover, Schaal, 2002; Block et al., 2005; Swanson et al., 2005).

Наиболее наглядной иллюстрацией существования двух типов восприимчивых ответов служит взаимодействие фитопатогенной бактерии *Pseudomonas syringae* с дикой и мутантными формами резуховидки (*Arabidopsis thaliana*) (Kloek et al., 2001). Растения дикого типа восприимчивы к этому патогену, и после инфицирования у них формируются типичные симптомы заболевания: хлороз и некротические пятна. Развитие инфекции при этом сопряжено с активацией микроорганизмами жасмонат-регулируемых ответов хозяина (с помощью фитотоксина коронатина), которые, в свою очередь, подавляют биосинтез губительной для псевдомонад салициловой кислоты в растении и таким образом обеспечивают условия для интенсивного размножения паразита (см. главы 6.3, 7.8, 7.9). В мутантах, нечувствительных к жасмоновой кислоте (и к коронатину), после инфицирования *P. syringae* накапливается салициловая кислота, которая не позволяет патогену размножаться и способствует формированию устойчивости у мутантных растений. Но если у устойчивых жасмонат-нечувствительных мутантов ингибировать накопление салициловой кислоты (с помощью гетерологичной экспрессии гена салицилат-гидролазы NahG), то такие растения оказываются пригодными для жизни псевдомонад: при этом скорость пролиферации *P. syringae* в двойных (жасмонат-нечувствительных и салицилат-дефицитных) мутантах и растениях дикого типа не различается. Однако, несмотря на это, у двойных мутантов, в от-

личие от растений дикого типа, при инфицировании *P. syringae* не развиваются патологии (Kloek et al., 2001). Таким образом, в растениях дикого типа развитие симптомов заболевания, вызываемого *P. syringae*, — это результат индукции двух типов восприимчивых ответов; при этом оба ответа опосредованы жасмонатами. Один из ответов обеспечивает условия для роста микроорганизма за счет ингибирования биосинтеза салициловой кислоты. Второй, не связанный с ингибированием биосинтеза салицилата, не требуется для пролиферации микроорганизма *in planta*, но является необходимым для развития симптомов заболевания.

Существует много примеров того, что подавление восприимчивых ответов может препятствовать только формированию симптомов заболевания или задерживать их развитие, но при этом не сказываться на росте патогенов в растениях. Так, в этилен-нечувствительных мутантах, в которых не индуцируются этилен-зависимые восприимчивые ответы при инфицировании *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas syringae* и *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, эти патогены способны размножаться так же, как и в растениях дикого типа; но симптомы заболевания у этилен-нечувствительных мутантов, в отличие от растений дикого типа, либо не проявляются, либо выражаются слабо (Bent et al., 1992; Lund et al., 1998; Valaji et al., 2008). Подавление синтеза этилена и салициловой кислоты у хозяина не сказывается на росте *Xanthomonas campestris in planta*, но препятствует развитию симптомов заболевания (O'Donnell et al., 2001). Снижение уровня экспрессии (сайленсинг) гена, кодирующего апопластную инвертазу растений, задерживает развитие симптомов заболевания, вызываемого ксантомодами, но не влияет на рост бактерий в растениях (Kocal et al., 2008). Таким образом, индукция вышеперечисленных восприимчивых ответов не требуется для интенсивного размножения патогена *in planta*, а необходима только для формирования патологий. Это указывает на то, что развитие симптомов заболевания является не столько прямым следствием разрушительного действия ферментов и токсинов патогена, сколько результатом реакций самого хозяина.

Причинами отсутствия патологий у растений при интенсивном размножении патогена *in planta* могут быть не только мутации в генах восприимчивости, но и особенности физиологии организма хозяина, которые делают невозможным индукцию восприимчивых ответов при атаке паразита. Так, инокуляция одного листа томата клетками *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* или *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* вызывает интенсивное развитие симптомов заболевания на этом листе, а также особый системный ответ растения. Этот системный ответ приводит к снижению уровня восприимчивости хозяина: при повторной инокуляции растения в другой лист симптомы заболевания на нем развиваются значительно медленнее (Block et al., 2005). Подобный эффект, на первый взгляд, напоминает системную приобретенную устойчивость (см. главу 6.2). Однако при развитии системной приобретенной устойчивости подавляется размножение патогена, а в вышеописанном случае в обоих листьях скорость пролиферации патогена не различается. Такой феномен был назван системной приобретенной толерантностью. Обнаружение этого феномена позволило продемонстрировать,

