

КАЗАНСКИЙ ИНСТИТУТ БИОХИМИИ И БИОФИЗИКИ –  
ОБОСОБЛЕННОЕ СТРУКТУРНОЕ ПОДРАЗДЕЛЕНИЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ЦЕНТРА «КАЗАНСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

---

На правах рукописи

Исламов Бахтияр Рамилевич

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

1.5.21 – «Физиология и биохимия растений»

1.5.11 – «Микробиология»

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

Кандидат биологических наук В.Ю. Горшков

Казань – 2021

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ОГЛАВЛЕНИЕ</b>	2
<b>СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ</b>	5
<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	7
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b>	13
1.1. Мягкие гнили растений, вызываемые бактериями рода <i>Pectobacterium</i>	13
1.1.1. Симптоматика взаимодействия растений и бактерий рода <i>Pectobacterium</i>	13
1.1.2. Факторы вирулентности бактерий рода <i>Pectobacterium</i>	16
1.1.3. Физиологические основы устойчивости и восприимчивости растений к бактериям рода <i>Pectobacterium</i>	22
1.1.4. Стратегия колонизации растений бактериями рода <i>Pectobacterium</i>	27
1.2. Экзополисахариды (ЭПС) бактерий	34
1.2.1. Структура ЭПС бактерий	34
1.2.2. Биосинтез ЭПС	38
1.2.3. Регуляция продукции ЭПС	42
1.2.4. Функции ЭПС бактерий	45
1.2.4.1. Структурные функции ЭПС	45
1.2.4.2. Защитные функции ЭПС	47
1.2.4.3. Фитоиммунные свойства ЭПС	49
1.3. Постановка цели исследования	52
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b>	54
2.1. Культивирование <i>Pectobacterium atrosepticum</i>	54
2.2. Выделение ЭПС и внутриклеточных полисахаридов из супернатантов культур и из клеток <i>P. atrosepticum</i>	55
2.3. Анализ полисахаридов с помощью гель-проникающей хроматографии	56

2.4. Определение моносахаридного состава полисахаридов	57
2.5. Анализ содержания 3-дезоксид-D-манно-2-октулозоновой кислоты (КДО)	58
2.6. Анализ структуры с помощью ЯМР спектроскопии	59
2.7. Получение поликлональных антител	59
2.8. Культивирование растений и их инфицирование	60
2.9. Иммунодетекция ЭПС	62
2.10. Выделение полисахаридов буфер-экстрагируемой фракции из неинфицированных и инфицированных <i>P. atrosepticum</i> растений картофеля	64
2.11. Измерение реологических свойств водных растворов ЭПС <i>P. atrosepticum</i>	65
2.12. Определение гидродинамического радиуса частиц ЭПС <i>P. atrosepticum</i>	65
2.13. Анализ антиоксидантных свойств ЭПС <i>P. atrosepticum</i>	66
2.14. Анализ фитоиммунных свойств ЭПС <i>P. atrosepticum</i>	68
2.15. Статистическая обработка данных	70
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ</b>	71
3.1 Идентификация, выделение и первичная характеристика экзополисахаридов (ЭПС) <i>Pectobacterium atrosepticum</i>	71
3.2. Расшифровка структуры регулярного звена ЭПС <i>P. atrosepticum</i>	83
3.3. Иммунодетекция ЭПС <i>P. atrosepticum</i> в сосудах ксилемы инфицированных растений	89
3.4. Определение вязкости растворов ЭПС <i>P. atrosepticum</i>	97
3.5. Оценка способности ЭПС <i>P. atrosepticum</i> к формированию супрамолекулярных агрегатов	101
3.6. Анализ антиоксидантных свойств ЭПС <i>P. atrosepticum</i>	104
3.7. Анализ фитоиммунных свойств ЭПС <i>P. atrosepticum</i>	108
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b>	113

<b>ВЫВОДЫ</b>	116
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ</b>	117



## СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- АВ – безуглеродная среда
- АФК – активные формы кислорода
- БСА – бычий сывороточный альбумин
- ГТ – гликозил-трансфераза
- Д5 – синтетическая среда
- ди-ГМФ – дигуанозинмонофосфат
- ЖК – жасмоновая кислота
- КДГ – 2-кето-3-дезоксиглюконат
- КДО – 3-дезоксид-манно-2-октулозоновая кислота
- КОЕ – колониеобразующая единица
- КПС – капсульный полисахарид
- ЛПС – липополисахарид
- НДФ-сахара – нуклеотид-дифосфат сахара
- ОПС – *O*-полисахарид
- ПАМП – патоген-ассоциированный молекулярный паттерн
- ПКС – программируемая клеточная смерть
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- РГ- I – рамногалактуронан I
- СК – салициловая кислота
- ССТТ – система секреции третьего типа
- ФСБ – фосфатно-солевой буфер
- ц-ди-ГМФ – циклический дигуанозин монофосфат
- ЭПС – экзополисахарид
- ЯМР – ядерный магнитный резонанс
- Ara – арабиноза
- DAMP – damage-associated molecular pattern
- DSF – diffusible signal factor
- Erw – эрвиниоза
- Fru – фруктоза

Gal – галактоза  
GalA – галактуроновая кислота  
Glc – глюкоза  
GlcA – глюкуроновая кислота  
LB – среда Lysogeny broth  
Man – манноза  
ManA – маннуриновая кислота  
MS – среда Murashige–Skoog  
PRR – pattern-recognition receptor  
Rha – рамноза  
Rsm – Regulator secondary metabolite  
SDS – додецилсульфат натрия  
Xyl – ксилоза

## ВВЕДЕНИЕ

**Постановка проблемы и ее актуальность.** Необходимым условием развития ряда инфекционных заболеваний растений, вызываемых фитопатогенными бактериями, является способность микроорганизмов формировать *in planta* «многоклеточные» структуры, называемые биопленками (Ramey *et al.*, 2004; Srivastava *et al.*, 2017). Основную часть матрикса биопленок, объединяющего отдельные клетки микроорганизма в единую структуру, составляют экстраклеточные полисахариды бактерий (экзополисахариды или ЭПС) (Wilkinson, 1958; Flemming *et al.*, 2010; Ghafoor *et al.*, 2011). Помимо выполнения структурных функций в составе матрикса биопленок, ЭПС могут выступать в качестве иммуномодуляторов (элиситоров) или иммуносупрессоров, а также защищать клетки микроорганизмов от различных неблагоприятных факторов, например, от обезвоживания, действия тяжелых металлов, окислителей, фитоалексинов, поллютантов и антибиотиков (Rolfe *et al.*, 1996; Yun *et al.*, 2006; Aslam *et al.*, 2008; Nwodo *et al.*, 2012; Kakkar *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2019; Zainab *et al.*, 2020). На примере ряда фитопатогенных бактерий продемонстрировано, что ЭПС служат в качестве факторов вирулентности (Rudolph *et al.*, 1994; Condemine *et al.*, 1999; Vuong *et al.*, 2004).

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

микроорганизма объединены в целостную структуру при помощи экстраклеточного матрикса (Gorshkov *et al.*, 2014).

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

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

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

1. Выделить ЭПС *P. atrosepticum* и расшифровать структуру их регулярного звена.

2. Оценить наличие ЭПС *P. atrosepticum* в составе матрикса бактериальных эмболов, образующихся в сосудах первичной ксилемы растений, инфицированных этим фитопатогеном.

3. Определить способность ЭПС *P. atrosepticum* влиять на реологические свойства водных растворов и формировать надмолекулярные агрегаты.

4. Проверить возможность участия ЭПС *P. atrosepticum* в детоксикации активных форм кислорода.

5. Оценить влияние ЭПС *P. atrosepticum* на фитоиммунные реакции растений.

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

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

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

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

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

**Связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследования.** Работа проводилась с 2014 по 2021 гг. в

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

**Положения, выносимые на защиту:**

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

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

3. ЭПС *P. atrosepticum* являются многофункциональными полимерами, которые обеспечивают структурную целостность бактериальных эмболов,

защищают клетки бактерий от действия окислителей и подавляют фитоиммунные ответы растений-хозяев.

**Апробация работы.** Результаты диссертационной работы представлены на XVIII конгрессе IS-MPMI 2019 (International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions, Великобритания, Глазго, 2019), 8-м конгрессе FEMS 2019 (Federation of European Microbiological Societies, Великобритания, Глазго, 2019); на 9-ой Всероссийской конференции молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой» (Россия, Саратов, 2019); на 4-м и 5-м Российском симпозиуме с международным участием «Фитоиммунитет и клеточная сигнализация у растений» (Казань, 2016; 2021); на V международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика» (Крым, Ялта, 2017); на 2-ой, 3-ей, 5-ой Всероссийской конференции «Фундаментальная гликобиология» (Саратов, 2014, Владивосток, 2016, Гатчина, 2021); на IX Съезде общества физиологов растений России «Физиология растений – основа создания растений будущего» (Казань, Россия, 2019); а также на итоговых конференциях КИББ ФИЦ КазНЦ РАН (Казань, 2018, 2019, 2020, 2021). По результатам работы опубликованы две статьи в зарубежных рецензируемых изданиях.



## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Мягкие гнили растений, вызываемые бактериями рода

#### *Pectobacterium*

Мягкие гнили растений – распространенное заболевание, приводящее к потере до половины урожая картофеля и овощных культур (Bhat *et al.*, 2010; Czajkowski *et al.*, 2011; Marquez-Villavicencio *et al.*, 2011). Возбудители этого заболевания – бактерии родов *Pectobacterium* (пектобактерии) и *Dickeya* (дикейи) отнесены к одним из наиболее вредоносных фитопатогенов (Mansfield *et al.*, 2012). Ранее представителей *Pectobacterium* и *Dickeya* (и ряда других родов фитопатогенных бактерий) относили к одному роду *Erwinia*. Однако с развитием методов филогенетического анализа, а затем и геномного секвенирования, пектобактерии и дикейи выделили в отдельную группу «Soft-rot *Enterobacteriaceae*», которую позже переименовали в «Soft-rot *Pectobacteriaceae*» (Van Gijsegem *et al.*, 2021).

#### 1.1.1. Симптоматика взаимодействия растений и бактерий рода

##### *Pectobacterium*

Пектобактерии и дикейи являются типичными пектолитическими бактериями, которые вызывают разложение полимеров (в основном пектинов) клеточной стенки растений, в первую очередь, срединной пластики. Это приводит к мацерации тканей и формированию симптомов мягких гнилей в различных органах растений-хозяев (Рис. 1). Мягкие гнили могут развиваться не только на растущих растениях, но и на продуктах растениеводства (плоды, овощи, клубнеплоды, корнеплоды) при хранении (Bhat *et al.*, 2010). Некоторые виды рода *Pectobacterium* вызывают симптомы черной ножки картофеля (Рис. 1). Это заболевание выражается гниением основания стебля.

Помимо мягких гнилей и черной ножки пектобактерии/дикейи также могут вызывать симптомы увядания. Считается, что увядание предшествует развитию гнилей и является обратимой стадией инфекции: то есть после

проявления симптомов увядания инфицированное растение еще может восстановиться и не иметь каких-либо патологий (Ansermet *et al.*, 2016). Индукция гнилостных процессов, наоборот, как правило, рассматривается как необратимая стадия инфекции, которая в итоге приводит к гибели хозяина или к его сильному поражению (Larwood, Harris, 1982; Helias *et al.*, 2000; Perombelon, 2002).

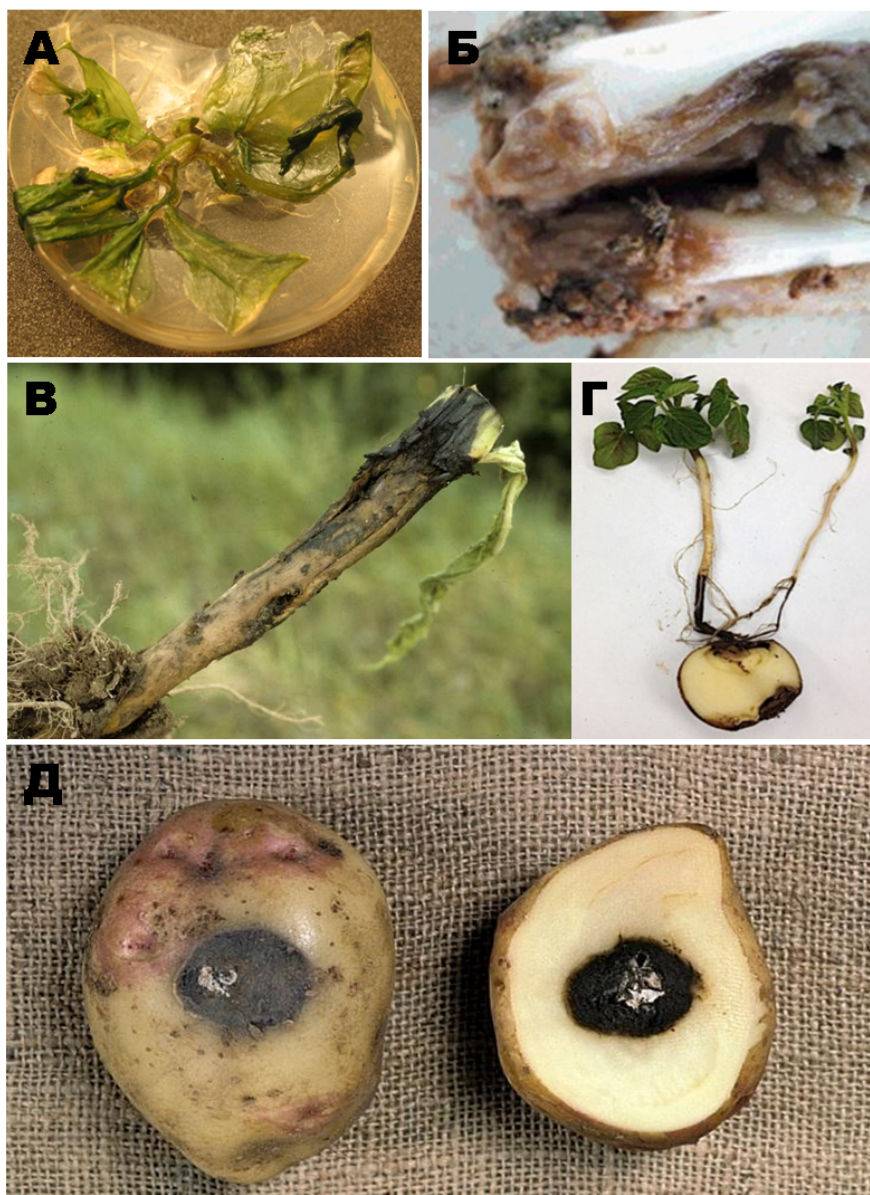


Рис. 1. Симптомы заболеваний, вызываемых представителями рода *Pectobacterium*. А – мягкая гниль растений табака (Gorshkov *et al.*, 2014); Б – мягкая гниль растений *Zantedeschia sp.* (Luzzatto *et al.*, 2007); В, Г – черная ножка картофеля (<http://ephytia.inra.fr/en/D/4480>; Mahdis *et al.*, 2020); Д – мягкая гниль клубней картофеля (Афонин и др., 2008).

Несмотря на то, что пектобактерии воспринимаются как высоковредоносные фитопатогены, вызывающие гнилостные процессы, взаимодействие этих бактерий с растениями-хозяевами гораздо чаще проходит бессимптомно, нежели с развитием патологий (Hayward, 1974; Perombelon, Kelman, 1980; Perombelon, 2002; Toth, Birch, 2005; Charkowski, 2007). Из клубней, контаминированных пектобактериями/дикейями, могут прорасти визуально здоровые растения без каких-либо признаков заболевания (Webb, Wood, 1974; Perombelon, Lowe, 1975; Perombelon, 2002; Charkowski, 2007). Во многих случаях даже искусственная инокуляция растений этими фитопатогенами не приводит к развитию патологического процесса (Perombelon, 2002; Marquez-Villavicencio *et al.*, 2011).

Бессимптомное взаимодействие пектобактерий/дикей с растениями обычно связывают с неоптимальными для развития типичных инфекций погодными условиями (низкая влажность, неоптимальная температура и т.д.) (Perombelon, Kelman, 1980; Czajkowski *et al.*, 2011). Однако даже в условиях благоприятствующих инфекционному процессу, большая часть инфицированных пектобактериями растений остается без признаков заболевания (Perombelon, 2002; Marquez-Villavicencio *et al.*, 2011). Даже в тех случаях, когда развивается типичная (сопряженная с развитием характерных симптомов) инфекция, как правило, симптомы проявляются лишь на некоторых побегах, а большая часть побегов остается внешне здоровыми, хотя и контаминированными патогеном (Perombelon, 2002). С дикорастущими растениями пектобактерии/дикей особенно часто взаимодействуют бессимптомно (Tsror *et al.*, 2010; Fikowicz-Krosko, Czajkowski, 2018).

Важно, что вертикальная трансмиссия фитопатогена (передача от одного поколения (вегетативного) хозяина другому) может происходить даже в тех случаях, когда симптомы заболевания не проявляются, то есть на внешне здоровых растениях могут формироваться клубни, контаминированные этими микроорганизмами (Perombelon, 1974;

Perombelon, Kelman, 1980). Более того, вертикальная трансмиссия пектобактерий/дикей не была бы возможна без бессимптомной инфекции. Если бы контаминированный клубень или молодое растение быстро погибали из-за агрессивного «поведения» паразита, новое поколение хозяина не появлялось бы, и патоген лишал бы себя экологической ниши. Поэтому развитие мягких гнилей, вызываемых пектобактериями/дикейми, редко проявляется на ювенильных растениях, а в основном приурочено к более поздним этапам онтогенетического развития растения-хозяина (Webb, Wood, 1974; Perombelon, Lowe, 1975; Perombelon, 2002; Charkowski, 2007). Интересно, что если удалить исходно контаминированный материнский клубень до того как на прорастающем из него материнском растении сформируются столоны, новое поколение растения-хозяина окажется свободным от патогена, то есть вертикальная трансмиссия не осуществится (Perombelon, 1974; Perombelon, Kelman, 1980).

### **1.1.2. Факторы вирулентности бактерий рода *Pectobacterium***

Пектобактерии и дикейи относятся к патогенам, использующим «грубую силу» («brute force») для колонизации растений-хозяев (Charkowski *et al.*, 2012). Такая «сила» заключается в интенсивной продукции экстраклеточных ферментов, разрушающих полисахариды и белки растительной клеточной стенки: пектатлиазы, пектинлиазы, полигалактуроназы, целлюлазы, пектинметилэстеразы, протеазы. Деполимеразы углеводов пектобактерий и дикей транспортируются во внешнюю среду (в том числе в апопласт) в два этапа. Вначале ферменты транслоцируются в периплазматическое пространство с помощью систем Tat и Sec, а затем переносятся во внешнюю среду через систему секреции второго типа (Corbett *et al.*, 2005). Помимо деполимераз углеводов через систему секреции второго типа также транспортируется ряд других факторов вирулентности пектобактерий, а именно белки Nip и Svx. Мутанты по генам этих белков имеют сниженную вирулентность, а белок Nip индуцирует

развитие некроза растительных клеток (Mattinen *et al.*, 2004; Corbett *et al.*, 2005; Pemberton *et al.*, 2005; Coulthurst *et al.*, 2008). Однако механизмы действия белков Nip и Svx пока не расшифрованы. Экстраклеточные протеазы транспортируются из клеток пектобактерий в окружающую среду непосредственно из цитоплазмы при помощи системы секреции первого типа (Fuente *et al.*, 2007).

Помимо систем секреции первого и второго типов, у пектобактерий также есть системы секреции третьего, четвертого, пятого и шестого типов (Bell *et al.*, 2004). Система секреции третьего типа (ССТТ) и секретлируемые через нее эффекторные белки и харпины хорошо охарактеризованы у фитопатогенов родов *Xanthomonas* и *Pseudomonas*, для которых характерно более «деликатное поведение» *in planta* по сравнению с «поведением» пектолитических бактерий (Alfano, Collmer, 2004). ССТТ представляет собой пиль (канал), пронизывающий и бактериальную, и растительную клетки. Благодаря этому эффекторные белки могут доставляться из клеток бактерий непосредственно в цитоплазму клетки хозяина. Харпины, также транспортируемые через ССТТ, высвобождаются в апопласт, а в протопласт клетки хозяина не попадают (Buttner, Vonas, 2002). Функции эффекторных белков разноплановые. С одной стороны, они могут блокировать фитоиммунные ответы (Siameer, 2014) и/или служить индукторами так называемых восприимчивых ответов (Gorshkov, Tsers, 2021) – то есть реакций, активация которых не увеличивает, а, наоборот, снижает, устойчивость растений к паразиту. С другой стороны, эффекторные белки и харпины могут индуцировать фитоиммунитет, играя роль специфичных экзогенных элиситоров (Bauer *et al.*, 1995; Ger, *et al.*, 2014).

У пектобактерий ССТТ изучена меньше, чем у ксантомонад и псевдомонад. У пектобактерий обнаружен лишь небольшой набор белков, транспортируемых через эту систему. Тем не менее, мутантные штаммы пектобактерий по генам белков ССТТ имеют сниженную вирулентность по сравнению с диким типом (Ageichik *et al.*, 2002; Holeva *et al.*, 2004). Один из

эффекторных белков ССТТ пектобактерий – DspE (disease-specific protein E) – индуцирует программируемую клеточную смерть у растений-хозяев и подавляет развитие иммунных ответов (Siameg *et al.*, 2014). Роль системы секреции четвертого типа (которая у *Agrobacterium tumefaciens* обеспечивает перенос тДНК в клетку хозяина) в вирулентности пектобактерий остается пока не выясненной.

Система секреции пятого типа обеспечивает транспортировку адгезинов, необходимых для прикрепления бактерий к клеткам растения-хозяина. Для дикей показано, что мутанты по генам белков пятой системы секреции хуже прикрепляются к тканям растений (Rojas *et al.*, 2002). Система секреции шестого типа изначально была охарактеризована как инструмент межвидовой конкуренции бактерий. Через эту систему транспортируются эффекторный белки, токсичные для бактерий другого вида (Basler, Mekalanos, 2012; Но *et al.*, 2017). Однако для шестой секреторной системы было также продемонстрировано участие в растительно-микробных взаимодействиях. Штаммы пектобактерий, сверхэкспрессирующие гены белков системы секреции шестого типа, характеризовались повышенной вирулентностью, а мутантные формы, дефектные по генам белков этой системы, имели сниженную вирулентность по сравнению с диким типом (Mattinen *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2008).

Фактором вирулентности пектобактерий также является коронафацевая кислота, которая служит в качестве функционального аналога жасмонатов. Мутанты по генам ферментов биосинтеза коронафацевой кислоты имеют сниженную по сравнению с диким типом вирулентность и вызывают преимущественно латентные инфекции (Bell *et al.*, 2004; Gorshkov *et al.*, 2018, 2021a). С помощью коронафацевой кислоты пектобактерии активируют жасмонат-опосредуемые фитоиммунные ответы, которые, во-первых, не являются эффективными для подавления развития этих микроорганизмов *in planta*, и, во-вторых, служат антагонистами салицилат-опосредуемых фитоиммунных ответов, которые полностью

блокируют размножение пектобактерий в организме растения-хозяина. Таким образом, эти микроорганизмы с помощью коронафациевой кислоты применяют обманную тактику в отношении растения-хозяина и способствуют «дезориентации» фитоиммунных систем (Gorshkov *et al.*, 2018).

К условно полезным факторам вирулентности пектобактерий недавно был также отнесен сидерофор энтеробактин (Gorshkov *et al.*, 2021b). Сидерофоры – это низкомолекулярные соединения, которые секретируются из клеток бактерий в окружающую среду (в том числе в ткани растений-хозяев); затем сидерофоры, благодаря высокой аффинности к железу, связывают его и транспортируются назад в клетку. Таким образом, сидерофоры служат в качестве «челноков», которые обеспечивают поддержание необходимого уровня железа в микробных клетках (Holden, Vachman, 2015; Краемер *et al.*, 2019). Для пектобактерий неспособность синтезировать сидерофор энтеробактин не сказывалась на вирулентности в условиях, максимально способствующих развитию типичной (симптоматичной) инфекции. Однако в отношении «праймированных» растений (у которых была проведена предынфекционная активация иммунитета с помощью салициловой кислоты) вирулентность энтеробактин-дефицитного мутанта была значительно ниже, чем у дикого типа (Gorshkov *et al.*, 2021b).

Дикейи, в отличие от пектобактерий, не синтезируют энтеробактин, но производят два других сидерофора – ахромобактин и хризобактин, оба из которых необходимы для индукции патологических процессов у растений-хозяев. Мутанты дикейи, не синтезирующие либо ахромобактин, либо хризобактин имеют сниженную вирулентность (Enard *et al.*, 1988; Franza *et al.*, 2005). Помимо участия в транспорте железа, для хризобактина были также продемонстрированы сигнальные свойства в отношении растений. Этот сидерофор воспринимается растительными клетками как сигнал дефицита железа, в результате чего в растении активируются системы

ассимиляции этого элемента из окружающей среды. Это приводит к увеличению содержания железа в инфицированных тканях, что повышает восприимчивость растений и вирулентность патогена (Dellagi *et al.*, 2005; Segond *et al.*, 2009; Kieu *et al.*, 2012).

Производство перечисленных выше факторов вирулентности не является конститутивной, а индуцируется/репрессируется разными сенсорно-регуляторными системами. Регуляция синтеза факторов вирулентности, во-первых, позволяет экономить энергетические ресурсы клеток, а во-вторых, препятствует преждевременному образованию эндогенных элиситоров (продуктов распада полимеров растений) и, следовательно, индукции фитоиммунных ответов (Maе *et al.*, 2001).

Система кворум сенсинга (quorum sensing) дает возможность бактериям регулировать продукцию факторов вирулентности в зависимости от плотности популяции (Barnard, Salmond, 2007; Crépin *et al.*, 2012). 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 (Горшков, 2017). Основными компонентами системы кворума являются синтазы аутоиндукторов и их сенсоры, которые регулируют экспрессию кворум-зависимых генов, в том числе, кодирующих многие факторы вирулентности. Когда плотность популяции увеличивается до определенного значения, аутоиндукторы накапливаются в бактериальном микроокружении до пороговой концентрации. Накопление аутоиндукторов приводит к их взаимодействию с соответствующими сенсорами, что обеспечивает индукцию экспрессии большого набора кворум-зависимых генов, в том числе и гена синтазы аутоиндукторов. Вследствие этого происходит дальнейшее лавинообразное накопление аутоиндукторов до еще больших концентраций, что и формирует положительную обратную связь в регуляции кворум сенсинга (Whitehead *et al.*, 2001). У пектобактерий «инактивация» системы кворум сенсинга



репрессировать продукцию многих факторов вирулентности, что приводит к неспособности мутантных форм микроорганизмов вызывать симптомы заболеваний у растений-хозяев (Pirhonen *et al.*, 1993; Burr *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2008).

У пектобактерий также есть система, обеспечивающая регуляцию синтеза факторов вирулентности на посттранскрипционном уровне – **Regulator secondary metabolite**, Rsm (регуляции синтеза вторичных метаболитов). В состав этой регуляторной системы входит два основных компонента: РНК-связывающий белок RsmA и нетранслируемая РНК *rsmB*. RsmA, связываясь с мРНК генов вирулентности, блокирует их трансляцию, а также способствует разрушению транскриптов. Некодирующая РНК *rsmB* нейтрализует действие RsmA за счет связывания с этим белком. Таким образом, изменение баланса RsmA/*rsmB* определяет уровень продукции факторов вирулентности (Cui *et al.*, 1995; Chatterjee *et al.*, 1995; Mukherjee *et al.*, 1996).

Поскольку продукция факторов вирулентности необходима только при колонизации растений, но не в ходе этапов жизненного цикла, протекающих вне хозяина, синтез детерминант патогенности находится под контролем регуляторных систем, воспринимающих метаболиты растений. Для пектобактерий наиболее известным сенсором растительных метаболитов является репрессор транскрипции генов вирулентности KdgR. Этот белок взаимодействует с промоторными областями генов вирулентности и блокирует их экспрессию. Однако при связывании с 2-кето-3-дезоксиглюконатом (КДГ) – продуктом катаболизма пектиновых веществ – KdgR перестает взаимодействовать с промоторами целевых генов, в результате чего уровень их транскрипции повышается (Liu *et al.*, 1999; Kazemi-Pour *et al.*, 2004).

### 1.1.3. Физиологические основы устойчивости и восприимчивости растений к бактериям рода *Pectobacterium*

При взаимодействии с пектобактериями/дикейями в растениях индуцируется широкий набор ответных реакций, многие из которых сказываются на особенностях формирования растительно-микробной патосистемы. Очень часто реакции растения, индуцируемые при патогенезе, рассматриваются как элемент иммунного ответа, который направлен на подавление развития паразитического микроорганизма *in planta*. Однако многие реакции растений, индуцируемые при взаимодействии с патогеном, представляют собой так называемые реакции восприимчивости или восприимчивые ответы, которые не повышают, а, наоборот, снижают уровень устойчивости растения к паразиту (Gorshkov, Tsers, 2021). Индукция реакций восприимчивости – это обязательное условия развития патологического процесса при взаимодействии растения с патогеном.

В ходе взаимодействия растений с пектобактериями/дикейями меняется гормональный статус растений, повышается уровень активных форм кислорода (АФК), запускается программируемая клеточная смерть (ПКС), меняется профиль вторичных метаболитов, индуцируются реакции растений, связанные с модификацией растительной клеточной стенки. Причем все эти реакции могут приводить к разным последствиям для растительно-микробного взаимодействия и детерминировать как устойчивость, так и восприимчивость хозяина.

Одно из наиболее ярко выраженных изменений, происходящих в инфицированных пектобактериями/дикейями растениях, – это индукция жасмонат-регулируемых ответов (Montesano *et al.*, 2005; Luzzatto-Knaan *et al.*, 2014; Expert *et al.*, 2018; Gorshkov *et al.*, 2018; 2021a). Несмотря на то, что жасмонат-регулируемые реакции считаются компонентами иммунного ответа (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011), их активация при взаимодействии пектобактерий и растений не препятствует развитию симптомов заболевания (Gorshkov *et al.*, 2018; 2021a).

В то же время, реакции, индуцируемые салициловой кислотой (СК) – либо не активируются, либо подавляются при взаимодействии растений с пектобактериями. Более того, среди экстраклеточных метаболитов *P. carotovorum* были обнаружены такие, которые репрессируют СК-регулируемые ответы растений (Vidal *et al.*, 1997). Кроме того, поскольку жасмонат- и СК-регулируемые ответы являются антагонистами и подавляют друг друга (Thaler *et al.*, 2002; Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011), логично предположить, что индукция первых приводит к репрессии вторых. Подавление СК-регулируемых ответов (или отсутствие их индукции) является критичным для развития симптомов заболеваний, вызываемых пектобактериями и дикейями (Palva *et al.*, 1994; Burra *et al.*, 2015; Czajkowski *et al.*, 2015). Пектобактерии, а также дикейи очень чувствительны к СК и к СК-регулируемым ответам растений. Помимо бактерицидных свойств в отношении пектобактерий, СК в малых (субингибирующих) концентрациях служит в качестве блокатора системы кворум сенсинга, а значит и продукции большинства факторов вирулентности (Joshi *et al.*, 2016a, b). Таким образом, индукцию жасмонат-регулируемых ответов можно классифицировать как реакцию восприимчивости растений к пектобактериям; и эта реакция, по крайней мере, отчасти, направлена на подавление СК-индуцируемых ответных реакций.

Гормональные преобразования при взаимодействии растений с пектобактериями/дикейями связаны не только с жасмонатами и СК, но и абсцизовой кислотой (АБК) и ауксином. Уровень АБК при развитии мягких гнилей, вызываемых дикейями, повышается (Van Gijsegem *et al.*, 2017). Сверхпродукция АБК приводит к увеличению восприимчивости растений, а подавление синтеза АБК повышает устойчивость растений к пектобактериям/дикейям (Kariola *et al.*, 2006; Asselbergh *et al.*, 2008; Plessis *et al.*, 2011; Aalto *et al.*, 2012; Van Gijsegem *et al.*, 2017). Кроме того, экзогенная обработка растений АБК увеличивает восприимчивость растений к этим фитопатогенам (Asselbergh *et al.*, 2008; Survila *et al.*, 2016). По всей

видимости, АБК негативно влияет на устойчивости растений к пектолитическим бактериям из-за того, что этот фитогормон индуцирует защитные реакции на абиотические стресс-факторы в ущерб фитоиммунным ответам (de Torres Zabala *et al.*, 2007; Robert-Seilaniantz *et al.*, 2007; Bari, Jones, 2009). Таким образом, повышение уровня АБК и активацию АБК-регулируемых ответов в инфицированных пектобактериями/дикейями растениях можно рассматривать как восприимчивый ответ, направленный на подавление систем фитоиммунитета.

Ауксин тоже можно отнести к фитогормонам, определяющим восприимчивость растений к пектобактериям/дикейям. *P. carotovorum* способствует повышению уровня этого фитогормона во мхе *Physcomitrium patens* (ранее *Physcomitrella patens*) (Alvarez *et al.*, 2016), а мутанты растений, имеющие повышенную чувствительность к ауксину, более восприимчивы к этому патогену (Lee *et al.*, 2009; Piisila *et al.*, 2015). Кроме того, дикейи сами способны синтезировать ауксин, который, по-видимому, необходим для «дезориентации» гормональных систем растения-хозяина (Yang *et al.*, 2007).

Преобразование растительной клеточной стенки при патогенезе обычно связывают с «фортификацией» этого компартмента с целью препятствия распространения патогена (Du *et al.*, 2015). Однако на примере ряда растительно-микробных патосистем было продемонстрировано, что модификация клеточной стенки «силами» (то есть ферментами и белками) растения может, наоборот, способствовать системной колонизации растений микроорганизмами и/или приводить к развитию патологических процессов (Gorshkov, Tsers, 2021). Так, например, *P. atrosepticum* индуцирует высвобождение одного из типов пектиновых полисахаридов – рамногалактуронана I (РГ-I) – из растительных клеточных стенок в полости сосудов первичной ксилемы. В сосудах фрагменты этого полисахарида используются бактериями в качестве компонента первичного внеклеточного матрикса, необходимого для формирования бактериальных эмболов – особых

«многоклеточных» биопленко-подобных структур, образуемых клетками пектобактерий (Gorshkov *et al.*, 2016).

Высвобождение фрагментов РГ-I из клеточных стенок невозможно объяснить непосредственным действием бактериальных ферментов, поскольку эта реакция осуществляется в сосудах еще до того, как в них проникают бактериальные клетки (Gorshkov *et al.*, 2016). Кроме того, на начальных этапах колонизации сосудов экспрессия бактериальных генов, кодирующих ферменты катаболизма РГ-I, подавлена (Gorshkov *et al.*, 2018); при этом уровень экспрессии растительных генов, кодирующих рамногалактуронанлиазы, индуцируется на несколько порядков величин (Tsers *et al.*, 2020). В дополнение к этому, на начальных этапах взаимодействия пектобактерий и растений активируется экспрессия растительных генов, кодирующих экспансины и ксилоглюканэндотрансгликозилазы/гидролазы (ХЕТ), – то есть белки/ферменты, обеспечивающие разрыхление целлюлозного каркаса клеточной стенки, которое может способствовать высвобождению фрагментов РГ-I (Tsers *et al.*, 2020). Таким образом, высвобождение фрагментов РГ-I в полость сосудов осуществляется за счет патоген-индуцируемой реакции восприимчивости, и эти фрагменты формируют первичный матрикс бактериальных эмболов. Однако по мере развития бактериальных эмболов первичный матрикс из фрагментов РГ-I постепенно разрушается, и какие полимеры в составе матрикса обеспечивают структурную целостность бактериальных эмболов, до наших исследований оставалось невыясненным.

Типичной реакцией растений на патогенный организм, в том числе на инвазию пектобактерий, является увеличение уровня АФК. АФК традиционно рассматривают как неотъемлемый компонент иммунного ответа, поскольку они, во-первых, могут обладать прямым антимикробным действием, и, во-вторых, способствовать сшивке полимеров клеточной стенки, что препятствует разрушению этого компартмента из-за действия

ферментов микроорганизмов. Кроме того, АФК опосредуют ПКС, которая обеспечивает формирование «мертвой зоны» вокруг клеток патогена, что приводит к их элиминации (Pontier *et al.*, 1998; Bolwell *et al.*, 2002; Torres *et al.*, 2006; Zurbriggen *et al.*, 2010; Lai *et al.*, 2011).

АФК и ПКС, с одной стороны, могут обеспечивать защиту от пектобактерий/дикей. Показано, например, что нокаут гена, кодирующего субъединицу НАДФН-оксидазы (один из основных АФК-производящих ферментов), приводит к увеличению восприимчивости растений к *D. dadantii* (Fragard *et al.*, 2007; Expert *et al.*, 2018). Инактивация гена *bos1*, продукт которого является негативным регулятором ПКС, приводит к сильному окислительному взрыву после инвазии *D. dadantii*, в результате которого образуется «мертвая зона», которая препятствует развитию мягкой гнили (Краерпел *et al.*, 2011). Сверхэкспрессия гена ферредоксин-подобного белка приводит к индукции реакции гиперчувствительности после инвазии *P. carotovorum* и обеспечивает устойчивость к этому патогену (Ger *et al.*, 2014).

С другой стороны, АФК и ПКС являются необходимым условием для развития мягких гнилей, вызываемых пектобактериями/дикейями. Эти фитопатогены могут целенаправленно индуцировать ПКС клеток растения-хозяина с помощью специальных факторов вирулентности, и лишение микроорганизмов способности синтезировать эти факторы вирулентности негативно отражается на вирулентности бактерий (Bauer *et al.*, 1995; Mattinen *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2011; Davidsson *et al.*, 2013; Hogan *et al.*, 2013). Это означает, что для развития мягких гнилей требуется индукция ПКС и накопление АФК. С этим согласуется то, что АФК, продуцируемые растениями, не оказывали прямого антимикробного эффекта на *D. dadantii* (Miguel *et al.*, 2000). Кроме того, при формировании клетками *P. atrosepticum* бактериальных эмболов в сосудах первичной ксилемы происходит интенсивное накопление АФК; при этом повреждения бактериальных клеток не происходит. Было предположено, что в этом случае АФК могут вносить вклад в разрыхление клеточной стенки и высвобождение РГ-I (компонент

матрикса бактериальных эмболов) (Gorshkov *et al.*, 2016). Это предположение было основано на том, что АФК могут вызывать неферментативную фрагментацию полисахаридов, и такая АФК-опосредуемая фрагментация активно реализуется *in planta*, например, при росте растительных клеток растяжением (Fry, 1998; Fry *et al.*, 2001). Таким образом, накопление АФК и ПКС, индуцируемые пектобактериями, могут по-разному сказываться на стратегии взаимодействия этих микроорганизмов с хозяевами и определять как устойчивость растений, так и их восприимчивость.

Типичной реакцией на инвазию пектобактерий является активация вторичного метаболизма (Brader *et al.*, 2001; Montesano *et al.*, 2005; Kröner *et al.*, 2011; Alvarez *et al.*, 2016; Tsers *et al.*, 2020). При этом показано, что ряд вторичных метаболитов растений может подавлять продукцию факторов вирулентности пектобактерий, а также репрессировать систему кворума этих микроорганизмов (Lagonenko *et al.*, 2013; Joshi *et al.*, 2015, 2016 a, b). Однако вторичные метаболиты растений могут выступать не только в качестве репрессоров факторов вирулентности пектобактерий, но и индукторов (Yang *et al.*, 2008). Следовательно, изменение профиля вторичных метаболитов при инфекции может быть связано с обеспечением как устойчивости, так и восприимчивости растений к пектолитическим бактериям.

#### **1.1.4. Стратегия колонизации растений бактериями рода *Pectobacterium***

Инвазия пектобактерий/дикей в растение-хозяина может осуществляться как через надземные, так и подземные органы (Perombelon, Kelman, 1980; Czajkowski *et al.*, 2010a, b). Считается, что пектолитические бактерии в основном проникают в растение через поранения, а также с помощью фитофагов-переносчиков (Grenier *et al.*, 2006; Costechareyre *et al.*, 2010; Mongae *et al.*, 2013; Rossmann *et al.*, 2018). Однако эти микроорганизмы могут внедряться в тело растений и без экзогенного поранения, например, через чечевички и места ответвления боковых корней (Perombelon, Kelman, 1980; Czajkowski *et al.*, 2010b). Основными «источниками»

пектобактерий/дикей являются почва и материнские клубни (или другие зимующие вегетативные органы) (Perombelon, Kelman, 1980).

Пектобактерии и дикейи способны колонизировать все вегетативные органы растений-хозяев. Формирование симптомов мягких гнилей при этом связано с коллапсом паренхимных тканей (Perombelon, Kelman, 1980). В основном, пектолитические бактерии колонизируют апопласт; однако эти бактерии также обнаруживали в протопластах (Jones, Paton, 1973; Meneley, Stanghellini, 1975; Czajkowski *et al.*, 2010a, b; Goshkov *et al.*, 2014) (Рис. 2 О-Ц).

Помимо паренхимных тканей пектолитические бактерии интенсивно колонизируют сосуды ксилемы (Рис. 2 А-Н). По сосудам эти бактерии осуществляют нисходящую миграцию к подземным органам (Czajkowski *et al.*, 2010a; Kubheka *et al.*, 2013; Gorshkov *et al.*, 2014; Moleleki *et al.*, 2017). Подобный способ миграции, по всей видимости, обеспечивает эффективную вертикальную трансмиссию (передачу) патогенов от одного вегетативного поколения хозяина другому. В основном считается, что вертикальная трансмиссия пектобактерий связана с гниением материнского клубня, высвобождением бактерий в почву и последующим попаданием микроорганизмов на дочерний клубень. Такой способ контаминации, действительно, возможен, однако он связан с высвобождением бактерий в агрессивную для них почвенную экосистему. В свою очередь, возможность нисходящей миграции по сосудам может обеспечить попадание бактерий из материнского растения в дочерний клубень напрямую, минуя почву. В пользу такого способа вертикальной трансмиссии свидетельствует ряд фактов. Во-первых, после инокуляции средней части стебля растений пектобактериями, титр клеток патогена в зоне ниже области инфицирования превышает титр в зоне инокуляции и выше нее (Moleleki *et al.*, 2017). Во-вторых, показано, что пектобактерии интенсивно колонизируют проводящую систему столонов (Helias *et al.*, 2000; Czajkowski *et al.*, 2010a, b) (Рис. 2 Л, М). Таким образом, колонизация пектолитическими бактериями сосудов



ксилемы имеет большое значение для развития патологической системы и вертикальной трансмиссии этих фитопатогенов.

При колонизации растения-хозяина в популяции пектобактерий могут образовываться морфологически различающиеся клеточные фенотипы (Gorshkov *et al.*, 2014). Это согласуется с тем, что микробная популяция не является совокупностью «одинаковых» клеток, а представляет собой динамичную развивающуюся систему, состоящую из дифференцированных клеточных фенотипов (Lidstrom, Конопка, 2010; Ackeremann, 2015). Для пектобактерий/дикей *in planta* были описаны клеточные формы, сходные с покоящимися (Gorshkov *et al.*, 2014), L-формы, не имеющие клеточную стенку (Jones, Paton, 1973), биопленко-подобные структуры и бактериальные эмболы (Kubheka *et al.*, 2013; Gorshkov *et al.*, 2014).

Особое внимание в последнее время заслужили «многоклеточные» структуры, формируемые бактериальными клетками – биопленки. Биопленки широко описаны на примере многих видов бактерий, в том числе фитопатогенных (Danhorn, Fuqua, 2007; Castiblanco, Sundin, 2016; Antony *et al.*, 2017). Формирование таких структур определяет вирулентность многих бактерий. Фитопатогенные бактерии, как правило, образуют биопленки на поверхности растения-хозяина (филлосфера, ризосфера) или в сосудах ксилемы. Для формирования биопленок требуется внеклеточный матрикс, который объединяет отдельные клетки в целостную «тканеподобную» структуру. Основным компонентом этого матрикса служат ЭПС, синтезируемые микроорганизмами.

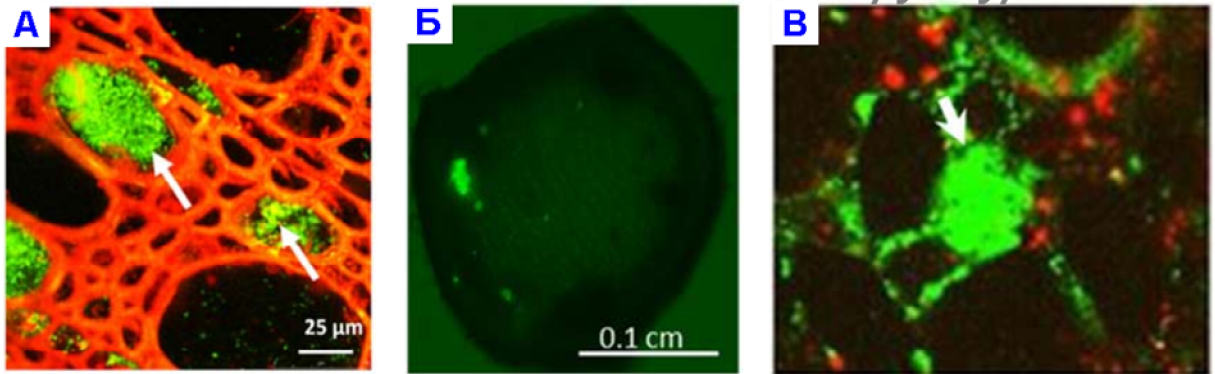
Бактерии рода *Dickeya* синтезируют разные по структуре ЭПС и формируют *in vitro* два типа биопленок: 1) SAL-биопленки (surface-air-liquid), образующиеся в виде кольца, прикрепленного к поверхности субстрата (пробирки) на границе раздела фаз (поверхность-воздух-жидкость); 2) пелликулы (pellicles) – гладкие и объемные структуры, образующиеся на границе раздела фаз жидкость-воздух (без прикрепления к твердой поверхности) (Yap *et al.*, 2005; Jahn *et al.*, 2008, 2011; Yang *et al.*, 2008; Naque

*et al.*, 2009, 2012). Дикейи образуют биопленко-подобные структуры и в растении-хозяине (Czajkowski *et al.*, 2010a; Prigent-Combaret *et al.*, 2012) (Рис. 2 А, Б). Однако какой тип биопленок формируют дикейи *in planta*, остается не известным.

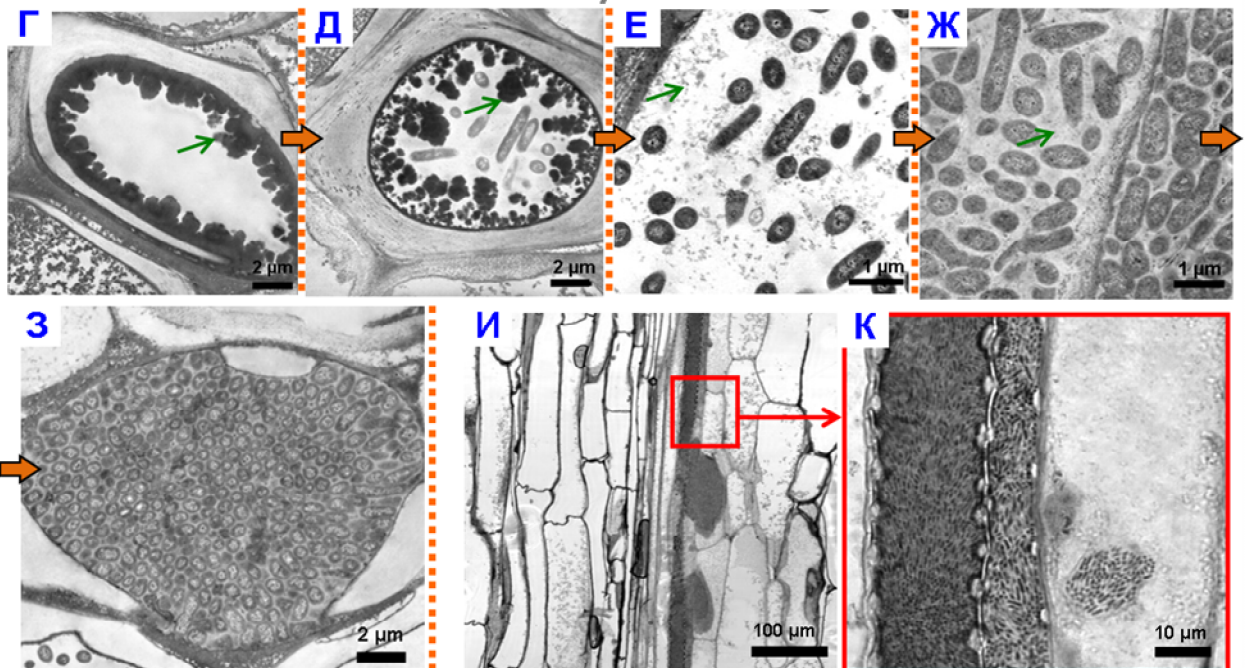
У пектобактерий основные структурные компоненты матрикса биопленок, ЭПС, не описаны. При этом показано, что некоторые виды пектобактерий (*P. brasiliense*) способны образовывать биопленко-подобные структуры *in planta* и *in vitro* (Kubheka *et al.*, 2013; Moleleki *et al.*, 2017) (Рис. 2). Однако другие виды (*P. atrosepticum*) не образуют биопленки в культурах *in vitro* (Perez-Mendoza *et al.*, 2011). В то же время мутантная форма *P. atrosepticum* с повышенным уровнем вторичного посредника циклического дигуанозинмонофосфата (ц-ди-ГМФ) была способна формировать биопленки *in vitro* (Perez-Mendoza *et al.*, 2011). В связи с этим, авторами было предположено, что формирование биопленок клетками *P. atrosepticum*, по всей видимости, является индуцируемым процессом и требует повышенного уровня ц-ди-ГМФ.

В растении-хозяине биопленки *P. atrosepticum* тоже не были описаны. Однако эти бактерии формируют другой тип «многоклеточных» структур – бактериальные эмболы, которые отличаются от типичных биопленок по ряду характеристик (Gorshkov *et al.*, 2014) (Рис. 2 3-К). Во-первых, бактериальные эмболы, в отличие от биопленок, образуются клетками пектобактерий в строго определенном месте – в сосудах первичной ксилемы растения-хозяина. Во-вторых, бактериальные эмболы и биопленки имеют разную морфологию. В структуре биопленок обычно есть множество каналов (пустот), необходимых для активного взаимодействия с окружающей средой, а клетки в составе биопленок расположены достаточно рыхло и беспорядочно. В составе бактериальных эмболов клетки расположены плотно и более-менее упорядочено (вдоль продольной оси колонизируемого сосуда) (Gorshkov *et al.*, 2014) (Рис. 2 3-К).

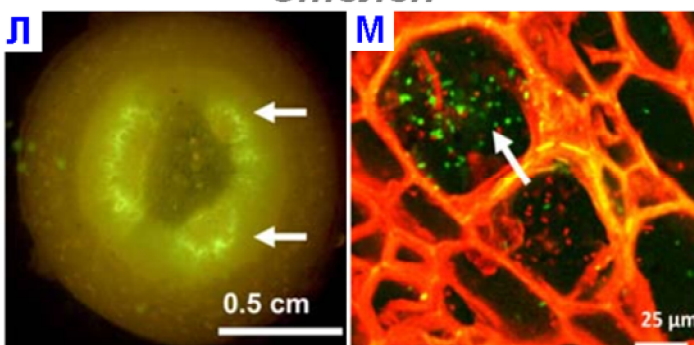
# Колонизация сосудов ксилемы *Стебель. Биоплёнокоподобные структуры*



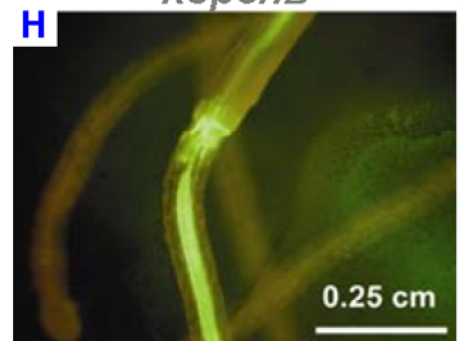
## *Стебель. Бактериальные эмболы*



## *Столон*



## *Корень*



Продолжение рисунка ниже

## Колонизация паренхимы

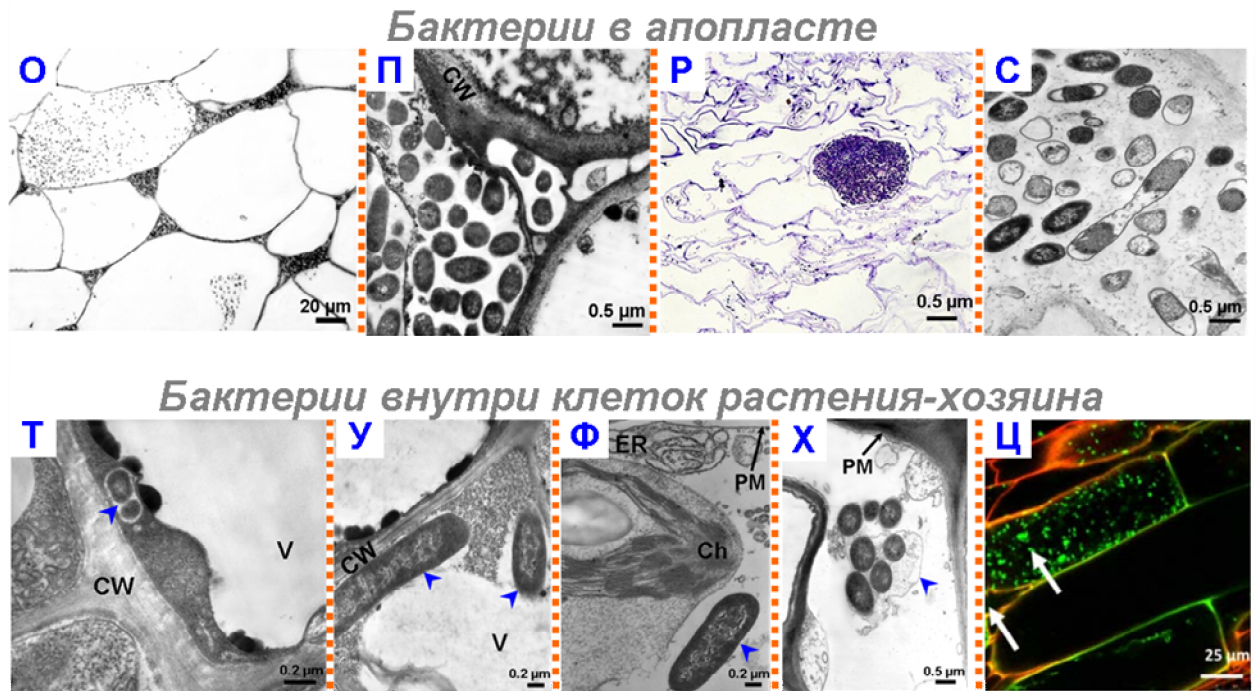


Рис. 2. Колонизация растений бактериями, относящимися к группе soft rot *Pectobacteriaceae* (представители родов *Pectobacterium* и *Dickeya*). Колонизация сосудов ксилемы (А-Н) и колонизация паренхимы (О-Ц). **Колонизация сосудов ксилемы:** (А) Биопленко-подобные структуры, формируемые GFP-мечеными клетками *Dickeya sp.* в стеблях картофеля (Czajkowski *et al.*, 2010a); (Б) GFP-меченные клетки *D. solani* в стеблях паслена горького (*Solanum dulcamara*) (Fikowicz-Krosko, Czajkowski, 2018); (В) GFP-меченные клетки *Pectobacterium carotovorum ssp. brasiliense* в стеблях картофеля (Moleleki *et al.*, 2017); (Г-З) Последовательные этапы образования клетками *P. atrosepticum* бактериальных эмболов в сосудах первичной ксилемы стеблей табака (Gorshkov *et al.*, 2014, 2016); зеленые стрелки указывают на матрикс из рамногалактуронана I, высвобождающегося из растительных клеточных стенок; (И, К) Продольные срезы стеблей табака с бактериальными эмболами *P. atrosepticum* (Gorshkov *et al.*, 2014); (Л, М) GFP-меченные клетки *Dickeya sp.* в столонах картофеля (Czajkowski *et al.*, 2010a); (Н) GFP-меченные клетки *Dickeya sp.* в корнях картофеля (Czajkowski *et al.*, 2010b). **Колонизация коровой паренхимы:** (П-

С) Клетки *P. atrosepticum* в растительных клеточных стенках и межклетниках коровой паренхимы стебля табака; (Т-Ц) Клетки *P. atrosepticum* внутри растительных клеток (Gorshkov *et al.*, 2014); (Т-Х) Клетки *P. atrosepticum* внутри клеток паренхимы стеблей табака; (Ц) GFP-меченные клетки *Dickeya sp.* внутри клеток паренхимы корней картофеля (Czajkowski *et al.*, 2010a). Синие и белые стрелки на рисунках указывают на бактериальные клетки.