что организм хозяина может иметь такой физиологический статус, при котором патоген-индуцируемые восприимчивые ответы регулируются дифференциально. При этом реакции, которые необходимы для размножения патогена, индуцируются, а ответы, определяющие развитие патологий, не активируются. Это хорошо согласуется с тем, что в растениях без проявления каких-либо патологий часто осуществляется интенсивное размножение фитопатогенов, к которым эти растения восприимчивы по генетическим характеристикам (Grimault, Prior, 1993; McGarvey et al., 1999; Baumgartner, Warren, 2005; Wistrom, Purcell, 2005; Gambetta et al., 2007).

Многочисленные примеры бессимптомного сосуществования растений и фитопатогенных бактерий указывают на то, что развитие патологий, скорее всего, является результатом нарушения естественного сценария «мирного» взаимодействия макро- и микроорганизмов (Malyshkin, 2014). Одна из основных задач современной фитопатологии — это выяснение причин перехода мутуалистической формы взаимодействия к антагонистической. По всей вероятности, то, по какому из сценариев будут развиваться взаимоотношения конкретных генетических вариантов патогена и хозяина, зависит от набора восприимчивых ответов, которые индуцируются при формировании растительно-микробной патосистемы. В связи с этим возможность антропогенного контроля восприимчивых ответов могла бы позволить снизить ущерб, наносимый возбудителями заболеваний растений.

Подавление восприимчивых ответов уже применяется в сельскохозяйственной практике как подход для повышения устойчивости растений. Самый известный пример этого — нокаут S-(susceptibility)-генов Mlo (Mildew locus O), которые определяют восприимчивость ячменя к возбудителю мучнистой росы (*Erysiphe graminis*, переименован в *Blumeria graminis*) (Jarosch et al., 1999). По сравнению с более традиционными методами селекции, направленными на повышение устойчивости к паразитам (внедрение R-(resistance)-генов), подходы, связанные с инактивацией S-генов восприимчивости, имеют важное преимущество. Традиционно при выведении устойчивых к определенным патогенам сортов проводят отбор растений, имеющих R-гены устойчивости, результатом «работы» которых является патоген-индуцируемая активация качественного иммунитета (см. главу 6.2). С одной стороны, R-гены действительно могут обеспечивать устойчивость растений к определенным патогенам. Но, с другой стороны, качественная устойчивость, опосредованная R-генами, часто оказывается недолговечной. Это связано с тем, что такая устойчивость сопряжена с индукцией очень мощного иммунного ответа (реакция гиперчувствительности) (см. главу 6.2), который, в свою очередь, способствует активации мутационного процесса у патогенного организма (Trivedi, Wang, 2014). В результате этого через несколько поколений в популяции паразита появляется такая генетическая форма, против которой привнесенный в геном растения R-ген оказывается неэффективным (Wichmann et al., 2005; Trivedi, Wang, 2014), что может приводить к развитию патологий у растений и даже к эпидемиям (Van der Hoorn et al., 2002; Panstruga, Dodds, 2009; Pavan et al., 2010).

Инактивация S-генов восприимчивости у растений оказывает значительно меньшее селективное давление на колонизирующие их патогенные организмы, чем внедрение R-генов в геном хозяина (Pavan et al., 2010). «Отключение» S-генов не предполагает индукцию качественного иммунитета и, следовательно, не способствует появлению новых вирулентных штаммов паразита. Благодаря этому устойчивость, связанная не с индукцией защитных систем, а с потерей восприимчивости (в том числе резистентность Mlo-мутантов к *Erysiphe graminis*), не теряет со временем своей эффективности (Lyngkjaer et al., 2000; Pavan et al., 2010). Однако наряду с этим преимуществом подхода, связанного с инактивацией S-генов, у него может быть и недостаток, который, в частности, проявляется у мутантных по S-гену Mlo растений ячменя. Хотя такие растения невосприимчивы к *Erysiphe graminis*, их устойчивость к ряду других фитопатогенов (*Cochliobolus sativus*, *Magnaporthe grisea*, *Fusarium graminearum*) снижена по сравнению с сортами, имеющими функциональные гены Mlo (Jarosch et al., 1999; Kumar et al., 2001; Jansen et al., 2005). По всей видимости, это связано с тем, что колонизация растений *Erysiphe graminis* делает их более устойчивыми к некоторым другим патогенам. Инактивация S-гена Mlo, в свою очередь, препятствует размножению *E. graminis* в растении, а не просто приводит к подавлению патологического процесса, вызываемого этим патогеном. И, видимо, поэтому устойчивость к *Cochliobolus sativus*, *Magnaporthe grisea*, *Fusarium graminearum*, индуцируемая *Erysiphe graminis* у растений дикого типа, у Mlo-мутантов не формируется.

Нейтрализовать этот недостаток, по всей вероятности, возможно, если подавлять в растениях те восприимчивые ответы, которые определяют только проявление симптомов заболевания, но не влияют на размножение патогена *in planta*. Такой подход позволит приостанавливать формирование патологий, не препятствуя при этом развитию патогена в теле хозяина. Это, во-первых, не будет приводить к индукции у патогена мутационного процесса, результатом которого является появление новых высокоагрессивных штаммов, и, во-вторых, позволит растениям получать пользу от не вызывающих заболевания «мирных» патогенов. Польза при этом может выражаться повышением устойчивости растений к широкому спектру патогенных микроорганизмов (как было описано выше), а также к насекомым-фитофагам (Crute, Pink, 1996; Kover, Schaal, 2002) и абиотическим стрессорам (Reusche et al., 2012).

Таким образом, подытоживая информацию, представленную в седьмой главе, можно заключить, что восприимчивые ответы растений во многом определяют сценарий взаимодействия фитопатогена со своим хозяином. Растительный организм, даже в случае генетически детерминированной предрасположенности, не является восприимчивым к определенному патогену *a priori*. Восприимчивость предполагает активные действия самого растения, а именно его физиологические ответы на инвазию паразита, и возможность индукции этих ответов определяется не только присутствием патогена, но и многими другими факторами (физиологическим статусом организма хозяина, условиями окружающей среды и т. д.). Вследствие этого развитие взаимоотношений патогена и хозяина может проходить по разным сценариям.

Фитопатогены «заставляют» растения стать восприимчивыми с помощью специальных факторов вирулентности, которые координируют протекание различных метаболических процессов хозяина. Восприимчивые ответы способствуют преобразованию организма хозяина в удобную для паразита экологическую нишу. При этом некоторые восприимчивые ответы не приводят к развитию симптомов заболевания, а только обеспечивают эффективное размножение патогена в теле хозяина, а другие ответы сами по себе детерминируют формирование патологий. Невозможно не заметить, что физиологические процессы, определяющие устойчивость и восприимчивость растений к патогенам, во многом схожи. Действительно, на сегодняшний день сложно четко разделить молекулярные механизмы устойчивости и восприимчивости. По всей вероятности, большинство патоген-индуцируемых физиологических процессов может вносить вклад и в устойчивость, и в восприимчивость в зависимости от времени и интенсивности их активации. Расшифровка молекулярных механизмов индуцируемой восприимчивости расширит фундаментальные представления о взаимодействии бактерий и растений, а также послужит основой для разработки нетривиальных подходов для контроля заболеваний сельскохозяйственных культур. Грамотное манипулирование восприимчивыми ответами растений может позволить создавать устойчивые «надорганизменные» системы, в рамках которых патоген и хозяин смогут взаимовыгодно сосуществовать друг с другом без проявления патологий.

Литература:

- Balaji, V., Mayrose, M., Sherf, O., Jacob-Hirsch, J., Eichenlaub, R., Iraki, N., ... & Sessa, G. (2008). Tomato transcriptional changes in response to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* reveal a role for ethylene in disease development. *Plant Physiology*, 146(4), 1797–1809.
- Baumgartner, K., & Warren, J. G. (2005). Persistence of *Xylella fastidiosa* in riparian hosts near northern California vineyards. *Plant Disease*, 89(10), 1097–1102.
- Bent, A. F., Innes, R. W., Ecker, J. R., & Staskawicz, B. J. (1992). Disease development in ethylene-insensitive *Arabidopsis thaliana* infected with virulent and avirulent *Pseudomonas* and *Xanthomonas* pathogens. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 5, 372–372.
- Block, A., Schmelz, E., Jones, J. B., & Klee, H. J. (2005). Coronatine and salicylic acid: the battle between *Arabidopsis* and *Pseudomonas* for phytohormone control. *Molecular Plant Pathology*, 6(1), 79–83.
- Crute, I. R., & Pink, D. (1996). Genetics and utilization of pathogen resistance in plants. *The Plant Cell*, 8(10), 1747–1755.
- Gambetta, G. A., Fei, J., Rost, T. L., & Matthews, M. A. (2007). Leaf scorch symptoms are not correlated with bacterial populations during Pierce's disease. *Journal of Experimental Botany*, 58(15–16), 4037–4046.