И, в-третьих, способы формирования бактериальных эмболов и биопленок различаются. Начальной стадией формирования биопленки служит прикрепление клеток к субстрату (например, к стенке сосуда ксилемы) и интенсивное образование матрикса из ЭПС. При формировании бактериальных эмболов клетки не прикрепляются к стенке сосудов, а первичный матрикс этих структур состоит не из бактериальных ЭПС, а из фрагментов пектинового полисахарида – рамногалактуронана I (РГ-I) (Gorshkov *et al.*, 2016). При этом фрагменты РГ-I высвобождаются из растительных клеточных стенок в полость сосуда в результате восприимчивого ответа растения-хозяина (Gorshkov *et al.*, 2016; Tsers *et al.*, 2020). Из фрагментов РГ-I образуется гелеподобная субстанция, в которой удерживаются клетки *P. atrosepticum* (Рис. 2 Г-Ж).

Таким образом, бактериальные эмболы можно охарактеризовать как продукт интеграции патогена и хозяина, поскольку в формировании этих структур участвуют оба организма. При этом бактериальные эмболы образуются как при типичной, так и при латентной инфекции (Gorshkov *et al.*, 2018). Следовательно, эти структуры сами по себе не оказывают существенного негативного влияния на рост и развитие растения-хозяина. Блокировка сосудов первичной ксилемы не может существенным образом сказаться на водном транспорте, поскольку основной водопроводящей тканью в растении служит вторичная ксилема, которая остается не колонизированной пектобактериями.



Бактериальные эмболы, блокируя сосуд первичной ксилемы, могут обеспечить условия для нисходящей миграции и, следовательно, вертикальной трансмиссии патогена, которая, как известно, может осуществляться не только при типичной, но и при латентной инфекции (Perombelon, 1974; Perombelon, Kelman, 1980). В связи с этим, бактериальные эмболы можно рассматривать как важный компонент растительно-микробной патологической системы. На сегодняшний день существует еще много пробелов в понимании процесса биогенеза бактериальных эмболов. Один из них связан с тем, что первичный матрикс бактериальных эмболов из РГ-I разрушается по мере развития этих структур; но при этом структурная целостность бактериальных эмболов не нарушается. Это означает, что в ходе развития бактериальных эмболов формируется дополнительная полимерная сеть, удерживающая бактериальные клетки в рамках целостной структуры. На роль таких структурных компонентов матрикса подходят ЭПС, которые у пектобактерий до наших исследований не были описаны.

## **1.2. Экзополисахариды (ЭПС) бактерий**

ЭПС составляют обширную группу многофункциональных и разнообразных по структуре полимеров. У ряда фитопатогенных бактерий ЭПС служат в качестве важных детерминант взаимодействия микроорганизмов с растениями-хозяевами.

### **1.2.1. Структура ЭПС бактерий**

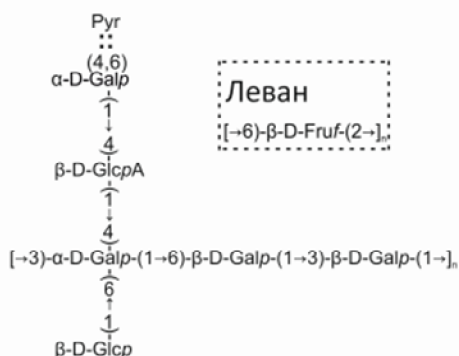
Бактериальные ЭПС представляют собой линейные или разветвленные полимеры, большинство из которых имеет молекулярную массу от 15 кДа до 100 МДа (Freitas *et al.*, 2011). Среди ЭПС встречаются как гомополимеры, то есть состоящие только из одного типа моносахарида (например, декстран (*Leuconostoc mesenteroides*), курдлан (*Rhizobium meliloti* и *Agrobacterium radiobacter*), целлюлоза (*Acetobacter sp.*), альтернан (*Leuconostoc mesenteroides*), реутан (*Lactobacillus reuteri*), мутан (*Streptococcus mutans*),

пуллулан (*Aureobasidium pullulans*)), так и гетерополимеры, в состав которых входят два и более моносахарида (например, ксантан (виды рода *Xanthomonas*), сукциногликан (*Alcaligenes faecalis*), амиловоран (*Erwinia amylovora*), альгинат (*Pseudomonas syringae*), клаван (*Clavibacter michiganensis*), стевартан (*Pantoe stewartii*), фастидиан (*Xylella fastidiosa*), диутан (*Sphingomonas sp.*)) (Рис. 3) (Becker *et al.*, 1998; da Silva *et al.*, 2001; Dumitriu *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2007; Chawla *et al.*, 2009; Koczan *et al.*, 2009; Freitas *et al.*, 2011; Kaur *et al.*, 2013; Tabibloghmany, Ehsandoost, 2014; Mohd Nadzir *et al.*, 2021). ЭПС, которые представляют собой гетерополимеры, состоят из регулярных (повторяющихся) звеньев, каждое из которых построено из 2-8 моносахаридов (Osman *et al.*, 1986; Evans *et al.*, 2000). В основном бактериальные ЭПС состоят из нейтральных моносахаридов: глюкоза, рамноза, арабиноза, галактоза, манноза, фукоза и ксилоза; однако многие ЭПС содержат в своем составе и заряженные уроновые кислоты (глюкуроновая, галактуроновая, маннуроновая, гулууроновая, идуроновая) (Osman *et al.*, 1986; Marty *et al.*, 1992; Ferreira *et al.*, 1997).

Полисахариды, синтезируемые живыми организмами, характеризуются большим структурным разнообразием. Это разнообразие достигается благодаря ряду факторов. Во-первых, это достаточно большой набор моносахаридов, входящих в состав полисахаридов. Во-вторых, каждый моносахарид способен образовывать гликозидную связь с разными атомами углерода другого моносахарида, в результате чего формируются разные типы связей (1→2, 1→3, 1→4 и т.д.). Кроме того, гликозидные связи в молекулах полисахаридов могут иметь разную конформацию ( $\alpha$  или  $\beta$ ). Типы/конформации связей между моносахаридами в молекулах полисахаридов во многом определяют свойства полимеров.

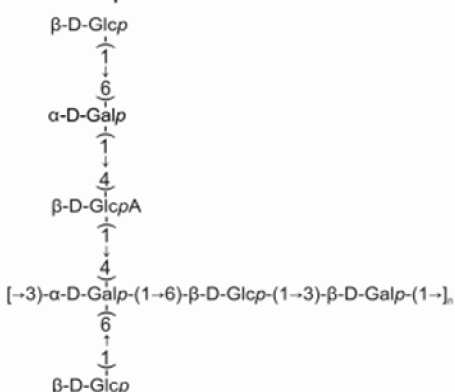
*Erwinia amylovora*

Амиловоран



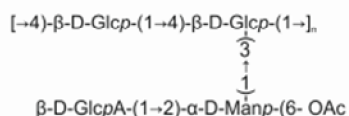
*Pantoea stewartii*

Стевартан



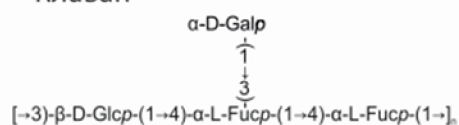
*Xylella fastidiosa*

Фастидиан

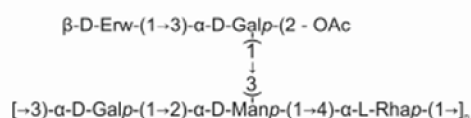


*Clavibacter michiganensis*

Клаван

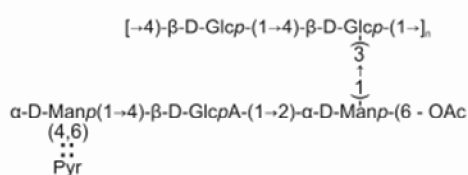


*Pectobacterium atrosepticum*

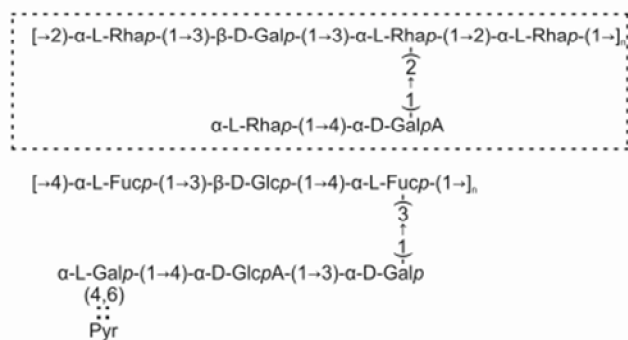
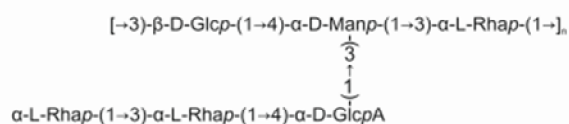


*Xanthomonas campestris*

Ксантан

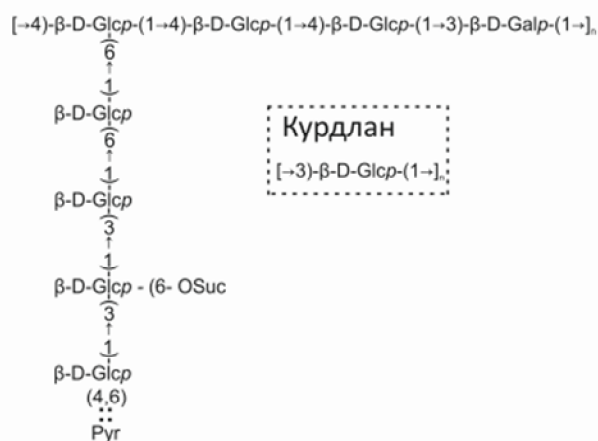


*Dickeya dadantii*



*Agrobacterium tumefaciens*

Сукциногликан



*Pseudomonas syringae*

Альгинат

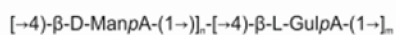


Рис. 3. Структура регулярных звеньев экзополисахаридов фитопатогенных бактерий. Fuc – фукоза, Rha – рамноза, Ara – арабиноза, Gal – галактоза, Glc – глюкоза, Xyl – ксилоза, GalA – галактуроновая кислота,



GlcA – глюконовая кислота, ManA – мануриновая кислота, *p* – пиранозная форма, OAc – ацетильная группа, Puc – пирувилльная группа, Suc – сукцинильная группа (Горшков, 2017).

В-третьих, для полисахаридов характерен нематричный синтез, что формирует основу для возникновения неоднородности даже в пределах одного типа полисахарида. Эта неоднородность в первую очередь связана с варьированием степени полимеризации отдельных молекул полисахаридов, а также с наличием/отсутствием разнообразных боковых цепочек и заместителей (Горшкова, 2007; Горшкова и др., 2013).

Основную роль в обеспечении структурного разнообразия полисахаридов растений и бактерий играют разные факторы. Для полисахаридов растений описан относительно ограниченный набор «базовых структур» (около 10), которые определяются основными элементами остова и боковых цепей. Однако в рамках отдельно взятой базовой структуры вариабельность молекул полисахаридов может быть очень высока (Albersheim *et al.*, 2010). Такую вариабельность обеспечивает то, что полисахариды растений синтезируются последовательно, то есть один моносахарид присоединяется к полимерной цепи. Благодаря этому (а также нематричному характеру синтеза) повышается степень гетерогенности полисахаридов, в том числе из-за возникновения различающихся доменов даже в рамках отдельно взятой молекулы; разные домены при этом могут иметь разный профиль замещения боковыми цепями и модифицирующими группами, что существенным образом сказывается на свойствах полимеров (Горшкова и др., 2013).

В отличие от полисахаридов растений, большинство микробных ЭПС имеет регулярную структуру (то есть состоят из идентичных повторяющихся олигосахаридных звеньев) благодаря блочному характеру синтеза (см. раздел 1.2.2.). Вследствие этого, для микробных ЭПС доменная организация молекул не характерна, что снижает степень вариабельности отдельных

молекул. Однако разнообразие ЭПС бактерий достигается благодаря большому (чем у растений) набору моносахаридов, входящих в состав разных полимеров (Evans *et al.*, 2000). Помимо «классических» моносахаридов, перечисленных выше, в состав микробных ЭПС могут также входить «экзотические» моносахариды, нехарактерные для растений (эрвиниоза, йерсиниоза, кариофилоза, кариоза, шеванелоза, альтроза и целый ряд других) (Zubkov *et al.*, 1992; Adinolfi *et al.*, 1995a, b; 1996; Kilcoyne *et al.*, 2002; Shashkov *et al.*, 2002; Mattos *et al.*, 2005; Zdrovenko *et al.*, 2012; Kondakova *et al.*, 2013).

Кроме того, ЭПС бактерий (так же как и полисахариды растений) могут содержать в своем составе и неуглеводные компоненты – модифицирующие группы, такие как сульфатные, фосфатные, сукцинильные, ацетильные, аминные и пирувильные. Такие модифицирующие группы часто определяют многие свойства полимеров, в том числе способность образовывать гомо- и гетерологичные комплексы (Evans *et al.*, 2000; Sutherland, 2001 a; Bazaka *et al.*, 2011).

### 1.2.2. Биосинтез ЭПС

Отдельные этапы биосинтеза ЭПС бактерий могут протекать не только в цитоплазме (как в случае полисахаридов растений), но и в периплазматическом пространстве, а также снаружи от внешней мембраны. Синтез ЭПС осуществляется гликозил-трансферазами (ГТ), которые обеспечивают присоединение модифицированного моносахарида (нуклеотид-дифосфат сахара (НДФ-сахара)) к растущей цепочке молекулы полисахарида (Breton *et al.*, 2006).

Описано четыре основных пути биосинтеза ЭПС бактерий: Wzx/Wzy-зависимый путь, ABC-транспортер-зависимый путь, синтазозависимый путь и внеклеточный синтез (Рис. 4). Сборка гомополимеров осуществляется по синтазозависимому пути и при внеклеточном синтезе, а гетерополимеры в

основном синтезируются по Wzx/Wzy- и ABC-транспортер-зависимым путям (Schmid *et al.*, 2015).

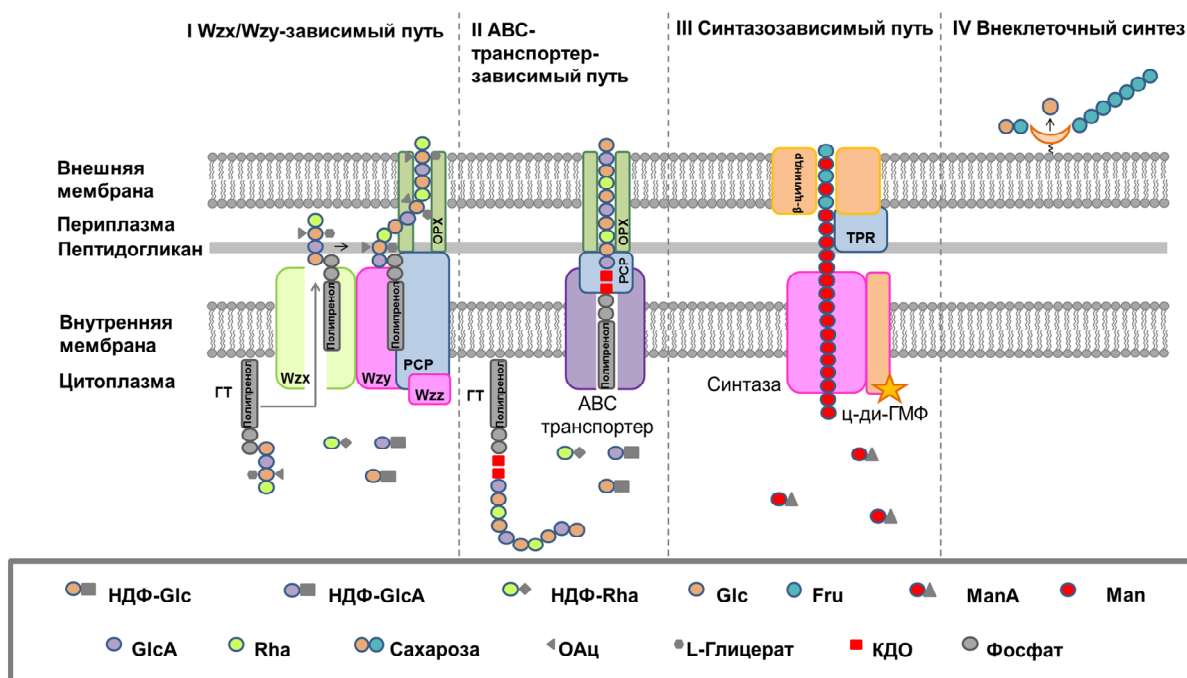


Рис. 4. Схематичное изображение путей биосинтеза ЭПС бактерий: Wzx/Wzy-зависимый путь (I), ABC-транспортер-зависимый путь (II), синтазозависимый путь (III) и внеклеточный синтез (IV). Fru – фруктоза; Rha – рамноза; Glc – глюкоза; Man – манноза; ManA – маннуроновая кислота; HDGlc – нуклеотиддифосфат-глюкоза; HDGlcA – нуклеотиддифосфат-глюкуроновая кислота; HDGlcRha – нуклеотиддифосфат-рамноза; ГТ – гликозилтрансферазы; ОАц – ацетильная группа; Wzx – флиппаза; Wzy – полимераза, участвующая в полимеризации регулярных звеньев ЭПС; Wzz – белок, участвующий в полимеризации ЭПС; PCP – polysaccharide copolymerase (ко-полимераза); OPX – outer membrane polysaccharide export (экспортный белок внешней мембраны), TPR – tetratricopeptide repeat (белок, участвующий в транспорте ЭПС и содержащий тетратрикопептидный повтор) (Schmid, 2015).

В Wzx/Wzy-зависимом пути из HDGlc-сахаров при участии нескольких гликозил-трансфераз формируются олигосахаридные регулярные звенья

ЭПС, которые транспортируются в периплазматическое пространство с помощью флиппазы Wzx (Islam, Lam, 2014). В периплазматическом пространстве полимеразы Wzy при участии ко-полимеразы Wzz катализируют образование гликозидных связей между регулярными звеньями, обеспечивая сборку полимера (Cuthbertson *et al.*, 2009, Morona *et al.*, 2009). Транспортировка ЭПС, синтезированных по Wzx/Wzy-зависимому пути, за пределы клетки осуществляется через экспортные белки внешней мембраны OPRX (Рис. 4).

По Wzx/Wzy-зависимому пути синтезируется ряд широко известных ЭПС, например, сукциногликан, велан, ксантан, геллан (Glucksmann *et al.*, 1993; Pollock *et al.*, 1993; Rehm *et al.*, 2010). Наиболее детально процесс биосинтеза описан для ксантана, продуцируемого фитопатогенными бактериями рода *Xanthomonas* (Tait *et al.*, 1986). Остов этого ЭПС построен из глюкопиранозных остатков, соединенных 1→4 типом связи, а трисахаридные боковые цепи состоят из двух α-маннопиранозных остатков и одного остатка глюкуроновой кислоты (Рис. 3). Сборка регулярного звена ксантана начинается с присоединения глюкозы к ундекапренилфосфату, закрепленному на внутренней мембране, с помощью ГТ GumD. Затем другая ГТ (GumM) присоединяет к первому остатку глюкозы второй. После этого ГТ GumH катализирует присоединение остатка маннозы, которая в составе будущего полимера будет являться первым (присоединенным к остову) моносахаридом боковой цепи. Затем к остатку маннозы с помощью ГТ GumK присоединяется остаток глюкуроновой кислоты, который при участии ГТ GumI связывается со вторым остатком маннозы боковой цепи.

Регулярные звенья ксантана могут содержать и неуглеводные компоненты: пирувильные и ацетильные группы. Ацетилтрансферазы GumF и GumG обеспечивают ацетилирование остатков маннозы: конечного остатка боковой цепи и остатка боковой цепи, соединенного с остовом, соответственно. Пирувильное окисление конечного остатка маннозы осуществляется белком GumL. Транспортировку регулярных звеньев

ксантана обеспечивает флиппаза GumJ (Wzx-белок), а их полимеризацию в периплазме катализирует фермент GumE (Wzy-полимераза). Транспорт полимерной цепи ксантана за пределы клетки обеспечивают белки GumB и GumC (Katzen *et al.*, 1998).

По пути, зависимому от транспортера ABC, как правило, синтезируются капсульные полисахариды (КПС) и липополисахариды (ЛПС), которые, как и ЭПС, транспортируются из клеток в окружающую среду, но в отличие от ЭПС остаются связанными с поверхностью клетки (Nwodo *et al.*, 2012). Полисахариды, синтезируемые по этому пути, образуются на цитоплазматической стороне внутренней мембраны посредством последовательного присоединения моносахаридов к невосстанавливаемому концу растущей цепи. В биосинтезе таких полисахаридов могут принимать участие как одна ГТ (в этом случае синтезируется гомополимер), так и несколько разных ГТ (в таком случае образуется гетерополимер) (Katzen *et al.*, 1998). Синтезированный полимер переносится в периплазматическое пространство с помощью транспортера ABC (Рис. 4). Принципы формирования регулярных звеньев полисахаридов, синтезируемых по Wzx/Wzy- и ABC-транспортер-зависимым путям, различаются; однако экспорт таких полисахаридов осуществляют сходные белки внешней мембраны ОРХ.

В синтазозависимом пути биосинтеза образование ЭПС и их транспортировка в периплазму осуществляются одним мультифункциональным белком (Rehm *et al.*, 2010). Из периплазмы такие ЭПС транспортируются через специальный порин. Поскольку в синтазозависимом пути принимает участие одна ГТ, обычно по этому пути синтезируются гомополимеры, такие как курдлан и целлюлоза. Однако в этом пути биосинтеза могут образовываться и гетерополимеры (альгинат, состоящий из маннурановой и гулурановой кислот). При этом на начальном этапе биосинтеза синтаза осуществляет полимеризацию маннурановой кислоты, формируя гомополимерную цепь; затем в периплазме

осуществляется *O*-ацетилирование некоторых остатков маннуронової кислоты, а неацетилированные остатки, уже находясь в составе полимерной цепи, преобразуются эпимеразой в гулуруновую кислоту (Franklin *et al.*, 1994) (Рис. 4).

В ходе внеклеточного пути биосинтеза ЭПС, который также называется сахарозозависимым, субстратом для образования полимеров служит экстраклеточная (экзогенная) сахароза. Сахароза вначале гидролизуется ферментом сахаразой, а затем из одного из входящих в состав сахарозы моносахаридов (глюкоза или фруктоза) формируется полимерная цепь (Рис. 4). Гидролиз сахарозы приводит к высвобождению энергии, которая используется для каталитического переноса гликозильного остатка на растущую полисахаридную цепь. В зависимости от того, какой моносахарид участвует в формировании полимерной цепи, при внеклеточном синтезе могут образовываться фруктаны (леван) или глюканы (альтернан, декстран, мутан, реутеран) (Côté *et al.*, 2002; Sanalibaba, Çakmak, 2016).

Некоторые бактерии способны производить несколько типов ЭПС, которые образуются в разных биосинтетических путях. Например, *Rhizobium radiobacter* (известный как *Agrobacterium tumefaciens*) производит сукциногликан (Wzx/Wzy-зависимый путь биосинтеза) и курдлан (синтазозависимый путь биосинтеза) (Zhan *et al.*, 2012). *Pseudomonas syringae* синтезирует альгинат (синтазозависимый путь) и леван (внеклеточный синтез с помощью фермента леван-сахаразы). *P. aeruginosa* производит три типа ЭПС – альгинат, PSL и PEL, первые два из которых синтезируются по синтазозависимому пути, а третий – по Wzx/Wzy-зависимому пути (Franklin *et al.*, 2011).

### 1.2.3. Регуляция продукции ЭПС

Биосинтез бактериальных ЭПС, как правило, не является конститутивным процессом, а индуцируется теми или иными факторами. Уровень продукции ЭПС зависит от среды обитания микроорганизмов, а

именно от ростового субстрата, температуры, кислотности, осмотичности (Li *et al.*, 2001; Nichols *et al.*, 2005; Marx *et al.*, 2009). У бактерий *Enterobacter sp.* синтез ЭПС индуцируется при избытке углерода и одновременном недостатке азота (Freitas *et al.*, 2011). В большинстве случаев ЭПС синтезируются в аэробных условиях; однако существуют примеры того, что максимальный уровень продукции ЭПС (альгинат, производимый *Pseudomonas aeruginosa*) обеспечивается микроаэрофильными условиями (Rehm *et al.*, 2009). Кроме того, добавление в среду культивирования витаминов, аминокислот или металлов может стимулировать синтез ЭПС бактериями *Sphingomonas paucimobilis* (геллан), *Alcaligenes sp.* (велан), *Acetobacter xylinum* (целлюлоза), *Agrobacterium sp.* (курдлан) (McIntosh *et al.*, 2005; Bajaj *et al.*, 2006; Premjet *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2010; Caruso *et al.*, 2018).