Grimault, V., & Prior, P. (1993). Bacterial wilt resistance in tomato associated with tolerance of vascular tissues to *Pseudomonas solanacearum*. *Plant Pathology*, 42(4), 589–594.

Jansen, C., Von Wettstein, D., Schäfer, W., Kogel, K. H., Felk, A., & Maier, F. J. (2005). Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and trichodiene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(46), 16892–16897.

Jarosch, B., Kogel, K. H., & Schaffrath, U. (1999). The ambivalence of the barley Mlo locus: Mutations conferring resistance against powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) enhance susceptibility to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12(6), 508–514.

Kloek, A. P., Verbsky, M. L., Sharma, S. B., Schoelz, J. E., Vogel, J., Klessig, D. F., & Kunkel, B. N. (2001). Resistance to *Pseudomonas syringae* conferred by an *Arabidopsis thaliana* coronatine-insensitive (coi1) mutation occurs through two distinct mechanisms. *The Plant Journal*, 26(5), 509–522.

Kocal, N., Sonnewald, U., & Sonnewald, S. (2008). Cell wall-bound invertase limits sucrose export and is involved in symptom development and inhibition of photosynthesis during compatible interaction between tomato and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Plant Physiology*, 148(3), 1523–1536.

Kover, P. X., & Schaal, B. A. (2002). Genetic variation for disease resistance and tolerance among *Arabidopsis thaliana* accessions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(17), 11270–11274.

Kumar, J., Hückelhoven, R., Beckhove, U., Nagarajan, S., & Kogel, K. H. (2001). A compromised Mlo pathway affects the response of barley to the necrotrophic fungus *Bipolaris sorokiniana* (teleomorph: *Cochliobolus sativus*) and its toxins. *Phytopathology*, 91(2), 127–133.

Lund, S. T., Stall, R. E., & Klee, H. J. (1998). Ethylene regulates the susceptible response to pathogen infection in tomato. *The Plant Cell*, 10(3), 371–382.

Lyngkjær, M., Newton, A., Atzema, J., & Baker, S. (2000). The barley mlo-gene: an important powdery mildew resistance source. *Agronomie*, 20(7), 745–756.

Malyshkin, A. P. (2014). Chronic infections: causes and possible approach to treatment. *Research Journal of Infectious Diseases*, 2(1), 3.

McGarvey, J. A., Denny, T. P., & Schell, M. A. (1999). Spatial-temporal and quantitative analysis of growth and EPS I production by *Ralstonia solanacearum* in resistant and susceptible tomato cultivars. *Phytopathology*, 89(12), 1233–1239.

Norman, D. J., & Alvarez, A. M. (1994). Latent infections of *in vitro* anthurium caused by *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 39(1), 55–61.

O'Donnell, P. J., Jones, J. B., Antoine, F. R., Ciardi, J., & Klee, H. J. (2001). Ethylene-dependent salicylic acid regulates an expanded cell death response to a plant pathogen. *The Plant Journal*, 25(3), 315–323.

O'Donnell, P. J., Schmelz, E., Block, A., Miersch, O., Wasternack, C., Jones, J. B., & Klee, H. J. (2003). Multiple hormones act sequentially to mediate a susceptible tomato pathogen defense response. *Plant Physiology*, 133(3), 1181–1189.

Panstruga, R., & Dodds, P. N. (2009). Terrific protein traffic: the mystery of effector protein delivery by filamentous plant pathogens. *Science*, 324(5928), 748–750.

Pavan, S., Jacobsen, E., Visser, R. G., & Bai, Y. (2010). Loss of susceptibility as a novel breeding strategy for durable and broad-spectrum resistance. *Molecular Breeding*, 25(1), 1–12.