Разный уровень продукции ЭПС обеспечивается тем, что синтез этих полимеров контролируется рядом регуляторных систем. Продукция ЭПС регулируется на популяционном уровне при участии системы кворум сенсинга (чувство кворума, quorum sensing) (Hay *et al.*, 2014) (раздел 1.1.2). Инактивация регуляторной системы кворум сенсинга у *Pseudomonas aeruginosa*, *Pantoea stewartii*, *Ralstonia solanacearum*, *Sinorhizobium meliloti* выражается неспособностью микроорганизмов синтезировать ЭПС, что приводит к потере вирулентности бактерий (Davies *et al.*, 1998; Marketon *et al.*, 2003; Roper *et al.*, 2011; Hayashi *et al.*, 2019). В то же время, у фитопатогенной бактерии *Xylella fastidiosa* индукция системы кворум сенсинга, наоборот, подавляет синтез ЭПС (Newman *et al.*, 2004), что, по-видимому, определяется особенностями взаимодействия этой бактерии с растением-хозяином. *X. fastidiosa* колонизирует исключительно сосуды ксилемы растения-хозяина (но не другие клетки/ткани), где формирует биопленки, которые, в случае чрезмерного разрастания, могут полностью блокировать транспорт воды (Chatterjee *et al.*, 2008). Тотальная закупорка сосуда биопленкой может негативно сказываться на развитии *X. fastidiosa* внутри растения-хозяина, поскольку ростовой субстрат для этих

микроорганизмов доставляется транспирационным током. Кроме того, закупорка сосуда может привести к гибели растения-хозяина, что также крайне неблагоприятно для патогена. Именно поэтому у *X. fastidiosa* продукция ЭПС и формирование биопленок находятся под негативным контролем системы кворум сенсинга (Chatterjee *et al.*, 2008).

В качестве положительного регулятора продукции ЭПС служит вторичный посредник циклический дигуанозинмонофосфат (ц-ди-ГМФ). Одной из наиболее известных функций ц-ди-ГМФ является обеспечение перехода бактерий от подвижного, планктонного образа жизни к «оседлому», прикрепленному, который реализуется, например, при образовании биопленок, формирование которых во многом зависит от продукции ЭПС (Tischler, Camilli, 2004; Waters *et al.*, 2008; Boyd *et al.*, 2012). Показано, что ц-ди-ГМФ активировать продукцию амиловорана (*Erwinia amylovora*), бактериальной целлюлозы (*Agrobacterium tumefaciens*), альгината (*Pseudomonas aeruginosa*), ксантана (*Xanthomonas oryzae*) и курдлана (*Agrobacterium sp.*) (Hengge *et al.*, 2009; Hay *et al.*, 2010; Ruffing, Chen, 2012; Whitney *et al.*, 2013; Edmunds *et al.*, 2013; Liang *et al.*, 2015).

Роль ц-ди-ГМФ в формировании биопленок (и, вероятно, синтезе ЭПС) продемонстрирована и для *Pectobacterium atrosepticum*. Дикий тип *P. atrosepticum* не был способен образовывать биопленки в условиях *in vitro*; а у мутантной формы этой бактерии с повышенным уровнем ц-ди-ГМФ появлялась способность к биопленкообразованию (Perez-Mendoza *et al.*, 2007).

Активатором продукции ЭПС у многих микроорганизмов также является альтернативный стресс-индуцируемый сигма-фактор RpoS (Jørgensen *et al.*, 1999; Sauviac *et al.*, 2007; Shee *et al.*, 2011). RpoS служит одним из ключевых координаторов стрессового ответа бактерий (Winkler *et al.*, 2005; Karpinets *et al.*, 2006). У мутантных по гену *rpoS* штаммов *Escherichia coli*, *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Erwinia amylovora* снижался уровень продукции ЭПС (Jørgensen *et al.*, 1999; Ionescu,



Belkin, 2009; Dong, Schellhorn, 2010; Santander *et al.*, 2014). Положительная регуляция синтеза ЭПС стрессовым сигма фактором представляется логичной, поскольку для ряда ЭПС продемонстрированы защитные свойства, и поэтому интенсивная продукция этих полимеров в стрессовых условиях может обеспечить выживание бактерий при действии неблагоприятных факторов.

#### **1.2.4. Функции ЭПС бактерий**

##### **1.2.4.1. Структурные функции ЭПС**

ЭПС служат в качестве основополагающих структурных компонентов внеклеточного матрикса бактериальных биопленок и других «многоклеточных» структур, формируемых микроорганизмами (агрегаты, маты, колонии). Начальные этапы образования биопленок часто связаны с прикреплением бактериальных клеток к субстрату (Palmer, White, 1997). Считается, что адгезию клеток обеспечивают не столько ЭПС, сколько бактериальные пили и адгезины белковой природы (O'Toole *et al.*, 2000; Donlan, 2002). Тем не менее, адгезивные свойства у ЭПС (по крайней мере, у некоторых) тоже могут быть выражены. ЭПС, названные Pel и Psl, синтезируемые бактерией *Pseudomonas aeruginosa*, вносят вклад в адгезивность клеток этого микроорганизма. Адгезивность мутантов *P. aeruginosa*, не синтезирующих Pel и Psl, была значительно ниже, чем дикого типа (Tian *et al.*, 2014). Кроме того, эти мутанты не были способны формировать биопленки. Адгезивные свойства были также продемонстрированы для ЭПС FusoPol, производимого *Enterobacter A47* (Araújo *et al.*, 2016).

Помимо адгезии бактерий к поверхности, для формирования и развития биопленок требуется специфический микрокосм, который объединяет обособленные клетки в единую структуру. Такой микрокосм и создается благодаря наличию внеклеточного матрикса. То, что в качестве ключевого компонента этого матрикса служат именно полисахариды, по-видимому,

связано с тем, что эти полимеры в наибольшей степени (по сравнению с другими полимерами) вступают в различные гомо- и гетерологичные взаимодействия (Sutherland, 2001b; Jennings *et al.*, 2015). Такие взаимодействия необходимы для формирования единой полимерной сети, служащей в качестве комфортной среды обитания для бактерий.

Способность к формированию полимерных сетей обеспечивается физико-химическими свойствами ЭПС. Для многих ЭПС продемонстрировано, что они могут служить в качестве желирующих агентов и/или увеличивать вязкость растворов, что является следствием взаимодействия отдельных молекул друг с другом (Wyatt *et al.*, 2009; Peng *et al.*, 2019). Некоторые ЭПС способны формировать крупные супрамолекулярные агрегаты с размерами, даже превышающими размеры бактериальных клеток (Cai *et al.*, 2017; Kavitate *et al.*, 2019).

Реологические параметры (вязкость) растворов разных ЭПС (продуцируемых разными бактериями) могут различаться на несколько порядков величин (Ding *et al.*, 2003; Wyatt *et al.*, 2009; Niknezhad *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2018). Наиболее «вязким» ЭПС считается ксантан, синтезируемый фитопатогенными бактериями рода *Xanthomonas*. Благодаря своим свойствам ксантан активно используется в пищевой, фармацевтической, биомедицинской промышленности (Wyatt *et al.*, 2009; Nabibi *et al.*, 2017; Kumar *et al.*, 2018).

Модифицирующие группы, присутствующие в составе многих полисахаридов (раздел 1.2.1), могут вносить существенный вклад межмолекулярные взаимодействия полимеров (Sutherland, 2001b; Lima *et al.*, 2018). Показано, что пирувильные и ацетильные группы в составе ксантиана во многом определяют способность этого полимера увеличивать вязкость водных растворов (Silva *et al.*, 2009). Наличие этих групп также определяет желирующие свойства амиловорана (*Erwinia amylovora*) и клавана (*Clavibacter michiganensis*) (Nimtz *et al.*, 1996; Vanhooren, Vandamme, 2000).

Кроме того, ЭПС могут выполнять функцию сурфактантов, снижая поверхностное натяжение воды и увеличивая таким образом эффективность передвижения бактерий, в том числе в тканях растения (Neu *et al.*, 1992; Flemming, Wingender, 2010). Таким свойством, например, обладает стевартан – ЭПС, синтезируемый *Pantoea stewartii* (Herrera *et al.*, 2008).

#### 1.2.4.2. Защитные функции ЭПС

ЭПС защищают клетки микроорганизмов от действия различных неблагоприятных факторов. Благодаря высокой водоудерживающей способности эти полимеры могут препятствовать обезвоживанию клеток бактерий при недостатке воды (Khan, Vano, 2019). Кроме того, ЭПС могут служить в качестве антифризов, предотвращающих образование кристаллов льда, предохраняя таким образом клетки от замораживания (Liu *et al.*, 2013; Casillo *et al.*, 2017).

У ЭПС выражены ионообменные свойства, благодаря чему они способны связывать токсичные соединения (антибиотики, ксенобиотики), не позволяя им проникнуть внутрь клеток. По этой же причине ЭПС способствуют поддержанию солевого баланса. При этом ЭПС могут защищать от солевого стресса не только клетки микроорганизмов, но и растения, колонизируемые продуцентами этих полимеров. Так, ЭПС, синтезируемые ризосферными бактериями (*Pseudomonas sp.*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Bacillus subtilis*), повышали устойчивость растений сои к NaCl (Khan *et al.*, 2020). Ионообменные свойства ЭПС также обеспечивают иммобилизацию тяжелых металлов, защищая от их действия не только клетки микроорганизмов, но и колонизированные бактериями растения (Gupta, Diwan, 2017; Zainab *et al.*, 2020).

Важную роль ЭПС играют в защите не только от абиотических, но и от биотических стрессоров, в частности от защитных метаболитов растений-хозяев. Мутация, приводящая к неспособности *Rhizobium leguminosarum* синтезировать ЭПС, не сказывалась на росте микроорганизма в стандартных

условиях *in vitro*; однако мутантная форма в сравнении с диким типом была значительно более чувствительна к ряду фитоалексинов (Rolfe *et al.*, 1996).

Одними из ключевых защитных метаболитов растений считаются АФК, которые опосредуют разные типы иммунных ответов и обладают прямой антимикробной активностью (Bissett *et al.*, 1990; Herb, Schramm, 2021). В состав ЭПС входят разные функциональные группы (карбокисильные, гидроксильные, различные неуглеводные заместители), которые служат в качестве доноров электронов, обеспечивающих детоксикацию АФК. Способность осуществлять детоксикацию АФК была продемонстрирована на примере большого числа разных ЭПС (Yildiz *et al.*, 2018; Andrew, Jayaraman, 2020; Nguyen *et al.*, 2020); однако среди ЭПС фитопатогенных бактерий такие свойства были продемонстрированы только для ксантана и для ЭПС, синтезируемых *P. agglomerans* (Wang *et al.*, 2007; Sran *et al.*, 2019).

ЭПС способны не только обеспечивать детоксикацию АФК, но и препятствовать их интенсивному синтезу. Эти полимеры могут ингибировать НАДФН-оксидазу – фермент, производящий основной пул АФК в растительных клетках при биотическом стрессе (Bylund *et al.*, 2006). Кроме того, ЭПС способны связывать ионы железа, которые необходимы для генерирования гидроксил-радикала в ходе реакции Фентона (Cho *et al.*, 2013). Помимо этого, ЭПС связывают ионы кальция – ключевого вторичного посредника, задействованного в индукции иммунного ответа. Вход кальция в цитоплазму из апопласта, в частности, приводит к индукции активности НАДФН-оксидазы и, следовательно, генерированию АФК (Dey *et al.*, 2010; Dubiella *et al.*, 2013; Stael *et al.*, 2015). Таким образом, иммобилизация кальция при участии ЭПС может подавлять окислительный взрыв в инфицированном растении, благоприятствуя развитию фитопатогенного микроорганизма *in planta* (Lattner *et al.*, 2003; Aslam *et al.*, 2008; Bianco *et al.*, 2016). При этом в хелатировании кальция важную роль играют модифицирующие группы ЭПС. Так, ксантан (ЭПС, производимый *X.*

*campestris*), лишенный ацетильных и пирувильных групп, значительно хуже связывал ионы кальция, чем нативный ксантан, и в отличие от исходного полимера не репрессировал опосредуемые кальцием защитные реакции растений (Yun *et al.*, 2006; Aslam *et al.*, 2008).

### 1.2.4.3. Фитоиммунные свойства ЭПС

ЭПС играют важную роль во взаимодействии растений и микроорганизмов. Помимо того, что эти полимеры играют структурную роль в составе патологических систем (1.2.4.1) и предохраняют клетки микроорганизмов от действия защитных метаболитов хозяина (1.2.4.2), ЭПС могут координировать иммунные ответы растений.

Иммунные ответы могут приводить к развитию двух типов устойчивости: 1) количественная устойчивость (горизонтальная или ПАМП-индуцируемая) и 2) качественная устойчивость (вертикальная или эффектор-индуцируемая) (Zhang, Zhou, 2010; Henry *et al.*, 2013; Горшков, 2017).

Индукторами количественной устойчивости служат метаболиты фитопатогенов, которые составляют так называемый патоген-ассоциированный молекулярный паттерн (ПАМП) (например, фрагменты флагеллина и ряда других белков, хитина и ряда других полисахаридов), а также эндогенные элиситоры (damage-associated molecular pattern, DAMP, молекулярный паттерн, ассоциированный с повреждением), такие, например, как олигосахарины, в том числе олигогалактурониды – фрагменты пектиновых веществ растений. ПАМП и DAMP распознаются специфическими рецепторами – PRR-киназами (pattern-recognition receptor) и WAK-киназами (wall-associated kinase), соответственно. В результате взаимодействия элиситоров (ПАМП и/или DAMP) с соответствующими рецепторами генерируется сигнал, ключевую роль в передаче и амплификации которого играют МАП-киназы (MAP-kinase, mitogen-activated protein kinases) и вторичный посредник – кальций. Передача сигнала при этом приводит к активации иммунного ответа: генерированию АФК, синтезу

фитоалексинов и защитных белков, фортификации клеточной стенки с помощью отложения каллозы и лигнина и т.д. (Jones, Dangl, 2006; Zipfel, Robatzek, 2010; Горшков, 2017).

Для ряда ЭПС было продемонстрировано, что они могут служить в качестве ПАМП – то есть элиситоров микробного происхождения, индуцирующих иммунный ответ растений. ЭПС, производимые *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas campestris* и *Ralstonia solanacearum* активировали в растениях накопление АФК, синтез фитоалексинов, закрывание устьиц – то есть типичные ПАМП-индуцируемые ответы (Romeiro, Kimura, 1997; de Pinto *et al.*, 2003; Milling *et al.*, 2011; Bianco *et al.*, 2016).

В то же время ЭПС могут служить и в качестве репрессоров количественной устойчивости. ЭПС, синтезируемые *X. campestris*, *P. syringae*, *E. amylovora* и *R. solonasearum* подавляли ПАМП-индуцируемый иммунитет у растений (Aslam *et al.*, 2008). При этом деацетилированная форма ксантана имела гораздо менее выраженные фитоиммуносупрессорные свойства, чем нативная, ацетилированная форма. Обнаружение иммуносупрессорных свойств у ЭПС хорошо согласуется с тем, что мутанты, не синтезирующие эти полимеры, вызывали у растений-хозяев значительно более сильные иммунные ответы, чем соответствующие дикие формы, производящие ЭПС (Bugert, Geider, 1995; Araud-Razou *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 1999; Kemp *et al.*, 2004; Keshavarzi *et al.*, 2004; Yun *et al.*, 2006). По всей вероятности, важную роль в детерминировании фитоиммуносупрессорных свойств ЭПС играет способность этих полимеров обеспечивать детоксикацию АФК и связывать ионы кальция.

Качественная устойчивость индуцируется в основном эффекторными белками фитопатогенов, доставляемыми микроорганизмами в цитоплазму клетки хозяина с помощью специальных секреторных систем, в первую очередь, системы секреции третьего типа (He *et al.*, 1998; Buttner, Bonas, 2002). Внутри протопласта эти эффекторы могут распознаваться R-рецепторами растения-хозяина, в результате чего генерируется мощный

окислительный взрыв, приводящий к индукции особого типа ПКС – реакции гиперчувствительности. Такая реакция приводит к быстрой, но локальной, гибели клеток растений вместе с внедрившимся в них патогеном. Такая форма иммунного ответа, как правило, выражается полной (качественной) устойчивостью растений к патогену (Jones, Dangl, 2006; Spoel, Dong, 2012; Горшков, 2017).

Несмотря на то, что главными индукторами качественной устойчивости считаются эффекторские белки, этот тип иммунитета может быть активирован и другими метаболитами фитопатогенов. Так, например, сигнальная молекула DSF (diffusible signal factor) – медиатор системы кворум-сенсинга фитопатогенных бактерий родов *Xanthomonas* и *Xylella* – индуцирует реакцию гиперчувствительности у ряда видов растений (Kakkar *et al.*, 2015). Для ЭПС ранее не было показано, что они способны индуцировать реакцию гиперчувствительности. Однако супрессорные свойства ЭПС в отношении этого типа иммунного ответа были продемонстрированы. Ксантан подавлял индуцируемую DSF реакцию гиперчувствительности у растений резуховидки (*Arabidopsis thaliana*), табака (*Nicotiana bethamiana*) и риса (*Oryza sativa*) (Kakkar *et al.*, 2015). Кроме того, этот ЭПС подавлял реакцию гиперчувствительности, индуцируемую авирулентными штаммами *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*, которые активировали эту реакцию, если растения предварительно не обрабатывали ксантаном (Leigh, Couplin, 1992).

Помимо того, что некоторые ЭПС способны подавлять фитоиммунные ответы, эти полимеры могут экранировать элиситоры фитопатогенов, препятствуя их взаимодействию с соответствующими рецепторами и последующей индукции защитных систем растения-хозяина. Кроме того, ЭПС могут предотвращать связывание бактериальных клеток растительными агглютинидами, которые иммобилизуют патогенов и приводят к их элиминации. Не производящие ЭПС штаммы *Erwinia amylovora*, *Pantoea stewartii*, *Ralstonia solanacearum* связывались растительными агглютинидами,

а штаммы этих же видов бактерий, синтезирующие ЭПС, – нет (Bradshaw-Rouse *et al.*, 1981; Young, Sequeira, 1986; Menggad, Laurent, 1998).

Перечисленные свойства ЭПС определяют их необходимость для формирования растительно-микробных патосистем, и поэтому эти полимеры относят к факторам вирулентности фитопатогенных бактерий и детерминантам растительно-микробных взаимодействий.

### **1.3. Постановка цели исследования**

Приведенный выше обзор данных литературы свидетельствует о том, что пектобактерии обладают внушительным арсеналом факторов вирулентности, которые обеспечивают возможность взаимодействия этих микроорганизмов с растениями-хозяевами. В ходе взаимодействия с растениями пектобактерии могут вызывать как типичные инфекции, выражающиеся развитием мягких гнилей, так и латентные, бессимптомные инфекции, не сопряженные с патологическими процессами. Сценарий взаимодействия пектобактерий с растениями определяется в зависимости от уровня продукции тех или иных факторов вирулентности, реакций растений на инвазию патогенов, а также стратегии колонизации хозяев микроорганизмами.

И при типичных, и при бессимптомных инфекциях в сосудах первичной ксилемы инфицированных пектобактериями растений образуются особые «многоклеточные» структуры – бактериальные эмболы. Эти структуры можно назвать базовыми компонентами исследуемой растительно-микробной патосистемы, так как они образуются при разных формах взаимодействия двух организмов. Бактериальные эмболы представляют собой продукт интеграции растения-хозяина и патогена, поскольку в формировании этих структур принимают участие оба организма.

Образование «многоклеточных» структур из бактериальных клеток, как правило, связано с формированием экстраклеточного матрикса, объединяющего микробные клетки в единую систему. Основным



компонентом такого матрикса служат продуцируемые бактериями ЭПС. Помимо выполнения структурообразующих функций ЭПС могут служить в качестве защитных метаболитов, предохраняющих клетки от разных стрессоров, а также фитоиммуномодуляторов и фитоиммуносупрессоров. В связи с этим, ЭПС относят к факторам вирулентности многих патогенных бактерий (в том числе фитопатогенных).

У представителей рода *Pectobacterium* ЭПС описаны не были, несмотря на то, что эти микроорганизмы образуют «многоклеточные» структуры с внеклеточным матриксом. Для построения первичного матрикса бактериальных эмболов пектобактерии используют не ЭПС, а фрагменты пектинового полисахарида растительных клеточных стенок (рамногалактуронана I, РГ-I). Эти фрагменты высвобождаются в полость сосудов в результате восприимчивого ответа растения и образуют гелеподобную субстанцию, которая выполняет функцию временного носителя микробных клеток. Однако по мере развития бактериального эмбола РГ-I постепенно разрушается; но при этом экстраклеточный матрикс не исчезает и дезинтеграции бактериального эмбола не происходит. Вопрос о полимерной сети, поддерживающей структурную целостность бактериального эмбола, оставался открытым.

Нами была выдвинута гипотеза о том, что на поздних этапах развития бактериальных эмболов первичный «пектиновый» матрикс этих структур замещается матриксом из ЭПС пектобактерий. В связи с этим, в настоящем исследовании мы предприняли попытку идентифицировать ЭПС пектобактерий, расшифровать их молекулярную структуру и оценить возможность участия этих полимеров в формировании растительно-микробной патосистемы.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 2.1. Культивирование *Pectobacterium atrosepticum*

Штамм *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 любезно предоставлен к.б.н. Е.А. Николайчиком (Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь). Для инфицирования растений, а также для получения голодающих культур, клетки *P. atrosepticum* культивировали в среде Lysogeny broth (LB), содержащей на 1 л 10 г пептона, 5 г дрожжевого экстракта, 10 г NaCl, pH 7,5, в термостатируемом шейкере-инкубаторе (JEIO TECH, Корея) при 180 об/мин и 28 °С. В качестве инокулята использовали культуры поздней логарифмической фазы роста в количестве, дающем начальную оптическую плотность клеточной суспензии 0,1 ОЕ ( $\lambda = 600$  нм).

Титр культур определяли по количеству колониеобразующих единиц в миллилитре (КОЕ/мл). Культуры последовательно разводили в 10 раз в физиологическом растворе (0,9% водный раствор NaCl). По 0,1 мл из каждого разведения наносили на чашки Петри, содержащие 20 мл агаризованной среды LB (1,5% агар-агар Industrias ROKO SA, Испания) и размазывали по поверхности при помощи шпателя Дригальского. Засеянные чашки Петри выдерживали в термостате при 28°С. Подсчет колоний проводили через двое суток после посева. Титр КОЕ в исходной культуре определяли по среднему числу колоний с учетом степени разведения.

Для анализа полисахаридов использовали культуры клеток, растущих в синтетической среде Д5, и голодающие культуры, инкубируемые в безуглеродной среде АВ. Среду Д5 (13,6 г/л  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 1 г/л  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; 10 мМ  $\text{MgSO}_4$ , 2 г/л сахараза; pH 7,5) инокулировали отмытыми этой же средой клетками *P. atrosepticum* до начального титра  $1-3 \times 10^6$  КОЕ/мл; культивирование проводили при 180 об/мин и 28 °С в течение 24 часов до ранней стационарной фазы роста ( $\sim 5 \times 10^8$  КОЕ/мл). Для получения голодающих культур, среду АВ (содержащую на 1 л 1 г  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; 0,62 г  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,15 г KCl; 0,013 г  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ; pH 7,5) инокулировали

дважды отмытыми этой же средой клетками *P. atrosepticum* до начального титра  $2-3 \times 10^8$  КОЕ/мл; культуры инкубировали при 28 °С без аэрации в течение 14 суток. После 14 суток инкубирования титр КОЕ в голодающих культурах составлял  $3-5 \times 10^7$  КОЕ/мл. Чистоту культур контролировали с помощью микробиологических высевов и ПЦР-анализа со специфичными праймерами (Горшков и др., 2009; Petrova *et al.*, 2014).

Для индукции реакции гиперчувствительности у растений табака использовали штамм *Pseudomonas syringae* DSM 50256 (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures); культивирование клеток этого штамма проводили в среде LB как описано выше для клеток пектобактерий.

## **2.2. Выделение ЭПС и внутриклеточных полисахаридов из супернатантов культур и из клеток *P. atrosepticum***

Полисахариды выделяли из супернатантов культур, а также из клеток, культивируемых в синтетической среде Д5, или инкубируемых в безуглеродной среде АВ. Супернатанты культур отделяли от основной массы клеток с помощью центрифугирования ( $10000 \times g$ , 4 °С, 10 мин). Полученные супернатанты последовательно пропускали через нитроцеллюлозные фильтры с диаметром пор 0,45 мкм и 0,22 мкм (Sartorius, Германия) для удаления оставшихся после центрифугирования клеток. Для очистки образцов от основной части белков супернатант термостатировали при 100 °С в течение 10 мин, после чего повторно центрифугировали и пропускали через нитроцеллюлозные фильтры. Излишнюю жидкость из супернатантов выпаривали на роторном испарителе (ИКА RV 8 V-C, Германия) до объема образца ~10 мл. Затем полученный образец диализовали против деионизированной воды (объем 2 литра) с помощью диализных мембран из целлюлозы 12000-Da (Sigma-Aldrich, Германия) в течение 12 часов при комнатной температуре, меняя воду каждые 2 часа. После диализа образец концентрировали с помощью вакуумного испарителя Eppendorf Concentrator Plus (Eppendorf, Германия).

Для определения структуры ЭПС *P. atrosepticum* с помощью ЯМР-спектроскопии, а также для всех экспериментов по анализу свойств целевых полимеров использовали очищенный с помощью гель-проникающей хроматографии (пункт 2.3) препарат ЭПС: 100->400 кДа – фракция, соответствующая объемам элюции 9-18 мл с учетом вычета мертвого объема (8 мл), а также деацетилированную форму ЭПС. Деацетилирование очищенных с помощью гель-проникающей хроматографии ЭПС проводили в 12% NH<sub>4</sub>OH (37 °C, 16 ч).

Клетки, осажденные с помощью центрифугирования, дважды отмывали средой АВ и растирали в керамических ступках в жидком азоте до состояния пудры. К полученной субстанции добавляли среду АВ (1/10 объема от исходного объема культуры) и тщательно перемешивали. Полученную суспензию центрифугировали (10000×g, 4 °C, 10 мин), супернатант отбирали и подвергали тем же процедурам (фильтрация, кипячение, упаривание, диализ), что и супернатанты культур (см. выше).

### **2.3. Анализ полисахаридов с помощью гель-проникающей хроматографии**

Полисахариды анализировали с помощью гель-проникающей хроматографии на колонке (12×400 мм) с сефарозой CL-4В (Pharmacia, Швеция) при скорости элюции 0,25 мл/мин. Объем собираемых фракций составлял 1 мл (коллектор фракций FC203В, Gilson, Франция). Для каждого из образцов собирали по 40 фракций с учетом мертвого объема (8 мл). В качестве элюента использовали 10 мМ пиридин-уксуснокислый буфер (pH 4,5). Образцы пуллуланов молекулярной массой 1660, 380, 186, 100 и 48 кДа (Showa Denko, Токуо, Япония) с низким индексом полидисперсности (1.09–1.19) использовали в качестве стандартов для калибровки колонки.

После проведения гель-проникающей хроматографии в каждой из 40 собранных для каждого образца фракции определяли количество углеводов фенольным методом по Дюбуа (Dubois, 1956). В стеклянные пробирки

добавляли по 125 мкл 5% фенола и 125 мкл образца. После тщательного перемешивания к смеси добавляли 0,625 мл концентрированной серной кислоты. Полученную смесь выдерживали 10 минут при комнатной температуре и затем термостатировали на водяной бане в течение 15 минут при 100 °С. Оптическую плотность раствора измеряли на спектрофотометре (Carl Zeiss Jena type МК 6/6, Германия) при 490 нм. Содержание углеводов определяли относительно калибровочной кривой.

#### **2.4. Определение моносахаридного состава полисахаридов**

Моносахаридный состав определяли во фракциях, отобранных после гель-проникающей хроматографии. Аликвоту фракции, содержащую 60 мкг углеводов, высушивали на скоростном вакуумном концентраторе Eppendorf Concentrator Plus (Eppendorf, Германия) до объема 300-500 мкл, переносили в 14 мл пробирки из дюраневого стекла (Sigma, США) и высушивали в токе воздуха при 60 °С до сухого осадка. Образцы гидролизовали в 400 мкл 2 М трифторуксусной кислоты (ТФУ) при 120 °С в течение 60 минут. После гидролиза образцы переносили в 1,5 мл пластиковые пробирки и высушивали в токе воздуха при 60 °С до сухого осадка. Образцы растворяли в 50 мкл деионизированной воды.

Моносахаридный состав полисахаридов анализировали с помощью метода высокоэффективной анионообменной хроматографии (HPLC) на колонке CarboPac PA-1 (4×250 мм, Dionex, USA), используя импульсный амперометрический детектор PAD (Dionex, USA). Скорость элюирования составляла 1 мл/мин. Температуру колонки поддерживали при 30 °С. Буферы: А – 100 мМ NaOH в 1 М AcNa, В – 15 мМ NaOH. Градиентное элюирование проводили следующим образом: 0-20 мин В-100%; 20-21 мин В-90%, А-10%; 22-41 мин В-50%, А-50%; 42-55 мин А-100%; 56-85 мин В-100%. Анализ каждого образца проводили в двух повторностях. Результаты анализировали с помощью программного обеспечения Dionex PeakNet.

## 2.5. Анализ содержания 3-дезоксид-D-манно-2-октулозоновой кислоты (КДО)

Содержание 3-дезоксид-D-манно-2-октулозоновой кислоты (КДО) анализировали в образцах ЭПС и липополисахарида (ЛПС) *P. atrosepticum*. Для выделения ЛПС использовали клетки стационарной фазы роста, культивированные в среде LB. Клетки собирали центрифугированием ( $4000 \times g$ ,  $10\text{ }^\circ\text{C}$ , 30 минут), обезвоживали ацетоном, высушивали на воздухе и диспергировали.

ЛПС экстрагировали из клеток горячим водным раствором 45% фенола при температуре  $67\text{ }^\circ\text{C}$  при постоянном перемешивании в течение 45 минут без разделения слоев (Кульшин, 1987). Смесь охлаждали, переносили в диализный мешок и проводили диализ против дистиллированной воды в течение 5-7 суток. Диализованный образец концентрировали на роторном испарителе. Примеси белков осаждали добавлением 40% трихлоруксусной кислоты до pH 2,7. Смесь центрифугировали при  $6000 \times g$ ,  $4\text{ }^\circ\text{C}$ , 20 мин. Супернатант диализовали против дистиллированной воды и концентрировали на роторном испарителе. Полученный препарат ЛПС лиофилизировали с помощью Benchtop 2 K freeze dryer (VirTis, США) (Senchenkova *et al.*, 2003). Выход ЛПС составил 5,8% от массы клеток.

Содержание КДО анализировали колориметрически по реакции с тиобарбитуровой кислотой (Karkhanis *et al.*, 1978). В пробирку с навеской 1 мг препарата ЭПС или ЛПС добавляли 1 мл 0,2 н  $\text{H}_2\text{SO}_4$  и нагревали на кипящей водяной бане в течение 30 минут. Смесь охлаждали до комнатной температуры и центрифугировали при  $10000 \times g$ ,  $4\text{ }^\circ\text{C}$  в течение 5 мин. К 0,5 мл супернатанта добавляли 0,25 мл раствора 0,04 М  $\text{NaIO}_4$  в 0,125н  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 20 мин. Потом к смеси добавляли 0,25 мл 2,6%  $\text{NaAsO}_2$  в 0,5 н  $\text{HCl}$  и встряхивали до полного обесцвечивания раствора. Затем в смесь добавляли 0,5 мл 0,6% водного раствора тиобарбитуровой кислоты и перемешивали на вортексе. Далее смесь термостатировали при  $100\text{ }^\circ\text{C}$  в течение 15 мин. После термостатирования

сразу добавляли 1 мл диметилсульфоксида. После остывания смеси до комнатной температуры измеряли оптическую плотность при 548 нм относительно контрольного образца, обработанного, как указано выше, но без ЭПС или ЛПС (Karkhanis *et al.* 1978). Оптическую плотность измеряли с помощью спектрофотометра Specord 40 (Analytik Jena AG, Germany). Содержание КДО определяли относительно калибровочной кривой (Захарова, Косенко, 1982).

## 2.6. Анализ структуры с помощью ЯМР спектроскопии

Образцы ЭПС *P. atrosepticum*, полученные после разделения на колонке с сефарозой CL-4В (фракция 100→400 кДа, соответствующая объемам элюции 9-18 мл с учетом вычета мертвого объема (8 мл)), а также *O*-деацетилированного ЭПС (полученного после инкубирования нативных ЭПС в 12% NH<sub>4</sub>OH, 37 °С, 16 ч), растворяли в оксиде дейтерия (D<sub>2</sub>O 99,9%, Ferak, Германия) для обмена гидроксильных протонов на дейтерий, высушивали и повторно растворяли в оксиде дейтерия (99,994%, Sigma Aldrich, США). Для определения структуры полимера снимали одномерные (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>13</sup>C-JMOD), двумерные гетероядерные (HSQC, HMBC) и гомоядерные (COSY, TOCSY, ROESY) спектры. Спектры ЯМР снимали при температурах 303 К (исходные полисахариды) и 333 К (*O*-деацетилированные полисахариды) с использованием ЯМР-спектрометра Bruker AVANCE III, работающего при 600 МГц. Двумерные спектры были записаны и обработаны с использованием стандартных протоколов Bruker. Обработку и анализ данных проводили с использованием программного обеспечения Topspin 2.1 (Bruker, Германия).

## 2.7. Получение поликлональных антител

Для получения поликлональных антител против ЭПС *P. atrosepticum* проводили трехразовую иммунизацию кроликов в подколенные лимфатические узлы с двухнедельным интервалом путем последовательных

инъекций, содержащих 0,5, 1,0 и 1,5 мг очищенного препарата ЭПС *P. atrosepticum*. Для первой инъекции водный раствор антигена (1 мг/мл) смешивали с полным адъювантом Фрейнда в соотношении один к одному, а для последующих инъекций использовали неполный адъювант Фрейнда. Антисыворотку получали из крови, взятой у кроликов из краевой ушной вены, через 1 неделю после последней иммунизации. Фракцию иммуноглобулина G получали из антисыворотки осаждением полунасыщенным раствором сульфатом аммония. Антитела обессоливали деионизированной водой с использованием микроколонок (Vivaspin 500, 3000 MWCO PES, Sartorius Stedim Biotech, Германия). Уход за животными и обращение с ними осуществляли в соответствии с руководством по уходу и использованию лабораторных животных, Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях, и законодательством Российской Федерации. Использование животных было также одобрено учреждением, где проводились эксперименты. Получение антител проводили на базе ИБФРМ РАН (г. Саратов) совместно с к.б.н., с.н.с. Бурыгиным Г.Л.

## **2.8. Культивирование растений и их инфицирование**

Растения табака (*Nicotiana tabacum* сорт Petit Havana SR1), выращенные *in vitro* в стерильных условиях, а также растения картофеля (*Solanum tuberosum* сорт Кондор), выращенные в почве, использовали для иммунодетекции ЭПС *P. atrosepticum* в тканях инфицированных растений. Растения картофеля того же сорта, выращенные в почве, использовали для анализа полисахаридов буфер-экстрагируемой фракции контрольных и инфицированных *P. atrosepticum* растений. Растения табака того же сорта, выращенные в почве, использовали для анализа фитоиммунных свойств ЭПС *P. atrosepticum*. Культивирование растений проводили при 22 °С, 16-ти часовом световом дне и освещении 5000 люкс в климат-камере.



Стерильные растения табака выращивали на среде MS (Murashige – Skoog) (Murashige, Skoog, 1962), в состав которой входили (на 1 л): 825 мг  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; 950 мг  $\text{KNO}_3$ ; 850 мг  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,83 мг KJ; 6,3 мг  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 22,3 мг  $\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$ ; 8,6 мг  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,25 мг  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,025 мг  $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ; 0,025 мг  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ; 185 мг  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ; 220 мг  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ; 100 мг мезоинозита; 1 мг тиамина; 2 мг пиридоксина. Раствор хелатного железа готовили в виде 100-кратного стока из  $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$  (3,73 г/л) и  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  (2,78 г/л) и добавляли в среду. В среду также вносили сахарозу до концентрации 30 г/л сахарозы и агар-агар (Industrias ROKO SA, Испания) до 0,4%. Стерилизацию среды проводили при 0,8 атм в течение 45 мин. Семена стерилизовали 2 % раствором гипохлорида натрия с 0,5 % додецилсульфатом натрия (SDS) в течение 15 минут. Прозезинфицированные семена семь раз промывали стерильной дистиллированной водой и помещали в чашки Петри с 20 мл агаризованной среды MS. После появления семядольных листьев проростки рассаживали в стерильные банки со средой MS. Через 5 недель после посева, растения инфицировали клетками *P. atrosepticum*.

Для инфицирования растений клетки *P. atrosepticum* выращивали в среде LB (описано в разделе 2.1) до ранней стационарной фазы роста. Клетки осаждали центрифугированием (6000×g, 10 минут, комнатная температура) и затем дважды отмывали и ресуспендировали в 10 мМ растворе сульфата магния. Плотность инокулята доводили до  $(1-3) \times 10^7$  КОЕ/мл с помощью серийных разведений. Десять мкл суспензии бактериальных клеток (что соответствовало  $(1-3) \times 10^5$  КОЕ) наносили при помощи автоматического дозатора в пазуху листа в середине стебля без механических повреждений. На контрольные растения таким же образом наносили 10 мкл 10 мМ раствора сульфата магния.

Растения картофеля размножали черенкованием в стерильных условиях на среде MS. Апикальные части побегов (~2 см) отрезали и помещали в стерилизованный вермикулит (Peter Peat, Россия) на 14 суток для укоренения.

Затем растения пересаживали в грунт (Technoexport, Россия) в пластиковые горшки объемом 300 мл. Через 4 недели после посадки растения инфицировали клетками *P. atrosepticum* и помещали в стеклянные (светопроницаемые) камеры (40×40×60 см), чтобы обеспечить высокую влажность воздуха. Инокулят готовили как описано выше. При инфицировании 10 мкл суспензии клеток вносили в среднюю часть стебля с помощью стерильного шприца. В контрольные растения таким же образом вводили 10 мкл 10 мМ раствора сульфата магния.

Растения табака, используемые для анализа фитоиммунных свойств ЭПС *P. atrosepticum*, выращивали в почве (Technoexport, Россия) в пластиковых горшках объемом 50 мл в течение четырех недель. Инфильтрацию листьев осуществляли как описано в пункте 2.13.

## 2.9. Иммунодетекция ЭПС

Образцы стеблей (0,5 – 0,8 мм толщиной) были высечены с помощью стерильного бритвенного лезвия у неинфицированных и инфицированных *P. atrosepticum* растений табака (2 суток после инфицирования) и картофеля (3 суток после инфицирования). У инфицированных растений анализировали зону стебля, где был выражен некроз; у контрольных растений анализировали аналогичную область стебля. Все образцы фиксировали в смеси 2% параформальдегида и 0,5% глутарового альдегида, приготовленной в 0,1 М Na-фосфатном буфере (pH 7,2), в течение 4 ч при комнатной температуре. После промывки в фосфатном буфере образцы инкубировали в течение 1 часа в 0,5% (вес/объем) OsO<sub>4</sub>, разведенном в 0,1 М Na-фосфатном буфере (pH 7,2) с сахарозой (25 мг/мл). Дегидратацию проводили, выдерживая образцы в этиловом спирте при разных концентрациях (30–100% с шагом 10%) и в ацетоне. Далее образцы погружали в смесь смолы LR White (акриловая смола среднего класса; Ted Pella, Redding, CA) и ацетона в пропорциях (об/об) 1:3, 2:3, 3:1, при этом каждый этап включал 12-часовую инкубацию.

Затем образцы заливали смолой LR White в капсулах Beem и проводили полимеризацию в течение 24 часов при 60 °С. Ультратонкие срезы (толщиной 300 нм) и полутонкие срезы (толщиной 1 мкм) образцов получали с использованием стеклянного ножа на ультрамикротоме LKB Ultracut III (LKB, Швеция).

Полутонкие срезы стеблей табака собирали на предметных стеклах, покрытых силаном, и предварительно инкубировали в течение 1 часа в Na-фосфатном буфере, pH 7,4, содержащем 3% (вес/объем) бычьего сывороточного альбумина (БСА), для блокирования неспецифического мечения. Иммуномечение ЭПС *P. atrosepticum* проводили с использованием поликлональных антител, специфичных к ЭПС (Gorshkov *et al.*, 2017a).

Срезы инкубировали с первичными антителами в течение 1 ч. Первичные антитела разводили в соотношении 1:1 0,1 М фосфатно-солевым буфером (ФСБ) (8,0 г/л NaCl; 0,2 г/л KCl; 1,42 г/л Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,24 г/л KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,45), содержащем 0,06% (вес/объем) БСА. Далее срезы трижды промывали в 0,1 М ФСБ и затем инкубировали в течение 1 ч в темноте с вторичными антителами. Для иммунодетекции ЭПС в растениях табака использовали козы анти-кроличьи антитела, связанные с флуоресцеин-изотиоцианатом (Sigma, США), разведенные тем же буфером в соотношении 1:100. Для иммунодетекции ЭПС в растениях картофеля использовали ослиные анти-кроличьи антитела (Alexa Fluor® 488, Abcam, США), разведенные тем же буфером в соотношении 1:1000.

Затем срезы промывали Na-фосфатным буфером и дистиллированной водой по три раза каждым и помещали в раствор CFM-1 для закрепления (Electron Microscopic Sciences, Hatfield, PA). Срезы анализировали с помощью лазерного конфокального флуоресцентного микроскопа (LSM 510 Meta; Carl Zeiss, Йена, Германия). Иммунофлуоресценцию регистрировали при длине волны возбуждения 488 нм и эмиссии 503–550 нм.

Ультратонкие срезы (около 300 нм), монтировали на никелевые сеточки и инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре в 20

мМ в буфере трис-НСl (рН 7,4) с 3% БСА. Далее образцы инкубировали течение 2 ч при комнатной температуре с первичным поликлональными специфичными к ЭПС *P. atrosepticum* антителами, разведенными 1:1 буфером трис-НСl с 0,06% БСА. После этого срезы трижды промывали 20 мМ буфером трис-НСl (рН 8,2) и инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре со вторичными антителами (козьи анти-кроличьи антитела, связанными с коллоидным золотом 10 нм, Amersham Pharmacia Biotech), разведенными 1:50 в буфере трис-НСl с 0,06% БСА. Затем срезы промывали буфером трис-НСl (рН 8,2) и деионизированной водой. Частицы золота, конъюгированные со вторичными антителами, усиливали серебром с использованием набора VВInternational Silver Enhancing Kit (Ted Pella); раствор наносили на 2-5 минут в темноте. Образцы анализировали с помощью электронного микроскопа JEM-1200 EX (Jeol, Япония) при рабочем напряжении 80 кВ.

## **2.10. Выделение полисахаридов буфер-экстрагируемой фракции из неинфицированных и инфицированных *P. atrosepticum* растений картофеля**

Полисахариды буфер-экстрагируемой фракции выделяли из неинфицированных и инфицированных *P. atrosepticum* растений картофеля (трое суток после инфицирования). Для анализа использовали зону стебля, в которой были выражены симптомы мягкой гнили; соответствующую зону отбирали у неинфицированных растений. Участки стеблей растирали в керамических ступках в жидком азоте. К полученной пудре добавляли пять объемов (вес/объем) 50 мМ Na/К-фосфатного буфера и продолжали гомогенизацию образца до полного его оттаивания. Полученные гомогенаты центрифугировали при 10 000×g (4 °С, 10 минут). Супернатанты, содержащие буфер-экстрагируемые полисахариды, отделяли от осадка и инкубировали при 100 °С в течение 10 минут для денатурации белков. После этого проводили повторное центрифугирование при тех же параметрах; к

супернатантам добавляли четыре объема 96% этанола и выдерживали в течение ночи при 4 °С. Буфер-экстрагируемые полисахариды осаждали центрифугированием (10 000×g, 4 °С, 20 минут) и трижды промывали 80% этанолом. Затем полученный осадок растворяли в деионизированной воде и анализировали с помощью гель-проникающей хроматографии как описано в пункте 2.3.

## **2.11. Измерение реологических свойств водных растворов ЭПС *P.***

### ***atrosepticum***

Реологические свойства водных растворов ЭПС *P. atrosepticum* (в концентрациях 0,62%, 1,25%, 2,5%, 5,0%) оценивали на реометре MCR 102 (Anton Paar, Австрия) с использованием измерительной системы плита-плита PP50 (диаметр верхней и нижней плит 50 мм). Температурный контроль образца осуществлялся с помощью нижней системы нагрева на элементах Пельтье P-PTD200 и активного кожуха на элементах Пельтье H-PTD200 (погрешность 0.01К). Измерение вязкости растворов ЭПС *P. atrosepticum* проводили при скоростях сдвига от 1 до 120 с<sup>-1</sup> и температуре 20 °С. Ширина зазора между двумя плитами варьировала от 0,249 мм до 0,341 мм. Экспериментальные данные аппроксимированы моделью Кросса (Cross-equation), параметры которой рассчитывали с использованием программного обеспечения RheoCompass (Anton Paar, Austria).

## **2.12. Определение гидродинамического радиуса частиц ЭПС *P.***

### ***atrosepticum***

Гидродинамические радиусы частиц ЭПС *P. atrosepticum* (при концентрациях 0,05%, 0,15%, 0,31%, 0,62%, 1,25%, 2,5%, 5,0%), а также деацетилированной формы ЭПС (при концентрации 0,05%) определяли методом динамического светорассеяния. Измерения проводили с помощью многоугольного спектрометра Photocor Complex (Photocor Instruments Inc., Россия), оснащенного гониометром, коррелятором в реальном времени (200

каналов, 10 нс), термостатом и монохроматическим лазером (657,29 нм). Все эксперименты проводили в деионизованной воде при температуре 20 °С и положении счетчика фотонов под углом 150°. Автокорреляционные функции записывали в течение 40-120 сек (в зависимости от концентрации) с помощью программного обеспечения Photocor (Photocor Instruments Inc., Россия). Каждая автокорреляционная функция представляла собой среднюю зависимость, определенную для 25-30 измерений. Данные анализировали с использованием метода регуляризации с многопроходным алгоритмом обработки (полидисперсный анализ для нахождения распределения частиц по размерам, Distribution Analysis, multi-pass algorithm) с применением программного обеспечения DynaLS. Перед измерениями образцы и растворитель фильтровали через политетрафторэтиленовые (PTFE) мембраны с диаметром пор 0,22 мкм. Для расчета размера частиц ЭПС использованы стандартные значения вязкости и показателя преломления воды при 20 °С. Усредненный гидродинамический радиус частиц ( $R_h$ ) был рассчитан с использованием уравнения Стокса – Эйнштейна:

$$R_h = k_B T / 6\pi\eta D$$

где  $\eta$  – вязкость растворителя,  $k_B$  – константа Больцмана,  $T$  – абсолютная температура,  $D$  – коэффициент самодиффузии.

Весовой вклад частиц каждого типа в общую интенсивность светорассеяния образцом рассчитывали согласно теории Шибаяма (Shibayama *et al.*, 2006).

### **2.13. Анализ антиоксидантных свойств ЭПС *P. atrosepticum***

Антиоксидантные свойства ЭПС *P. atrosepticum* оценивали по их способности ингибировать окисление различных субстратов активными формами кислорода.

Окисление салициловой кислоты гидроксил-радикалом, генерируемым в ходе реакции Фентона ( $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + \cdot OH$ ), измеряли в реакционной смеси (3 мл), содержащей 25 мМ  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 2 мМ

салицилата натрия, 6 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  и 100 мкл исследуемого образца: ЭПС (0,02%, 0,04%, 0,08%), или деацетилованный ЭПС (0,02%, 0,04%, 0,08%), или деионизованная вода (контроль). Смесь инкубировали при  $37^\circ\text{C}$  в течение 1 ч. О накоплении окисленного продукта судили по изменению абсорбции при длине волны 510 нм (Wang *et al.*, 2007).

Окисление пирогаллола супероксид-радикалом, генерируемым в ходе автоокисления пирогаллола в слабощелочных условиях, измеряли в реакционной смеси (3 мл), содержащей 50 мМ Трис-НСl, рН 8,2, 3 мМ пирогаллола и 100 мкл исследуемого образца: ЭПС (0,02%, 0,04%, 0,08%), или деацетилованный ЭПС (0,02%, 0,04%, 0,08%), или деионизованная вода (контроль). О накоплении окисленного пирогаллола судили по изменению абсорбции при длине волны 325 нм (Wang *et al.*, 2007).

Уровень перекисного окисления липидов определяли в реакционной смеси, содержащей 2 мл фосфатно-солевого буфера (ФСБ) (8,0 г/л NaCl; 0,2 г/л KCl; 1,42 г/л  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 0,24 г/л  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; рН 7,45), 6 мМ  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 мл суспензии яичного желтка и 100 мкл исследуемого образца: ЭПС (0,02%, 0,04%, 0,08%), или деацетилованный ЭПС (0,02%, 0,04%, 0,08%), или деионизованная вода (контроль). Суспензию яичного желтка получали следующим образом: желток разбавляли ФСБ 1:1 (вес/объем) и интенсивно перемешивали на магнитной мешалке; полученную субстанцию разбавляли 40-кратным объемом буфера ФСБ. Реакцию перекисного окисления липидов останавливали добавлением 0,5 мл 20% трихлоруксусной кислоты. Затем к смеси добавляли 2-тиобарбитуровую кислоту до 0,8% и нагревали при  $100^\circ\text{C}$  в течение 15 минут. В ходе реакции тиобарбитуровой кислоты с малоновым диальдегидом (вторичным продуктом перекисного окисления липидов) образуется диаддукт, о накоплении которого судили по изменению абсорбции при длине волны 532 нм (Wang *et al.*, 2007).

Оптическую плотность растворов измеряли с помощью спектрофотометра PB2201B (SOLAR, Беларусь). Ингибирование АФК-опосредуемого окисления субстратов рассчитывали по формуле:

$$\text{Степень ингибирования (\%)} = (A-B) / A \times 100\%,$$

где А – абсорбция раствора контрольного образца (реакционная смесь + вода), В – абсорбция раствора опытного образца (реакционная смесь + раствор ЭПС/деацетилизованного ЭПС). Представленные значения рассчитаны по пяти повторностям.

Для оценки способности ЭПС *P. atrosepticum* защищать клетки *P. atrosepticum* от действия перекиси водорода, клетки ранней стационарной фазы роста дважды отмывали и суспендировали в безуглеродной среде АВ до плотности  $\sim 10^8$  КОЕ/мл и затем аликвотировали. В отдельные аликвоты добавляли  $\frac{1}{4}$  объема 0,2% ЭПС *P. atrosepticum* или 0,2% деацетилизованного ЭПС *P. atrosepticum* (конечная концентрация ЭПС 0,05%). В каждый из вариантов добавляли 1, 2, или 4 мМ перекиси водорода или воду (контроль). Суспензии инкубировали при 28 °С 24 ч без аэрации, и после этого определяли титры КОЕ. Представленные значения рассчитаны по трем биологическим повторностям.

#### **2.14. Анализ фитоиммунных свойств ЭПС *P. atrosepticum***

Для проверки способности ЭПС *P. atrosepticum* индуцировать или репрессировать реакцию гиперчувствительности (качественная устойчивость) проводили инфильтрацию листьев растений табака: 1) стерильным 10 мМ раствором MgSO<sub>4</sub> (контроль); 2) 0,05% раствором ЭПС *P. atrosepticum*; 3) клетками *Pseudomonas syringae* DSM 50256, суспендированными в 10мМ MgSO<sub>4</sub> до концентрации  $\sim 10^8$  КОЕ/мл; 4) 0,05% раствором ЭПС *P. atrosepticum* и клетками *P. syringae*; в последнем варианте обработки инфильтрацию раствора ЭПС проводили за 12 ч до инфильтрации клеток *P. syringae*; при этом соответствующие контрольные варианты были за 12 ч до внесения клеток *P. syringae* обработаны водой. Проявление реакции гиперчувствительности оценивали на 1-3 сутки после обработок. Анализ проводили в трех биологических повторностях.

Для проверки способности ЭПС *P. atrosepticum* индуцировать или



репрессировать ПАМП-индуцируемый иммунитет (количественная устойчивость) проводили инфильтрацию листьев растений табака: 1) стерильной водой (контроль); 2) 0,02% или 0,05% раствором ЭПС *P. atrosepticum*; 3) 0,02% или 0,05% раствором деацетилизованного ЭПС *P. atrosepticum*; 4) 1 мкМ раствором хитогексаозы (Carbosynth China Ltd., Китай); 5) 1 мкМ раствором хитогексаозы и 0,02% или 0,05% раствором ЭПС *P. atrosepticum*; 6) 1 мкМ раствором хитогексаозы и 0,02% или 0,05% раствором деацетилизованного ЭПС *P. atrosepticum*; в последних двух вариантах обработки инфильтрацию раствора ЭПС проводили за 12 ч до инфильтрации раствора хитогексаозы; при этом соответствующие контрольные варианты были за 12 ч до внесения хитогексаозы обработаны водой. Через 6 ч после обработок в инфильтрированных участках листьев измеряли уровни перекиси водорода и каталазной активности.

Для оценки содержания перекиси водорода инфильтрированные участки листьев (100 мг) растирали в керамических ступках в 1 мл холодного (4 °С) 50 мМ боратного буфера (37 г/л KCl; 31 г/л H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 3,4 г/л NaOH), pH 8,4. Гомогенаты центрифугировали (7000×g, 10 мин), и 100 мкл супернатантов добавляли к 500 мкл реагента, в состав которого входили 500 мМ сульфата аммония-железа, 50 мМ H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 200 мМ ксиленолового оранжевого и 200 мМ сорбита. Поглощение комплекса Fe<sup>3+</sup>-ксиленоловый оранжевый (A560) определяли через 45 мин. Абсорбцию измеряли при длине волны 240 нм с помощью спектрофотометра PB2201B (SOLAR, Беларусь). Содержание перекиси водорода определяли относительно калибровочной кривой. Данные были нормализованы и выражены в мкмоль H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на грамм сырой массы. Представленные значения рассчитаны по пяти биологическим повторностям.

Для измерения каталазной активности инфильтрированные участки листьев (100 мг) растирали в керамических ступках в 1 мл холодного (4 °С) 50 мМ К-фосфатного буфера, pH 7,0. Гомогенаты центрифугировали (7000×g, 10 мин) и 10 мкл супернатантов добавляли к 490 мкл реакционной

смеси, содержащей 50 мМ К-фосфатного буфера (рН 7,0) и 2 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Абсорбцию измеряли при длине волны 240 нм с помощью спектрофотометра PB2201B (SOLAR, Беларусь). Данные были нормализованы и выражены в ммоль  $\text{H}_2\text{O}_2$  в минуту на грамм сырого веса ( $\epsilon = 43,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Представленные значения рассчитаны по пяти биологическим повторностям.

### **2.15. Статистическая обработка данных**

Статистический анализ данных проводили с применением стандартных математических методов (расчет среднеквадратического отклонения, оценка достоверности различий по критерию Манна-Уитни) в программе Microsoft Excel-2007. Критерий вероятности  $P < 0,05$  принимали достаточным для достоверной разницы опытной и контрольной групп данных.