Reusche, M., Thole, K., Janz, D., Truskina, J., Rindfleisch, S., Drübert, C., ... & Teichmann, T. (2012). *Verticillium* infection triggers VASCULAR-RELATED NAC DOMAIN7-dependent *de novo* xylem formation and enhances drought tolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 24(9), 3823–3837.

Richael, C., Lincoln, J. E., Bostock, R. M., & Gilchrist, D. G. (2001). Caspase inhibitors reduce symptom development and limit bacterial proliferation in susceptible plant tissues. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 59(4), 213–221.

Swanson, J. K., Yao, J., Tans-Kersten, J., & Allen, C. (2005). Behavior of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 during latent and active infection of geranium. *Phytopathology*, 95(2), 136–143.

Trivedi, P., & Wang, N. (2014). Host immune responses accelerate pathogen evolution. *The ISME Journal*, 8(3), 727.

Van der Hoorn, R. A., De Wit, P. J., & Joosten, M. H. (2002). Balancing selection favors guarding resistance proteins. *Trends in Plant Science*, 7(2), 67–71.

Wichmann, G., Ritchie, D., Kousik, C. S., & Bergelson, J. (2005). Reduced genetic variation occurs among genes of the highly clonal plant pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*, including the effector gene *avrBs2*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(5), 2418–2432.

Wistrom, C., & Purcell, A. H. (2005). The fate of *Xylella fastidiosa* in vineyard weeds and other alternate hosts in California. *Plant Disease*, 89(9), 994–999.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Растительно-микробные патосистемы, традиционно воспринимаемые как «больные растения», в действительности представляют собой естественные, повсеместно распространенные в природе надорганизменные системы, в составе которых паразит и хозяин обычно мирно и даже взаимовыгодно уживаются друг с другом. Именно поэтому у фитопатологии как у науки есть не только прикладные задачи, направленные на «вылечивание больных растений», но и фундаментальные, связанные с выяснением особенностей устройства и функционирования живой материи.

Растения и фитопатогены в процессе коэволюции приобрели много «приспособлений», которые, с одной стороны, делают организмы «комплементарными» друг другу, позволяя им сосуществовать в виде интегрированной системы, и, с другой стороны, дают возможность одному партнеру контролировать «поведение» другого и удерживать его «в рамках приличия». В то же время и у растений, и у фитопатогенов появились и мощные орудия нападения, работа которых может приводить к гибели одного из организмов. Однако при разворачивании «военных действий» между паразитом и хозяином никто из них в итоге не оказывается победителем. Фитопатоген в случае гибели хозяина теряет экологическую нишу и источник питания, а растение в результате элиминации патогена может лишиться элемента естественной микрофлоры, который, хотя и потребляет ресурсы своего хозяина, в определенных условиях может приносить ему пользу, например повышать устойчивость к биотическим и абиотическим стрессорам. Помимо этого, патогены могут быть полезными для популяции хозяина в целом, даже если они являются причиной гибели ее части. Во-первых, патогены играют роль факторов естественного отбора и таким образом служат «двигателем» эволюционного развития хозяина. Во-вторых, паразиты могут препятствовать интродукции в экосистему конкурентных для хозяина видов растений. Следовательно, патоген и хозяин — это объекты, которые нужно рассматривать как взаимодополняющие элементы интегрированной надорганизменной системы.

Традиционно растительно-микробные патосистемы исследуются с позиции антагонизма макро- и микроорганизма, и на мирное сосуществование паразита и хозяина не обращается должного внимания. При этом для всех (или почти всех) фитопатогенных бактерий, способных вызывать тяжелые патологии у растений, описан такой сценарий взаимодействия с хозяином, при котором, несмотря на активное размножение паразита *in planta*, выраженные симптомы заболевания не развиваются и продуктивность растений не снижается, то есть макро- и микроорганизм взаимодействуют как мутуалисты. Для дикорастущих видов растений развитие патологий при колонизации паразитом является вообще редким исключением из правил. Это означает, что у любого агрессивного патогена и его растения-хозяина существуют такие программы взаимодействия, которые позволяют обоим партнерам совместно проходить стадии жизненного цикла, не нанося значительного вреда друг другу. Выяснение того, как регулируются такие программы и что служит причиной перехода патогенов к агрессивному «поведению», является важной научной задачей. Подступиться к ее решению помогают методы молекулярной биологии, стремительное развитие которых, в частности, привело к расшифровке нуклеотидных последовательностей геномов растений и фитопатогенов, обеспечило возможность клонирования генов и характеристики их продуктов, а также позволило проводить масштабное описание физиологических процессов с применением подходов транскриптомики, протеомики и метабомики. Все это увеличило эффективность выявления «молекулярных игроков», детерминирующих вирулентность бактерий и иммунитет растений, и расшифровки механизмов регуляции различных физиологических процессов, протекающих при формировании патосистем. Эти методы могут помочь ответить на вопрос и о том, что определяет мутуалистический и антагонистический сценарии взаимодействия патогенов и растений. Владение этой информацией позволит не только лучше понимать устройство надорганизменных систем, но и разрабатывать новые подходы к решению проблемы потери урожаев культурных растений в результате деятельности фитопатогенной микрофлоры.

На сегодняшний день контроль развития бактериозов растений базируется на «силовых подходах» в отношении фитопатогенов (применение пестицидов, создание устойчивых сортов растений и т. д.). Без применения этих подходов современное сельское хозяйство пока не представляется возможным, несмотря на то, что их эффективность далеко не всегда достаточна, а негативное влияние на окружающую среду бывает значительным. Поэтому существует необходимость в продумывании и испытании альтернативных/дополнительных способов предотвращения ущерба, наносимого фитопатогенной микрофлорой. Перспективным подходом представляется поддержание мутуалистической формы взаимодействия патогена и хозяина с помощью антропогенного контроля процесса взаимодействия макро- и микроорганизма.

Необходимо понимать, что уберечь растения от встречи с патогенами в рамках сельскохозяйственной практики невозможно, а генетически детерминированная устойчивость культур, сопряженная с индукцией мощного фитоиммунного ответа,

накладывает селективное давление на паразита и поэтому часто «преодолевается» им за несколько вегетационных сезонов. В то же время дикие виды растений нашли «общий язык» с фитопатогенной микрофлорой. Этому предшествовала длительная коэволюция паразитов и хозяев, которая привела к установлению «равновесия» между ними и формированию устойчивых надорганизменных систем. Человек, проводя селекцию растений, нарушает это равновесие, что трансформирует мутуалистическую форму взаимодействия паразитов и хозяев в антагонистическую и приводит к развитию выраженных патологических процессов у культурных растений. В связи с этим целесообразно проводить селекцию не просто растений, а надорганизменных систем, в которые, как и в случае природных патосистем, будут входить и фитопатогенные организмы, мирно сосуществующие со своими хозяевами.

Победить фитопатогенные микроорганизмы вряд ли под силу человеку. Поэтому необходимо попытаться «подружить» их с культурными растениями, сделав безопасными компонентами искусственных надорганизменных систем. Основным препятствием для этого является то, что на сегодняшний день даже бессимптомное взаимодействие растений с фитопатогенами представляет собой серьезную угрозу, поскольку человек не способен предотвращать переход латентной инфекции в острую фазу и даже надежно его прогнозировать. Однако разностороннее и глубокое исследование физиологических процессов, протекающих при формировании и развитии патосистем, может позволить нейтрализовать этот пробел и выявить те «ниточки», «подергав» за которые можно добиться стабильного взаимовыгодного сосуществования фитопатогенов и культурных растений в агрофитоценозах. Примерами такого мирного сосуществования паразитов и хозяев могут послужить надорганизменные системы, широко представленные в дикой природе.

Созданная к настоящему моменту «молекулярная картина» взаимодействия фитопатогенов и растений уже поражает своей красотой, логичностью и замысловатостью. Но в то же время эта картина дает возможность отчетливо понять, что познанное — это лишь увертюра к основному сюжету и у исследователей совместной жизни растений и фитопатогенов впереди еще много нераскрытых тайн и сюрпризов...

Горшков Владимир Юрьевич

БАКТЕРИОЗЫ РАСТЕНИЙ:
молекулярные основы формирования
растительно-микробных патосистем

gvy84@mail.ru

Подписано в печать 10.12.2017. Формат 70×100/16
Печать офсетная. Усл.-печ. л. 24,7
Тираж 500 экз. Заказ № XXXX

Издательство Сергея Бузукина
420111, г. Казань, ул. Профсоюзная, 10
isb-kazan.ru

Отпечатано в полном соответствии с качеством предоставленного
электронного оригинал-макета в типографии ООО «Интер-Графика»
420021, г. Казань, ул. Салимжанова, 9а