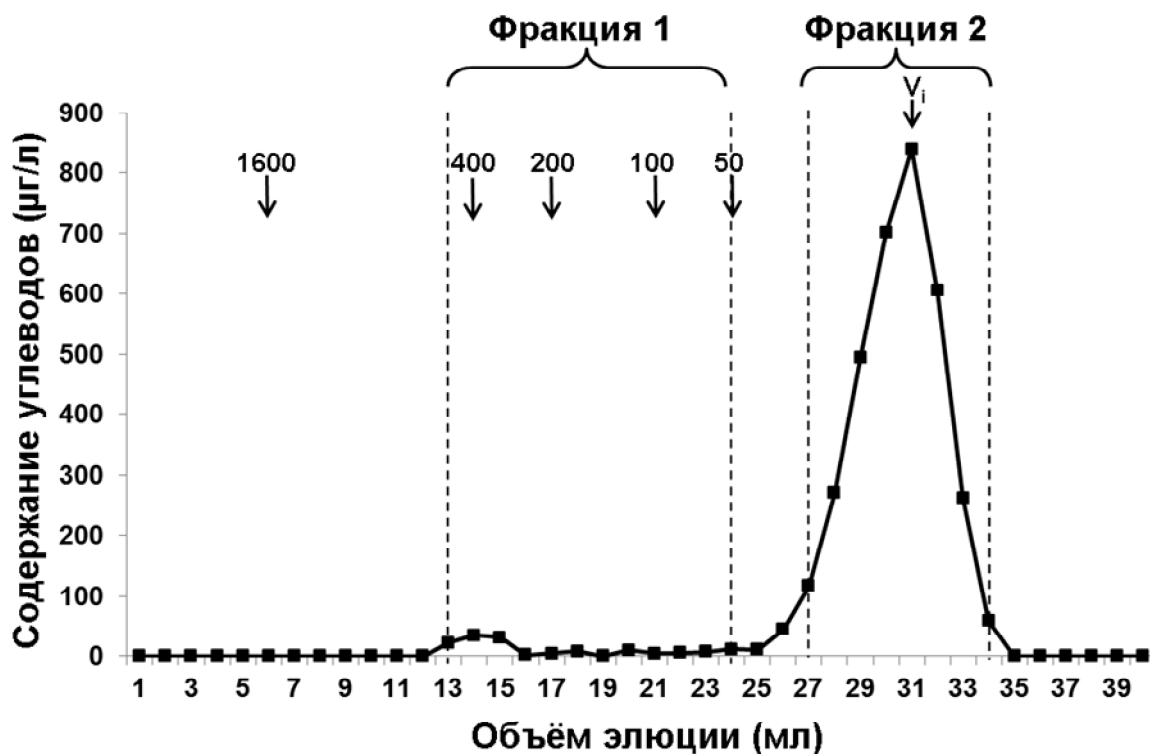
## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

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

Согласно нашей гипотезе, интенсивное образование ЭПС *P. atrosepticum* происходит на поздней стадии формирования бактериальных эмболов в сосудах первичной ксилемы инфицированных растений, когда первичный матрикс, состоящий из фрагментов пектинового полисахарида рамногалактуронана I (РГ-I), разрушается (Gorshkov *et al.*, 2016). Однако выделить чистый препарат ЭПС *P. atrosepticum* из инфицированных растений не представляется возможным, поскольку в растительных тканях присутствует большое разнообразие углеводов, которые приведут к высокому уровню контаминации препарата и сделают невозможным исследование структуры и свойств целевых полимеров. В связи с этим, для выделения препарата ЭПС *P. atrosepticum* мы использовали культуры *in vitro*. Клетки *P. atrosepticum* культивировали в синтетической среде Д5 (источник углерода – сахароза) до поздней стационарной фазы роста (двое суток). Затем из супернатантов культур, отделенных от клеток, выделяли углеводы (см. раздел 2.2). Выделенные углеводы анализировали с помощью гель-проникающей хроматографии; состав моносахаридов определяли с применением анионообменной хроматографии (см. разделы 2.3, 2.4).

Основная часть углеводов, содержащихся в супернатантах культур *P. atrosepticum* стационарной фазы роста, элюировала с колонки за пределами области деления сорбента (сефароза CL-4В), что соответствует молекулярной массе менее 30 кДа (Рис. 5). Доминирующим (91 моль%) среди идентифицированных моносахаридов в этой низкомолекулярной фракции была глюкоза. Это, по всей видимости, означает, что основную долю этой фракции составляла сахароза, которая не была до конца утилизирована микроорганизмами в процессе роста. Наряду с низкомолекулярными углеводами в супернатантах культур *P. atrosepticum* стационарной фазы роста нами были также выявлены следовые количества полимеров с

молекулярной массой 50-400 кДа (Рис. 5). Основным моносахаридом в этой фракции была галактоза (72 моль%), а также присутствовали манноза (14 моль%) и арабиноза (13 моль%); доля рамнозы составляла около 1 моль% (Рис. 5).



	Содержание моносахаридов (моль%)				
	Rha	Ara	Gal	Glc	Man
<b>Фракция 1</b>	1±0	13±2	72±5	0	14±2
<b>Фракция 2</b>	1±0	1±0	1±0	91±6	6±1

Рис. 5. Профиль элюции и моносахаридный состав (моль%) углеводов, содержащихся в супернатантах культур *P. atrosepticum* стационарной фазы роста. Разделение углеводов проводили на колонке с сефарозой CL-4В. В качестве маркеров молекулярной массы использованы пуллуланы (P) с молекулярной массой 1600, 400, 200, 100 и 50 кДа.  $V_i$  – объем растворителя внутри частиц геля.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в процессе роста в культурах *P. atrosepticum* накапливаются лишь следовые количества высокомолекулярных углеводов. Это согласуется с тем, что для *P. atrosepticum* ранее была продемонстрирована неспособность в ростовых условиях формировать биопленки, основным компонентом матрикса которых служат ЭПС (Pérez-Mendoza *et al.*, 2011). По всей видимости, в процессе роста синтез ЭПС в клетках *P. atrosepticum* репрессирован, и для его активации требуются специфические индукторы и/или особые условия. Способность к образованию биопленок в ростовых условиях была ранее продемонстрирована для мутантной формы *P. atrosepticum*, в клетках которой в результате нокаута гена фосфодиэстеразы накапливается повышенный уровень вторичного посредника циклического дигуанозинмонофосфата (ц-ди-ГМФ) (Pérez-Mendoza *et al.*, 2011). В связи с этим авторы предположили, что образование биопленок (а значит, вероятно, и синтез ЭПС) *P. atrosepticum* происходит в тех условиях, когда в клетках повышается уровень ц-ди-ГМФ.

Накопление ц-ди-ГМФ, в частности, происходит при стрессе, в том числе при недостатке ростового субстрата (Boehm, 2009; Yeo, 2018). Поэтому мы предположили, что синтез ЭПС может быть индуцирован у *P. atrosepticum* в условиях голодания. Это предположение подкреплялось еще и тем, что при дефиците субстрата некоторые клетки *P. atrosepticum* формировали структуры, напоминающие капсулы, основным компонентом которых служат ЭПС (неопубликованные данные сотрудников лаборатории молекулярной биологии КИББ ФИЦ КазНЦ РАН). Кроме того, при голодании *P. atrosepticum* происходила индукция экспрессии генов, продукты которых обеспечивают синтез ц-ди-ГМФ и ЭПС (Gorshkov *et al.*, 2017b). В связи с этим, мы проверили способность *P. atrosepticum* синтезировать ЭПС в условиях голодания в безуглеродной среде АВ.

Голодающие культуры получали по ранее описанному в нашей лаборатории методу (Gorshkov *et al.*, 2010). В течение первых суток титр

колониобразующих единиц (КОЕ) в голодающих культурах *P. atrosepiticum* снижался примерно в 4 раза (до  $4,8 \times 10^7$  КОЕ/мл) по сравнению с титром инокуляции ( $2,0 \times 10^8$  КОЕ/мл) (Рис. 6). Далее до 14 суток титр клеток практически не менялся и составлял в среднем  $2,8 \times 10^7$  КОЕ/мл. К 28 суткам титр КОЕ снижался до  $1,2 \times 10^7$  КОЕ/мл (Рис. 6).

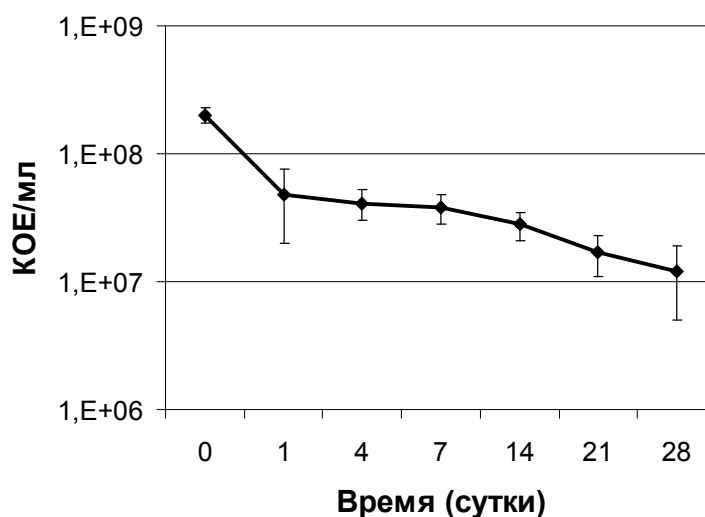


Рис. 6. Динамика тира КОЕ в голодающих культурах *P. atrosepiticum*.

В процессе голодания в культурах накапливались углеводы, которые разделялись на две основные фракции. Первая, доминирующая, более высокомолекулярная фракция состояла из полимеров с молекулярной массой 50->400 кДа (объем элюции 9-20 мл) (Рис. 7). Углеводы второй, минорной, более низкомолекулярной фракции имели молекулярную массу менее 50 кДа (объем элюции 27-33 мл). После первых суток голодания в культурах накапливались лишь следовые количества углеводов обеих фракций. В течение 14 суток голодания содержание углеводов в культурах увеличивалось более чем в 10 раз; на более поздних сроках голодания их содержание существенно не менялось (Рис. 7). В процессе голодания доля высокомолекулярных полимеров в общем пуле внеклеточных углеводов увеличивалась. После первых суток голодания содержание углеводов более высокомолекулярной фракции было лишь в 1,5 больше, чем содержание углеводов более низкомолекулярной фракции; на 4, 7, 14 и 28 сутки

голодания содержание более высокомолекулярных углеводов было в 2,2, 3,4, 4,8, 5,8 раз, соответственно, больше, чем содержание углеводов более низкомолекулярной фракции.

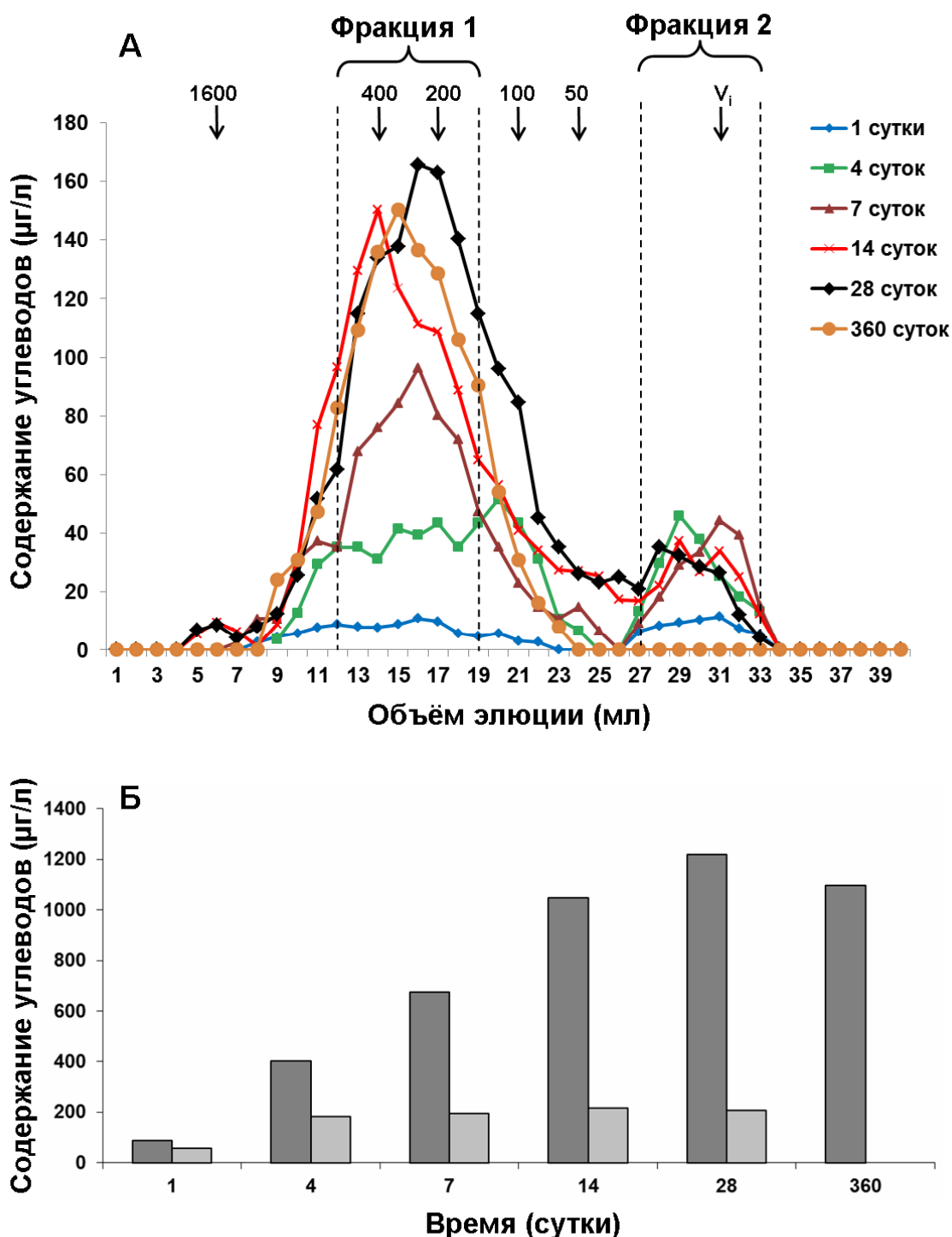


Рис. 7. Профили элюции (А) и содержание (Б) углеводов, накапливающихся в супернатантах голодающих культур *P. atrosepiticum* через 1 (синяя линия), 4 (зеленая линия), 7 (коричневая линия), 14 (красная

линия), 28 (черная линия) и 360 (оранжевая линия) суток после начала голодания. Разделение углеводов проводили на колонке с сефарозой CL-4B. В качестве маркеров молекулярной массы использованы пуллуланы (P) с молекулярной массой 1600, 400, 200, 100 и 50 кДа.  $V_i$  – объем растворителя внутри частиц геля. Содержание углеводов на рисунке Б приведено отдельно для более высокомолекулярной (темно-серый) и более низкомолекулярной (светло-серый) фракций. Пунктирными линиями на рисунке обозначены фракции, в которых определяли моносахаридный состав, приведенный в таблице 1: фракция 1 – объемы элюции 12-19 мл, фракция 2 – объемы элюции 27-33 мл. Указанные фракции (обозначены пунктирными линиями) соответствуют максимальному содержанию углеводов для каждого из двух выявленных на профиле элюции пиков.

После одного года голодания (титр КОЕ при этом составлял  $7,8 \times 10^4$  КОЕ/мл) в супернатантах культур детектировали углеводы только более высокомолекулярной фракции; низкомолекулярные углеводы при этом обнаружены не были (Рис. 7).

В состав более высокомолекулярной фракции ЭПС входили рамноза, галактоза и манноза в соотношении 1:2:1 (Табл. 1). Более низкомолекулярная фракция состояла из рамнозы, галактозы, глюкозы и маннозы в соотношении 2:1:4:3. Моносахаридный состав фракций существенно не менялся в процессе голодания (Табл. 1).

Таким образом, нами выяснено, что в условиях голодания в супернатантах голодающих культур накапливаются углеводы, в основном высокомолекулярные. Кроме того, в супернатантах также накапливались углеводы, элюируемые с колонки в объеме 27-33 мл, то есть в области минимальной разрешающей способности сорбента. В связи с этим выявленная более низкомолекулярная фракция могла включать в себя небольшие полимеры, олигомеры, а также мономеры.



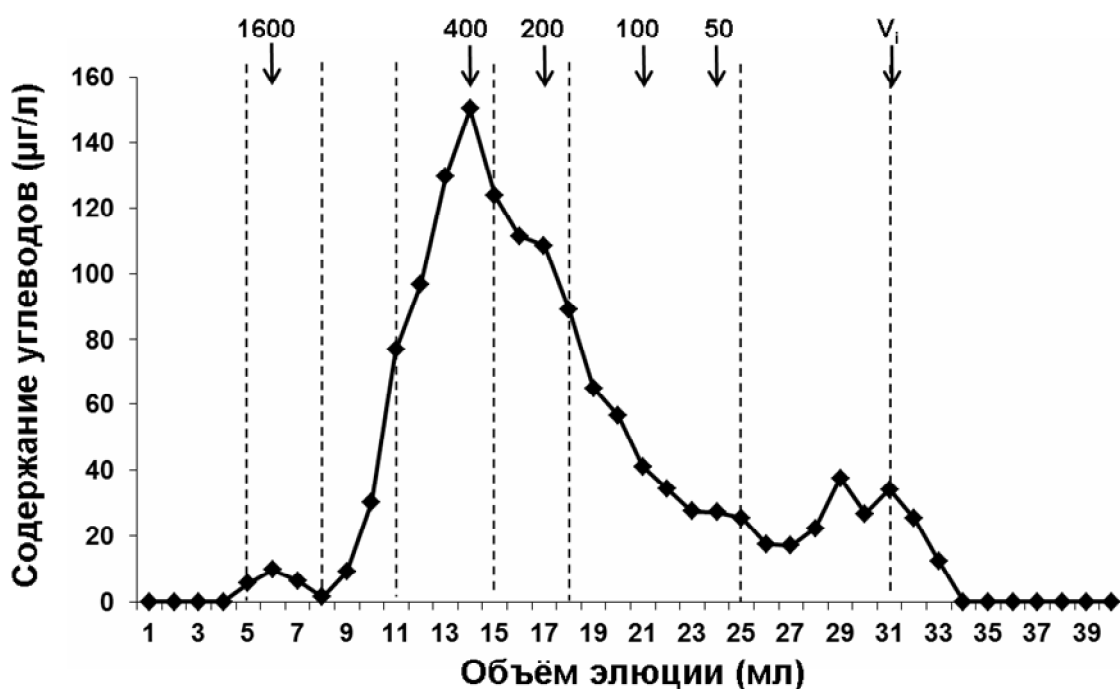
Табл. 1. Моносахаридный состав углеводов, содержащихся в супернатантах голодающих культур *P. atrosepticum* через 1, 4, 7, 14, 28 и 360 суток после начала голодания. Моносахаридный состав определяли дифференциально для двух выявленных фракций углеводов: 1) 50->400 кДа и 2) менее 50 кДа. Для каждого пика на профиле элюции (Рис. 7) анализировали фракции, соответствующие максимальному содержанию углеводов (обозначены пунктирными линиями на рисунке 7).

	Время инкубации (сутки)	Содержание моносахаридов (моль %)			
		Rha	Gal	Glc	Man
Фракция 1	1	22 ± 2	55 ± 4	1 ± 1	22 ± 2
	4	22 ± 1	55 ± 3	1 ± 1	22 ± 1
	7	21 ± 1	56 ± 3	1 ± 1	22 ± 2
	14	23 ± 3	53 ± 2	1 ± 1	23 ± 1
	28	23 ± 2	54 ± 3	1 ± 1	22 ± 3
	360	23 ± 2	53 ± 3	1 ± 1	23 ± 1
	Фракция 2	1	15 ± 1	10 ± 3	45 ± 3
4		20 ± 2	13 ± 1	48 ± 2	19 ± 1
7		14 ± 1	16 ± 2	50 ± 1	20 ± 3
14		15 ± 2	15 ± 2	45 ± 2	25 ± 2
28		16 ± 1	10 ± 1	44 ± 1	30 ± 3
360		0	0	0	0

Доля углеводов низкомолекулярной фракции в общем пуле углеводов, содержащихся в супернатанте, уменьшалась в процессе голодания, и на поздних сроках голодания (1 год) соединения этой фракции не детектировали. При этом содержание высокомолекулярных углеводов в супернатантах культур увеличивалось в процессе голодания. Более того, эти полимеры сохранялись в супернатантах даже на поздних сроках голодания (1 год). В связи с этим, с этого этапа исследования мы акцентировали свое внимание только на полимерах более высокомолекулярной фракции.

Поскольку на профиле элюции помимо основного пика (объем элюции 9-18 мл) присутствовало выраженное плечо (объем элюции 19-25 мл) (Рис.

8), для оценки степени гетерогенности целевой фракции углеводов по составу полимеров мы сравнивали моносahаридный состав в разных областях этого пика, в том числе в его плече.



Объём элюции (мл)	Содержание моносахаридов (моль%)			
	Rha	Gal	Glc	Man
5-8	9 ± 2	47 ± 2	40 ± 7	4 ± 1
9-11	24 ± 5	51 ± 6	1 ± 1	24 ± 2
12-15	23 ± 1	52 ± 2	1 ± 1	24 ± 2
16-18	23 ± 1	52 ± 2	1 ± 1	24 ± 1
19-25	20 ± 7	53 ± 15	6 ± 1	21 ± 3
26-31	16 ± 2	10 ± 2	44 ± 6	30 ± 7

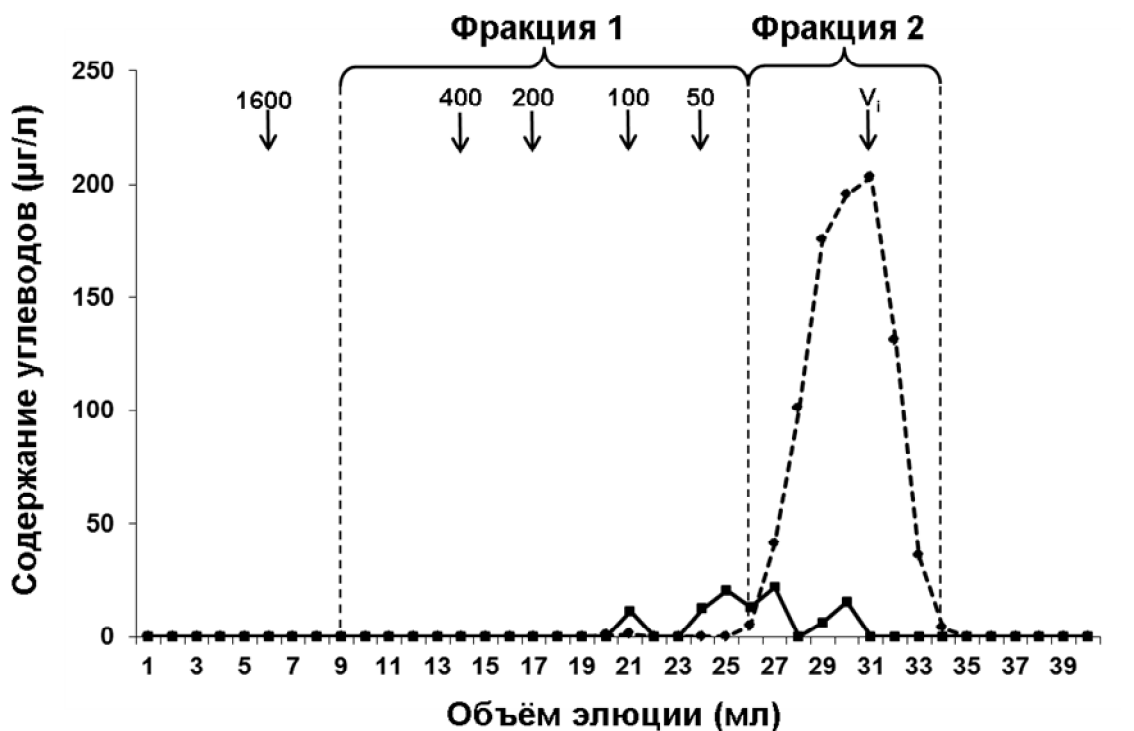
Рис. 8. Профиль элюции и моносahаридный состав углеводов, содержащихся в супернатантах голодающих культур *P. atrosepticum* через 14 суток после начала голодания. Разделение углеводов проводили на колонке с сефарозой CL-4В. В качестве маркеров молекулярной массы использованы пуллуланы (P) с молекулярной массой 1600, 400, 200, 100 и 50 кДа.  $V_i$  – объём растворителя внутри частиц геля. Фракции, в которых определяли моносahаридный состав, обозначены на рисунке пунктирными линиями.

Фракции, соответствующие объемам элюции 9-11 мл, 12-15 мл и 16-18 мл имели одинаковый моносакхаридный состав (рамноза, галактоза, манноза 1:2:1). Низкомолекулярная фракция (объем элюции 26-33 мл) состояла из рамнозы, галактозы, глюкозы и маннозы в соотношении 2:1:4:3. Полимеры, входящие в состав плеча (объем элюции 19-25 мл) основного пика (объем элюции 9-18 мл), состояли из рамнозы, галактозы, глюкозы и маннозы в соотношении 3:9:1:4. Отличие моносакхаридного состава в плече пика от состава основного пика, в частности появление глюкозы, свидетельствует о том, что в состав плеча входили не только целевые полимеры высокомолекулярной фракции, но и примесь углеводов более низкомолекулярной фракции. В связи с этим в дальнейшем для определения структуры регулярного звена ЭПС *P. atrosepticum* и для проверки свойств исследуемых полимеров нами были использованы полисахариды, элюируемые в объеме 9-18 мл.

Поскольку целевые полимеры (фракция 1, объем элюции 9-18 мл) были выявлены нами в супернатантах голодающих культур, в которых проходят процессы клеточного лизиса, необходимо было проверить, не являются ли они внутриклеточными метаболитами, высвобождающимися в культуральную жидкость из-за разрушения клеток. Для этого мы получили гомогенаты голодающих клеток и клеток стационарной фазы роста и провели экстракцию средой АВ (среда, которую использовали для получения голодающих культур). Затем мы удалили клеточный дебрис с помощью центрифугирования и фильтрования, и с полученным экстрактом провели все те же манипуляции, что и с супернатантами голодающих культур, в которых были обнаружены целевые полимеры (раздел 2.2). У выделенных таким образом углеводов (внутриклеточных и экстрагируемых средой АВ) определяли молекулярно-массовое распределение и моносакхаридный состав.

Основная часть углеводов, экстрагируемых средой АВ из гомогенатов клеток *P. atrosepticum* стационарной фазы роста, элюировала с колонки за

пределами области деления сорбента (сефароза CL-4B), что соответствует молекулярной массе менее 30 кДа (Рис. 9).



		Содержание моносахаридов (моль%)				
		Rha	Ara	Gal	Glc	Man
Клетки стационарной фазы	Фракция 1	37±3	10±3	28±3	18±1	7±1
	Фракция 2	1±1	26±2	15±2	56±3	2±1
Голодающие клетки	Фракция 1	1±1	11±2	40±3	28±1	20±1
	Фракция 2	9±1	14±2	18±1	47±3	12±2

Рис. 9. Профиль элюции и моносахаридный состав углеводов, экстрагируемых безуглеродной средой АВ из гомогенатов клеток стационарной фазы роста (пунктирная линия) и голодающих клеток (сплошная линия) *P. atrosepticum*. Разделение проводили на колонке с сефарозой CL-4B. В качестве маркеров молекулярной массы использованы пуллуланы (P) с молекулярной массой 1600, 400, 200, 100 и 50 кДа.  $V_i$  –

объем растворителя внутри частиц геля. Содержание углеводов приведено для количества клеток, находящихся в 1 литре культуры. Титры клеток в культурах на момент анализа составляли:  $3,1 \times 10^8$  КОЕ/мл для культуры стационарной фазы роста и  $2,8 \times 10^7$  КОЕ/мл для голодающей культуры (14 суток голодания). Вертикальными пунктирными линиями обозначены фракции, в которых анализировали моносахаридный состав.

Доминирующим моносахаридом в этой низкомолекулярной фракции была глюкоза (56 моль%); кроме того, в составе этой фракции были арабиноза (26 моль%), галактоза (15 моль%), манноза (2 моль%) и рамноза (1 моль%). При этом в высокомолекулярной фракции (50-400 кДа) были обнаружены лишь следовые количества углеводов, состоящих из рамнозы (37 моль%), арабинозы (10 моль%), галактозы (28 моль%), глюкозы (18 моль%), маннозы (7 моль%).

Из голодающих клеток *P. atrosepticum* (14 суток голодания) средой АВ экстрагировалось лишь следовое количество углеводов. Углеводы более высокомолекулярной фракции (50-400 кДа) состояли из рамнозы (1 моль%), арабинозы (11 моль%), галактозы (40 моль%), глюкозы (28 моль%), маннозы (20 моль%), а более низкомолекулярной (менее 50 кДа) – из рамнозы (9 моль%), арабинозы (14 моль%), галактозы (18 моль%), глюкозы (47 моль%), маннозы (12 моль%).

Таким образом, содержание высокомолекулярных углеводов в супернатантах голодающих культур *P. atrosepticum* было намного выше, чем высокомолекулярных углеводов, экстрагируемых средой АВ из клеточных гомогенатов. В дополнение к этому, моносахаридный состав экстраклеточных и внутриклеточных высокомолекулярных углеводов различался. Это дает основания считать, что высокомолекулярные полисахариды, выявленные в супернатантах голодающих культур *P. atrosepticum*, являются ЭПС. Кроме того, важно также отметить, что динамика титра КОЕ и содержания углеводов в супернатантах голодающих

культур также свидетельствует о том, что выявленные высокомолекулярные углеводы являются экстраклеточными полисахаридами, а не внутриклеточными метаболитами, высвобождающимися из клеток в процессе лизиса. Наибольшее увеличение содержания этих углеводов в культуральной жидкости происходило в тот период (4-14 суток голодания) (Рис. 7), когда титр КОЕ в культурах практически не менялся (Рис. 6). При этом наиболее выраженное снижение титра КОЕ (в первые сутки после начала голодания) не сопровождалось резким увеличением содержания углеводов в культуральной жидкости.

Таким образом, нами впервые выявлено, что представители рода *Pectobacterium* (*P. atrosepticum*) синтезируют ЭПС. Продукция этих полимеров репрессирована в ростовых условиях, но до какой-то степени активируется в процессе голодания. Возможность индукции синтеза ЭПС в стрессовых условиях ранее была продемонстрирована для других (не фитопатогенных) бактерий. Например, бактерии *Bacillus licheniformis* продуцировали больше ЭПС в присутствии токсичного для микроорганизма металла (хром), а также при повышенной температуре (Marx *et al.*, 2009). Кроме того, у психрофильных бактерий *Pseudoalteromonas sp.* синтез ЭПС активируется при отрицательных температурах (Nichols *et al.*, 2005). Индукция синтеза ЭПС представляется адекватным ответом на стрессовые условия, поскольку для этих полимеров достаточно широко продемонстрированы различные протекторные свойства (см. раздел 1.2.4.2).

В связи с тем, что синтез ЭПС *P. atrosepticum* индуцируется в отсутствие ростового субстрата для наработки целевых полимеров с целью характеристики их структуры и свойств мы использовали голодающие культуры. Такая модель для получения ЭПС, несмотря на достаточно низкую производительность – достаточно низкий выход ЭПС (около 1 мг с литра культуры с учетом потерь при выделении и очистке), имеет важное достоинство. В среде, используемой для получения голодающих культур,

отсутствуют экзогенные углеводы, что обеспечивает максимальную степень чистоты целевого препарата.

### 3.2. Расшифровка структуры регулярного звена ЭПС *P.*

#### *atrosepticum*

При анализе препарата ЭПС *P. atrosepticum* (фракция, соответствующая объему элюции 9-18 мл, см. раздел 3.1) с помощью ЯМР спектроскопии было выявлено, что регулярность структуры полимера (ситуация, при которой повторяющееся звено обеспечивает единственный набор сигналов ЯМР для каждого остатка моносахарида) замаскирована из-за присутствия в структуре одного из моносахаридных остатков нестехиометрического *O*-ацетата (сигнал  $\text{CH}_3$  при  $\delta$  21,6 м.д., Рис. 10 А). В связи с этим для установления точной структуры ЭПС *P. atrosepticum* были получены *O*-деацетилированные производные этих полимеров, для которых были записаны одномерные ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$  JMOD) и двумерные (COSY, TOCSY, HSQC, HMBC, ROESY) спектры ЯМР (Рис. 11). Полное отнесение сигналов на спектрах COSY, TOCSY и HSQC деацетилированного ЭПС *P. atrosepticum* позволило выявить наличие в структуре регулярного звена этого полисахарида семи спиновых систем: двух для остатков  $\alpha$ -галактопиранозы (G1 и G2), одной для остатка  $\alpha$ -маннопиранозы (M), одной для остатка  $\alpha$ -рамнопиранозы (R) и трех систем (H-1–H-3; H-5–H-8; H-1'–H-2'), принадлежащих десятиуглеродному разветвленному моносахариду – эрвиниозе (E, 3,6,8-тридезоксид-4-*C*-(*R*-1-гидроксиэтил)-*D*-гуло-октоза) (Рис. 12, Табл. 2).

Такой моносахарид как эрвиниоза, у которого к четвертому атому углерода гликозильного остатка присоединена восстановленная 3-гидроксибутиральдегидная группа (C(5)-C(8)-фрагмент) (Рис. 12), ранее был обнаружен в *O*-полисахариде (ОПС) *P. atrosepticum* GSPB 9205 (ранее *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* GSPB 9205) (Senchenkova *et al.*, 2005).

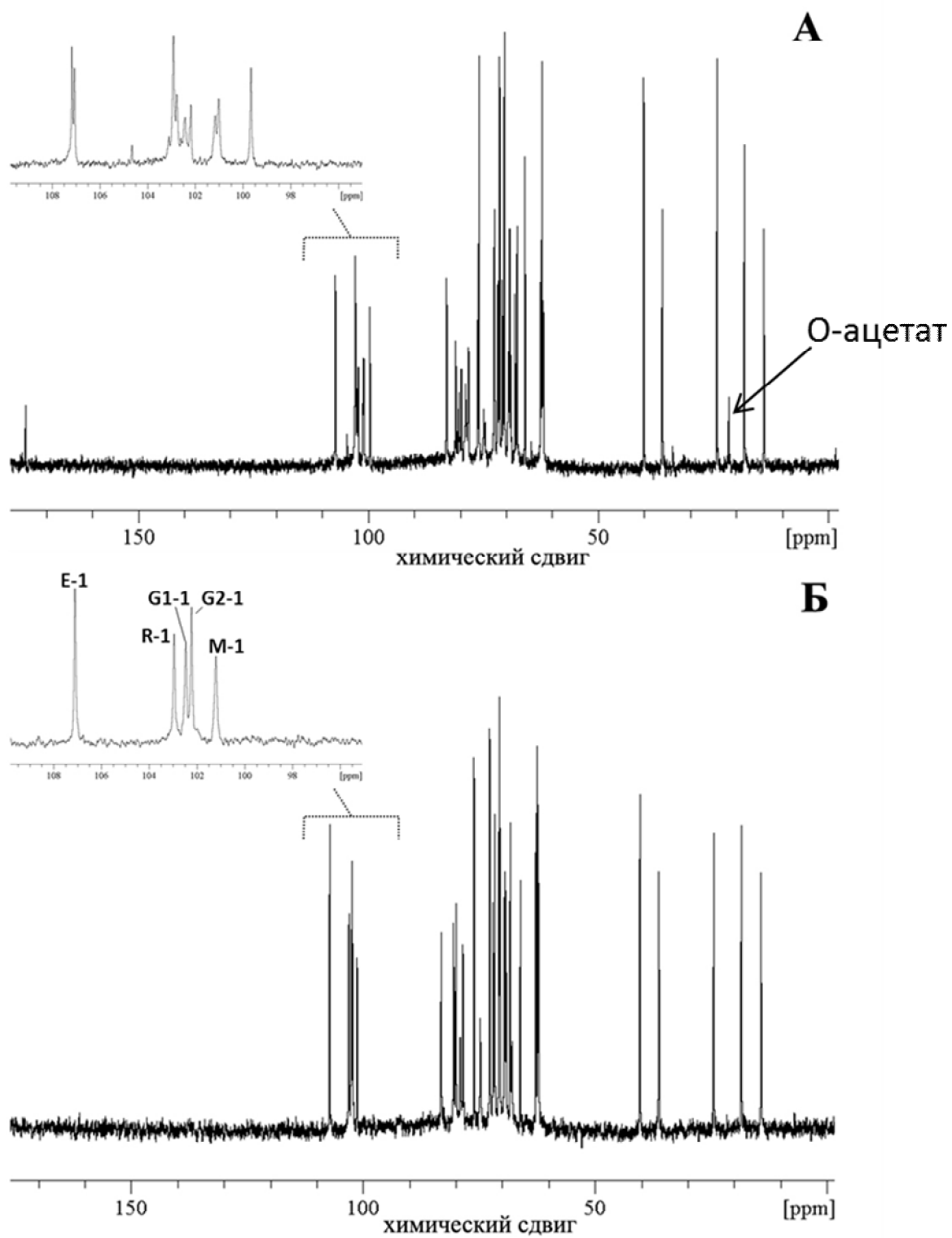


Рис. 10.  $^{13}\text{C}$  спектры исходного (А) и *O*-деацетилированного (Б) ЭПС *P. atrosepticum* SCRI1043.



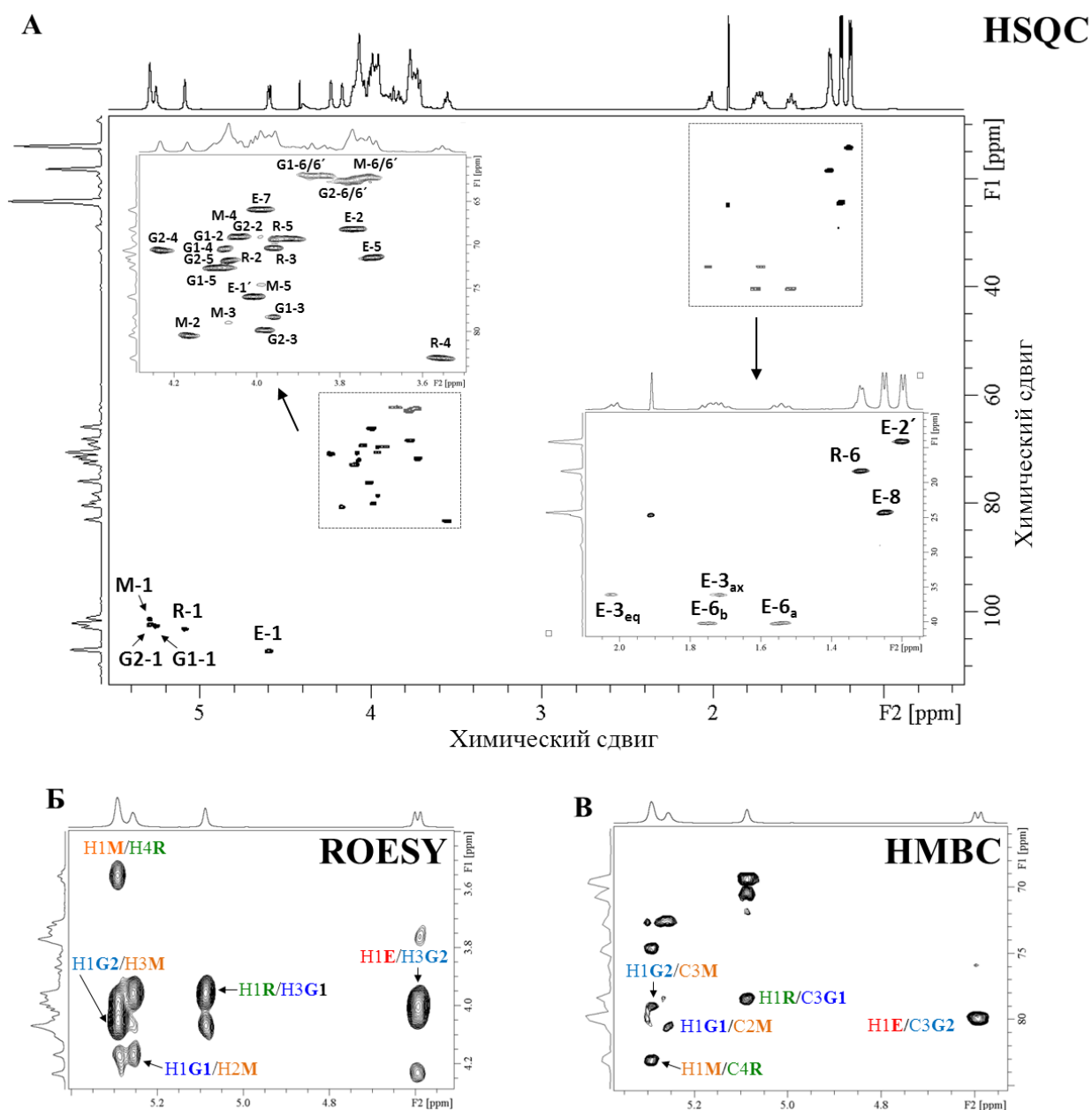


Рис. 11. Фрагменты HSQC (А), ROESY (Б), HMBC (В) ЯМР спектров *O*-деацетилированного ЭПС *P. atrosepticum* SCRI1043.

Разветвленные моносахариды были выявлены в составе ЛПС и ряда других бактерий: *Yersinia pseudotuberculosis*, *Budvicia aquatica*, *Pseudomonas mandelii*, *Burkholderia brasiliensis* – йерсиниоза (yersiniose; 3,6-дидезокси-4-С-[(S)-L-гидроксиэтил]-D-ксилогексоза) (Zubkov *et al.*, 1992; Mattos *et al.*, 2005; Zdrovenko *et al.*, 2012; Kondakova *et al.*, 2013), *Pseudoalteromonas independenta* – 5-ацетамидо-3,5,7,9-тетрадезоксиглико-7-формамино-*L*-глицеро-*L*-манно-

нонулозоновая кислота (Muldoon *et al.*, 2001), *Morganella morgani* и *Shewanella putrefaciens* – дисахарид, состоящий из 5-ацетамидино-7-ацетамидо-3,5,7,9-тетрадезоксид-Л-глицеро-Д-галакто-нон-2-улозоновой кислоты и 2-ацетамидо-4-С-(3'-карбоксамид-2',2'-дигидроксипропил)-2,6-дидезокси-Д-галактозы (шеванелоза, shewanellose) (Kilcoyne *et al.*, 2002; Shashkov *et al.*, 2002), а также у фитопатогенной бактерии, паразитирующей на гвоздичных, *Burkholderia caryophylli* – кариофилоза (caryophyllose, 3,6,10-тридезоксид-4-С-(D-глицеро-Л-гидроксиэтил)-о-эритро-Д-гуло-декоза) и кариоза (caryose, 4,8-цикло-3,9-дидезокси-Л-эритро-Д-идо-ноноза) (Adinolfi *et al.*, 1995; 1996). Однако на сегодняшний день нет информации, какие свойства могут придавать подобные моносахариды содержащим их полимерам.

Табл. 2. Химические сдвиги  $^{13}\text{C}$  и  $^1\text{H}$  (полужирный) в углеводных остатках ЭПС *P. atrosepticum* SCRI1043.

	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6				
	<b>H-1</b>	<b>H-2</b>	<b>H-3</b>	<b>H-4</b>	<b>H-5</b>	<b>H-6/6'</b>				
→3)-α-D-Galp-	102,4	70,3	78,3	70,3	72,6	62,7				
(1→ (G1)	<b>5,25</b>	<b>3,95</b>	<b>3,97</b>	<b>4,06</b>	<b>4,11</b>	<b>3,81/3,81</b>				
→3)-α-D-Galp-	102,2	69,1	79,8	70,6	72,6	62,8				
(1→ (G2)	<b>5,29</b>	<b>4,03</b>	<b>3,97</b>	<b>4,23</b>	<b>4,09</b>	<b>3,76/3,76</b>				
→2,3)-α-D-	101,1	80,4	78,9	67,6	74,5	61,8				
Manp-(1→ (M)	<b>5,29</b>	<b>4,16</b>	<b>4,06</b>	<b>4,04</b>	<b>3,99</b>	<b>3,72/3,72</b>				
→4)-α-L-Rhap-	102,9	71,8	69,3	83,0	69,3	18,2				
(1→ (R)	<b>5,08</b>	<b>4,06</b>	<b>3,95</b>	<b>3,55</b>	<b>3,91</b>	<b>1,31</b>				
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-1'	C-2'
	<b>H-1</b>	<b>H-2</b>	<b>H-3eq/ax</b>		<b>H-5</b>	<b>H-6A/B</b>	<b>H-7</b>	<b>H-8</b>	<b>H-1'</b>	<b>H-2'</b>
β-D-Erw-(1→	107,1	68,1	35,6	75,8	71,4	39,9	65,9	24,2	75,9	14,0
(E)	<b>4,59</b>	<b>3,76</b>	<b>2,00/1,70</b>		<b>3,73</b>	<b>1,54/1,73</b>	<b>3,99</b>	<b>1,25</b>	<b>4,01</b>	<b>1,19</b>

Для определения последовательности моносахаридных остатков в регулярном структурном звене ЭПС и выявления позиций замещения остатков проводили анализ корреляций аномерных протонов одного остатка и близко расположенных протонов (расстояние менее 5 Å) других остатков с

помощью спектроскопии ядерного эффекта Оверхаузера в системе вращающихся координат (ROESY) (Рис. 11 Б). Наличие связи подтверждали данными НМВС спектров по сигналам, соответствующим дальним корреляциям между аномерным атомом углерода одного остатка и протоном другого остатка, находящимся при атоме углерода, участвующего в образовании гликозидной связи (C-O-C-H) (Рис. 11 В).

Сопряжение совокупности всех данных, полученных с помощью ЯМР спектроскопии, и анализа моносахаридного состава ЭПС *P. atrosepticum* (раздел 3.1, Табл. 1) позволило установить, что остов регулярного звена этого полисахарида построен из трисахарида [ $\rightarrow 3$ )- $\alpha$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -L-Rhap-(1 $\rightarrow$ )], а боковые цепи, присоединенные к остаткам маннопиранозы в положении О-3, состоят из димера  $\beta$ -D-Erw-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ ) (Рис. 5).

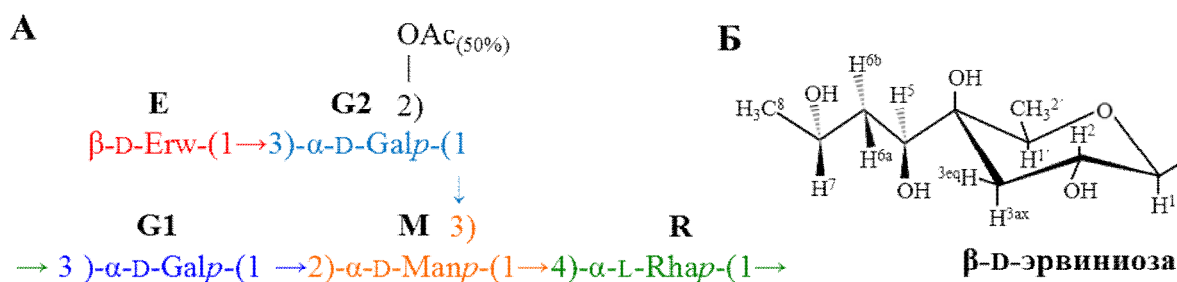


Рис. 12. Структура регулярного звена ЭПС *P. atrosepticum* SCRI1043 (А) и химическая структура эрвиннозы (Б).

Для определения положения ацетильных групп в структуре ЭПС *P. atrosepticum* проводили сопоставление  $^{13}\text{C}$  спектров исходного полисахарида и его деацетилированного производного. Отнесение смещенных сигналов (исходный полисахарид) дополнительно контролировали по HSQC и COSY спектрам. Сравнение  $^{13}\text{C}$  спектров ЭПС до и после деацетилирования позволило выявить существенное смещение положения химических сдвигов, относящихся к С-1 и С-2 атомам остатка галактопиранозы боковой цепи, в более слабое поле. Так, сигналы при  $\delta$  99.7 и  $\delta$  69.1 м.д., относящиеся к С-1 и

C-2 галактозы исходного полисахарида, смешались после деацетилирования до  $\delta$  102.2 и  $\delta$  71.4 м.д., соответственно (Рис. 10Б). На протонных спектрах были выявлены смещения (в более сильное поле) и для соответствующих протонов (H-1, H-2):  $\delta$  5.39 и  $\delta$  5.13 м.д. – для исходного ЭПС и  $\delta$  5.29 и  $\delta$  4.03 м.д. – для O-деацетилированного производного (спектры не приводятся). Выявленные изменения свидетельствуют об ацетилировании остатка галактозы боковой цепи полисахарида (G2) по O-2 положению (Рис. 12А). Степень изменения интенсивности сигнала C-2 предполагает, что в структуре ЭПС доля ацетилированной галактозы боковых цепей составляет порядка 50% (Рис. 10).

Установленная структура ЭПС *P. atrosepticum* SCRI1043 оказалась идентичной структуре ранее описанного O-полисахарида (ОПС) *P. atrosepticum* GSPB 9205 (ранее *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* GSPB 9205) (Senchenkova *et al.*, 2005). Это означает, что регулярные звенья ЭПС и ОПС *P. atrosepticum* имеют одинаковую структуру. Известно, что регулярные звенья ЭПС, ОПС и капсульных полисахаридов (КПС) могут иметь одинаковую структуру у одних видов бактерий, а у других могут различаться. Например, у *Rhizobium trifoli*, *Kingella kingae*, *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas campestris*, *Azospirillum lipoferum* регулярные звенья ОПС и ЭПС или ЭПС и КПС имеют разную структуру (Jansson *et al.*, 1979; Gidley *et al.*, 1987; Ray *et al.*, 1987; Torres *et al.*, 1993; Bukharov *et al.*, 1993; Stankowski *et al.*, 1993; Nimtz *et al.*, 1996; Molinaro *et al.*, 2003; Smol'kina *et al.*, 2010; Starr *et al.*, 2013). В то же время, у *Salmonella enteridis*, *Rhizobium meliloti*, *Erwinia futilulu*, *Azospirillum irakense*, *Sphingomonas* sp. ОПС и ЭПС или ЭПС и КПС имеют идентичную структуру (Reuber, Walker, 1993; Reinhold *et al.*, 1994; Chouly *et al.*, 1995; Yamazaki *et al.*, 1996; Videira *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2002; Fedonenko *et al.*, 2004, 2013; Snyder *et al.*, 2006). Функциональная роль таких сходств или различий в структуре поверхностных полисахаридов бактерий на сегодняшний день не выяснена.

Поскольку структура регулярного звена выделенного нами ЭПС оказалась идентична структуре регулярного звена *O*-полисахаридной цепи ЛПС *P. atrosepticum* GSPB 9205, мы проверили, не являются ли целевые полимеры ЛПС, а не ЭПС. Для этого мы сравнили содержание 2-кето-3-дезоксиктоновой кислоты (КДО) в препаратах ЛПС (метод выделения описан в разделе 2.5) и ЭПС *P. atrosepticum*. КДО представляет собой характерный для ЛПС восьмиуглеродный сахар, который связывает углеводную часть ЛПС (ОПС) с липидом А. В препарате ЛПС содержание КДО составило  $2,2 \pm 0,1\%$ ; при этом в препарате ЭПС были выявлены лишь следовые количества КДО. Кроме того, сотрудником ИБФРМ РАН Сигида Е.Н было показано, что у ЛПС *P. atrosepticum* и у выделенных нами ЭПС *P. atrosepticum* различалась электрофоретическая подвижность (Gorshkov *et al.*, 2017a). Таким образом, обнаруженные нами полисахариды *P. atrosepticum* (ЭПС) отличаются от ЛПС *P. atrosepticum*, несмотря на идентичность структуры регулярного звена этих полимеров.

### **3.3. Иммунодетекция ЭПС *P. atrosepticum* в сосудах ксилемы инфицированных растений**

На следующем этапе исследования мы выясняли, входят ли выявленные нами в культурах *in vitro* ЭПС *P. atrosepticum* в состав матрикса бактериальных эмболов – «многоклеточных» биопленкоподобных структур, образуемых клетками *P. atrosepticum* в сосудах первичной ксилемы инфицированных растений табака (Gorshkov *et al.*, 2014, 2016). Для проверки этого в сотрудничестве с с.н.с. ИБФРМ РАН к.б.н. Бурыгиным Г.Л. были получены кроличьи поликлональные антитела, специфичные к ЭПС *P. atrosepticum*. Бурыгиным Г.Л. была подтверждена специфичность полученных антител к ЭПС *P. atrosepticum*; в перекрестные реакции с полисахаридами клеточной стенки растений (ксилан, ксилоглюкан, арабинан, рамногалактуронан I, галактан, полигалактуроновая кислота, маннан) полученные антитела не вступали (Gorshkov *et al.*, 2017a).

Полученные поликлональные антитела, специфичные к ЭПС *P. atrosepticum*, были использованы для иммунодетекции целевых полимеров в сосудах ксилемы инфицированных *P. atrosepticum* растений табака (Рис. 13). После обработки срезов инфицированных *P. atrosepticum* растений табака первичными и вторичными антителами происходило интенсивное иммуномечение полостей сосудов ксилемы, колонизированных пектобактериями (Рис. 13 А); при этом особенно интенсивно метился внеклеточный матрикс (Рис. 13 Г, Д).

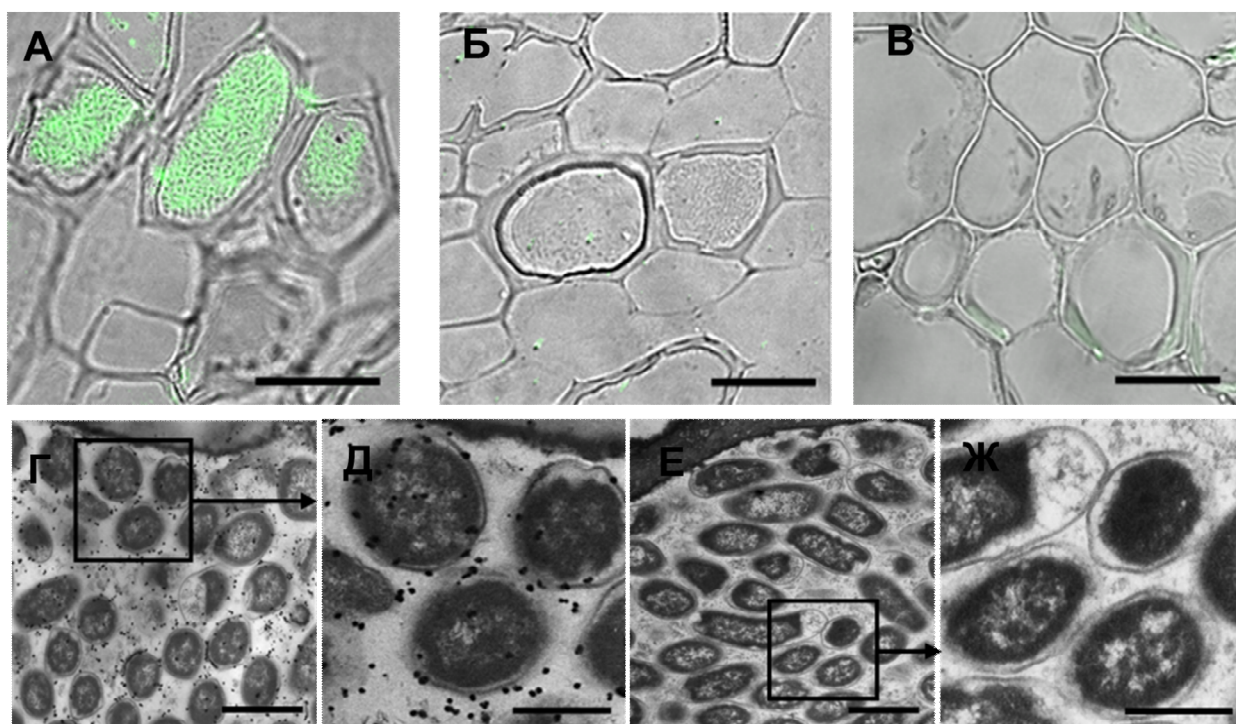


Рис. 13. Иммунодетекция ЭПС *P. atrosepticum* в сосудах первичной ксилемы растений табака, инфицированных *P. atrosepticum* (2 суток после инфицирования). Срезы инфицированных растений, обработанные и первичными и вторичными антителами – А, Г, Д. Срезы инфицированных растений, обработанные только первичными антителами – Б, Е, Ж. Срез неинфицированного растения, обработанный и первичными и вторичными антителами – В. Масштабная метка соответствует: А-В – 20 мкм, Г, Е – 1 мкм, Д, Ж – 0,5 мкм.

При обработке срезов инфицированных растений только вторичными (но не первичными) антителами иммуномечения не наблюдали (Рис. 13 Б, Е, Ж), так же как и на срезах неинфицированных растений, обработанных и первичными, и вторичными антителами (Рис. 13 В). Таким образом, нами продемонстрировано, что ЭПС действительно входят в состав экстраклеточного матрикса бактериальных эмболов, образуемых клетками *P. atrosepticum* в сосудах первичной ксилемы инфицированных растений.

Ранее было показано, что первичный матрикс бактериальных эмболов состоит из пектинового полисахарида растения-хозяина – рамногалактуронана I (РГ-I), точнее из его фрагментов (50-400 кДа) с низким уровнем замещения остова боковыми цепями из галактозы (Gorshkov *et al.*, 2016). Такие фрагменты образуются и высвобождаются из растительных клеточных стенок в результате восприимчивого ответа растения-хозяина (Tsers *et al.*, 2020) и экстрагируются буфером из гомогенизированных тканей растений (в отличие от «нативного» РГ-I, удерживаемого растительными клеточными стенками) (Gorshkov *et al.*, 2016). Однако по мере развития бактериальных эмболов фрагменты РГ-I постепенно разрушаются, и какие соединения могут потенциально поддерживать структурную целостность бактериального эмбола оставалось невыясненным. Наше исследование демонстрирует, что в качестве таких соединений могут, по-видимому, выступать ЭПС *P. atrosepticum*, которые по мере разрушения РГ-I накапливаются в составе матрикса бактериальных эмболов.

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

растительной клеточной стенки инфицированных *P. atrosepticum* растений картофеля и провели иммунодетекцию ЭПС *P. atrosepticum* в сосудах первичной ксилемы.

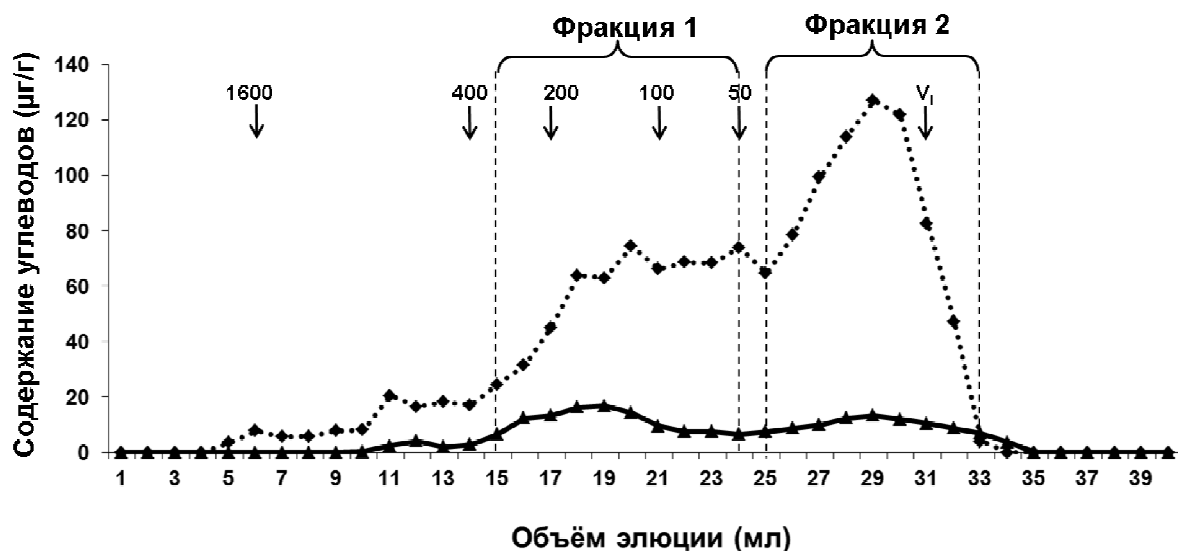
Содержание углеводов в буфер-экстрагируемой фракции стеблей инфицированных *P. atrosepticum* растений картофеля было в 6 раз больше, чем во фракции, полученной аналогичным образом из контрольных неинфицированных растений. При этом и для контрольных, и для инфицированных растений было выявлено две основные фракции буфер-экстрагируемых полисахаридов (Рис. 14), соответствующие молекулярным массам 50-400 кДа (фракция 1) и менее 50 кДа (фракция 2).

Согласно моносахаридному составу, более высокомолекулярная фракция (фракция 1, Рис. 14) контрольных растений в основном состояла из фрагментов РГ-I, поскольку соотношение содержания рамнозы и галактуроновой кислоты (Rha/GalA) было примерно равно единице, что характерно для остова РГ-I, состоящего из чередующихся остатков этих двух моносахаридов. В контрольных растениях у буфер-экстрагируемых фрагментов РГ-I была высокая степень замещения галактозными и арабинозными боковыми цепочками, о чем свидетельствует высокое содержание в этой фракции соответствующих моносахаридов (Gal, Ara). В более низкомолекулярной фракции (фракция 2, Рис. 14) контрольных растений доминировали фрагменты полигалактуроновой кислоты, поскольку соотношение Rha/GalA было 0,25.

В инфицированных растениях более высокомолекулярная фракция (фракция 1, Рис. 14) так же как и в контрольных растениях состояла преимущественной из фрагментов РГ-I (соотношение Rha/GalA $\approx$ 1); однако содержание углеводов в этой фракции в инфицированных растениях было более чем в 5 раз выше, чем в контрольных растениях. Кроме того, в контрольных растениях буфер-экстрагируемые фрагменты РГ-I имели высокую степень замещения галактозными боковыми цепочками (соотношение Gal/Rha $\approx$ 3,2), а в инфицированных растениях степень



замещения остова буфер-экстрагируемого РГ-I была значительно меньше (соотношение Gal/Rha $\approx$ 0,7). Более низкомолекулярная фракция инфицированных растений (фракция 2, Рис. 14) содержала преимущественно полигалактуроновую кислоту (соотношение Rha/ GalA $\approx$ 0,25).



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

Рис. 14. Профили элюции и моносахаридный состав углеводов, экстрагируемых 50 мМ Na/K-фосфатным буфером из гомогенизированных тканей стеблей контрольных неинфицированных (сплошная линия) и инфицированных *P. atrosepticum* растений картофеля (3 суток после инфицирования). Разделение углеводов проводили на колонке с сефарозой CL-4B. В качестве маркеров молекулярной массы использованы пуллуланы (P) массой 1600, 400, 200, 100 и 50 кДа.  $V_i$  – объем растворителя внутри частиц геля. Фракции, в которых определяли моносахаридный состав, обозначены на рисунке пунктирными линиями.

Таким образом, в инфицированных растениях картофеля (так же как и в инфицированных растениях табака, Gorshkov *et al.*, 2016) при развитии мягких гнилей, вызываемых *P. atrosepticum*, накапливаются высокомолекулярные (50-400 кДа) фрагменты РГ-I, остов которых имеет низкий уровень замещения галактозными боковыми цепочками. Эти фрагменты не удерживаются растительными клеточными стенками (в отличие от «встроенного» в клеточные стенки РГ-I) и экстрагируются буфером из гомогенизированных растительных тканей. Такие низкозамещенные и не удерживаемые клеточными стенками фрагменты РГ-I формируют первичный матрикс бактериальных эмболов, образуемых клетками *P. atrosepticum* в сосудах ксилемы инфицированных растений (Gorshkov *et al.*, 2016, 2021c).

ЭПС *P. atrosepticum* не детектировали в контрольных неинфицированных растениях картофеля с помощью иммуномечения поликлональными антителами, специфичными к этим полимерам (Рис. 15А).

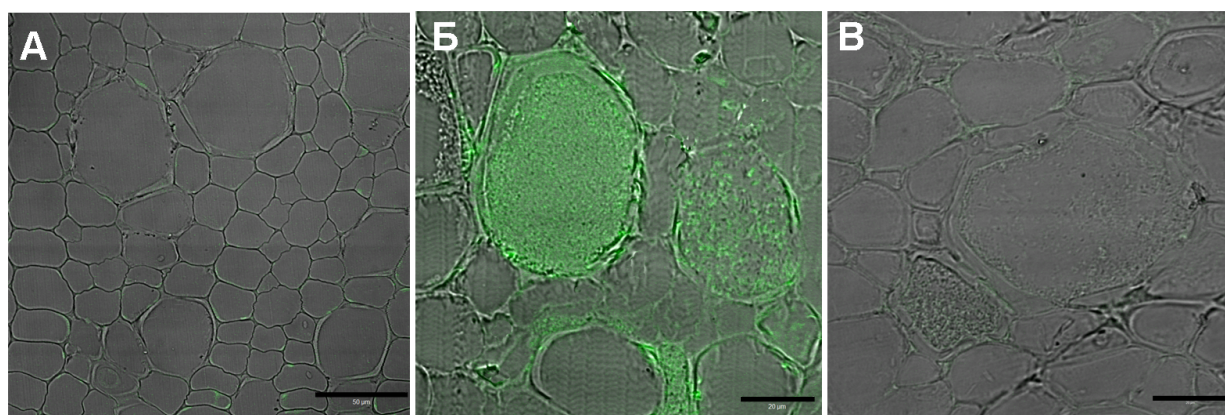


Рис. 15. Иммунодетекция ЭПС *P. atrosepticum* в сосудах первичной ксилемы растений картофеля, инфицированных *P. atrosepticum* (3 суток после инфицирования). Срез неинфицированного растения, обработанный и первичными, и вторичными антителами – А. Срезы инфицированных растений, обработанные и первичными, и вторичными антителами (Б) или только вторичными (В) антителами. Масштабная метка соответствует: А – 50 мкм, Б, В – 20 мкм.

После обработки срезов инфицированных *P. atrosepticum* растений картофеля первичными и вторичными антителами происходило интенсивное иммуномечение полостей сосудов ксилемы (Рис. 15Б), содержащих сформированные бактериальные эмболы (Рис. 16). При обработке срезов инфицированных растений только вторичными (но не первичными) антителами иммуномечения не наблюдали (Рис. 15В).

Таким образом, нами продемонстрировано, что ЭПС *P. atrosepticum* действительно входят в состав экстраклеточного матрикса бактериальных эмболов, образуемых клетками этого микроорганизма в сосудах первичной ксилемы растений табака (неспецифичный хозяин). Кроме того, нами показано, что в инфицированных *P. atrosepticum* растениях картофеля (специфичный хозяин) тоже формируются бактериальные эмболы. При этом в инфицированных растениях картофеля, как и в растениях табака, накапливаются компоненты матрикса бактериальных эмболов: высокомолекулярные фрагменты РГ-I с низкозамещенные галактозными цепочками, неудерживаемые растительными клеточными стенками, а также ЭПС *P. atrosepticum*.

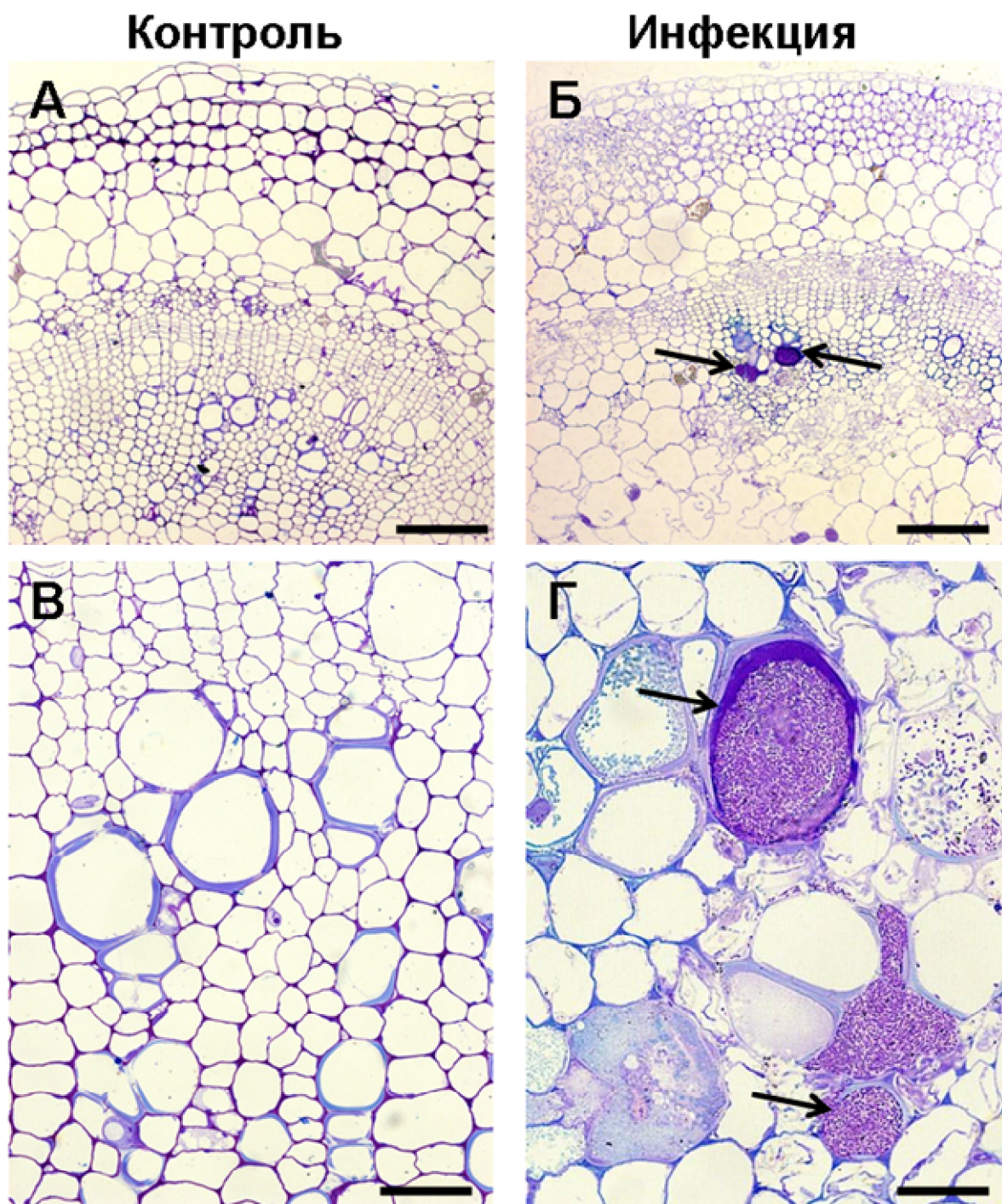


Рис. 16. Срезы контрольных неинфицированных (А, В) и инфицированных клетками *P. atrosepticum* (Б, Г) растений картофеля (3 суток после инфицирования). Бактериальные эмболы в сосудах первичной ксилемы инфицированных растений обозначены стрелками. Срезы окрашены метиленовым синим. Масштабная метка соответствует: А, Б – 200 мкм, В – 50 мкм, Г – 25 мкм.



### 3.4. Определение вязкости растворов ЭПС *P. atrosepticum*

Растворы ЭПС *P. atrosepticum* в концентрациях 1,25-5,0% в исследуемом диапазоне скоростей сдвига (1-120 с<sup>-1</sup>) проявляли неньютоновские свойства, а именно увеличение скорости сдвига приводило к снижению эффективной вязкости (псевдопластичное поведение). Однако при более низкой концентрации полимеров (0,625%) для растворов ЭПС было характерно ньютоновское поведение (когда увеличение скорости сдвига не оказывало влияние на значение эффективной вязкости). Максимальное значение эффективной вязкости растворов ЭПС *P. atrosepticum* ( $\eta_0$ ) определено теоретически с помощью модели Кросса (Табл. 3, Рис. 17)):

$$\eta = \frac{\eta_0 - \eta_\infty}{1 + (\lambda \dot{\gamma})^n} + \eta_\infty$$

Где  $\eta_0$  и  $\eta_\infty$  – значения вязкости при  $\dot{\gamma} \rightarrow 0$  и  $\dot{\gamma} \rightarrow \infty$ ;  $\lambda$  – характерное время раствора;  $n$  – показатель степени.

Табл. 3. Параметры модели Кросса для различных концентраций ЭПС *P. atrosepticum*.

Концентрация ЭПС (%)	$\eta_0$ (мПа·с)	$\eta_\infty$ (мПа·с)	$\lambda$ (с)	$n$
5,0	16,973	15,839	0,2785	0,9557
2,5	11,093	10,546	0,0499	1,3592
1,25	4,893	4,688	0,0566	1,6465
0,625	2,362	2,362	-	-

Полученные результаты свидетельствуют о том, что увеличение концентрации ЭПС *P. atrosepticum* приводит к повышению вязкости водного раствора. Псевдопластичное поведение водного раствора ЭПС становится более выраженным по мере увеличения концентрации ЭПС. Различия между максимальным ( $\eta_0$ ) и минимальным ( $\eta_\infty$ ) значениями эффективной вязкости в

исследуемом диапазоне скоростей сдвига достаточно небольшое (например, для 5% раствора ЭПС составляет менее 7%).

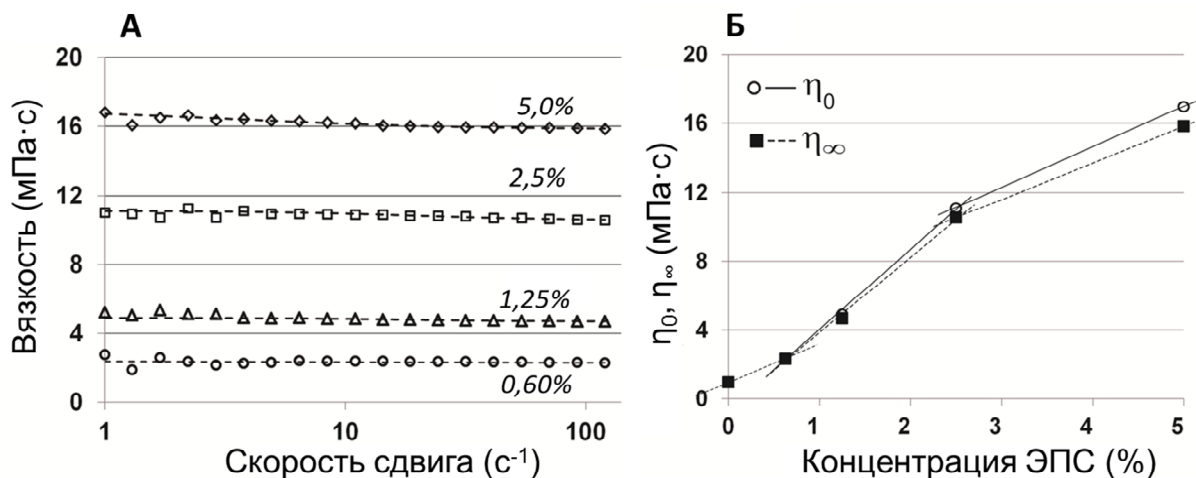


Рис. 17. Эффективная вязкость водных растворов ЭПС *P. atrosepticum*. А – зависимость эффективной вязкости растворов ЭПС *P. atrosepticum* от скорости сдвига аппроксимирована моделью Кросса. Б – зависимость теоретических значений максимальной ( $\eta_0$ ) и минимальной ( $\eta_\infty$ ) вязкости в исследуемом диапазоне скоростей сдвига от концентрации ЭПС *P. atrosepticum*. Измерения проводили при 20 °С. Нулевой концентрации ЭПС соответствует значение вязкости дистиллированной воды (1,002 мПа·с).

Мы провели сравнительный анализ эффективной вязкости растворов ЭПС *P. atrosepticum* (наше исследование) и растворов ЭПС других фитопатогенных бактерий (ранее опубликованные данные) (Табл. 4). Наибольшая вязкость (вязкость при нулевой скорости сдвига,  $\eta_0$ ) характерна для водных растворов ксантана, синтезируемого видами рода *Xanthomonas*, а также водных растворов ЭПС, продуцируемого *Pantoea sp* (Wyatt *et al.*, 2009; Niknezhad *et al.*, 2018). Вязкости растворов ксантана и ЭПС *Pantoea sp* превышают вязкость раствора ЭПС *P. atrosepticum* на 3-4 порядка величин (при сходных концентрациях полимеров). При этом растворы альгината, синтезируемого *Pseudomonas oleovorans* (Freitas *et al.*, 2009), сопоставимы по уровню вязкости с растворами ЭПС *P. atrosepticum* (Табл. 4).

Табл. 4. Вязкости растворов ЭПС разных фитопатогенных бактерий. В четырех колонках (со 2 по 5) указаны значения эффективной вязкости для диапазона концентраций ЭПС в растворах: 2) 0,5-0,6%, 3) 1,0-1,2%, 4) 2-3%, 5) 4-10%; точная концентрация приведена для каждого конкретного случая (указано курсивом в скобках в каждой ячейке). Для каждого варианта представлено три значения вязкости (мПа·с): вязкость при нулевой скорости сдвига ( $\eta_0$ ), при скорости сдвига  $10 \text{ с}^{-1}$  ( $\eta_{10}$ ) и при скорости сдвига  $100 \text{ с}^{-1}$  ( $\eta_{100}$ ). В тех случаях, когда значение для  $\eta_0$  не было представлено в опубликованных данных, за  $\eta_0$  принимали максимальное значение вязкости.

Название ЭПС, вид бактерии	Диапазон концентраций (%)				Ссылка
	0,4-0,6	1-1,25	2-3	4-10	
	Вязкость, $\eta_0/\eta_{10}/\eta_{100}$ (мПа·с)				
ЭПС, <i>Pectobacterium atrosepticum</i>	2,4 / 2,4 / 2,4 (0,625%)	4,9 / 4,7 / 4,8 (1,25%)	11 / 11 / 11 (2,5%)	17 / 16 / 16 (5%)	Наше исследование
ЭПС80, <i>Erwinia chrysanthemi</i> *	32 / 32 / 23 (0,5%)				Ding <i>et al.</i> , 2003
ЭПС9, <i>Erwinia chrysanthemi</i> *	112 / 109 / 47 (0,5%)				Ding <i>et al.</i> , 2003
Леван, <i>Erwinia amylovora</i>			44 / 38 / 33 (2%)	101700 / 20600 / 4387 (8%)	Peng <i>et al.</i> , 2019
CAS ЭПС, <i>Rhizobium radiobacter</i>			102 / 102 / 27 (2%)	186 / 186 / 43 (6%)	Andhare <i>et al.</i> , 2017
Альгинат, <i>Pseudomonas oleovorans</i>			-	26 / 25 / 25 (10%)	Freitas <i>et al.</i> , 2009
Леван, <i>Brenneria sp.</i>			0,6 / 0,6 / 0,6 (3%)	643 / 26 / 12 (6%)	Xu <i>et al.</i> , 2018
Сукциногликан, <i>Agrobacterium radiobacter</i>	29 / 17 / 5 (0,5%)	37 / 33 / 7,4 (1%)	112 / 95 / 25 (2%)		Moosavi-Nasab <i>et al.</i> , 2012
ЭПС, <i>Pantoea sp.</i>	1250 / 1250 / 1250 (0,5%)	34300 / 17180 / 2500 (1%)	61200 / 30000 / 2600 (2%)		Niknezhad <i>et al.</i> , 2018
Ксантан, <i>Xanthamonas sp.</i>	39000 / 343 / 62 (0,4%)				Wyatt <i>et al.</i> , 2009
ЭПС S10, <i>Rhizobium radiobacter</i>	4400 / 173 / 51 (0,5%)	$1,4 \times 10^6$ / 6373 / 576 (1%)			Zhou <i>et al.</i> , 2014

Важно, что у проанализированных нами водных растворов ЭПС псевдопластичное поведение выражено в разной степени. Например, 0,4% водный раствор ксантана имеет вязкость при нулевой скорости сдвига 39000 мПа·с, однако вязкость этого же раствора при скорости сдвига  $100 \text{ с}^{-1}$  в 600

раз меньше (62 мПа·с) (Wyatt *et al.*, 2009). Такая же тенденция особенно отчетливо проявлялась для водных растворов левана *Erwinia amylovora* и ЭПС *Pantoea sp.* (Niknezhad *et al.*, 2018; Peng *et al.*, 2019, Табл. 4). При этом для исследуемых нами водных растворов ЭПС *P. atrosepticum* различия между вязкостями при нулевой скорости сдвига и при скорости сдвига  $100 \text{ с}^{-1}$  были менее 7% (Табл. 3, 4). Похожая ситуация была характерна и для растворов альгината *P. oleovorans* (Freitas *et al.*, 2009) (Табл. 4).

Небольшое различие между эффективной вязкостью при нулевой скорости сдвига и при скорости сдвига  $100 \text{ с}^{-1}$  в какой-то степени «уравнивает» ЭПС *P. atrosepticum* с некоторыми другими ЭПС с точки зрения обеспечения вязкости. Так, вязкость 6% левана *Brenneria sp.* при нулевой скорости сдвига (643 мПа·с) почти в 38 раз больше вязкости 5% ЭПС *P. atrosepticum* при нулевой скорости сдвига (17 мПа·с); при этом вязкость 5% раствора ЭПС *P. atrosepticum* при скорости сдвига  $100 \text{ с}^{-1}$  (16 мПа·с) даже выше, чем аналогичный параметр у 6% раствора левана (12 мПа·с) (Табл. 4). У 2% раствора сукциногликана *Agrobacterium radiobacter* вязкости при нулевой скорости сдвига и при скорости сдвига  $100 \text{ с}^{-1}$  (25 и 112 мПа·с, соответственно) различаются в 4,5 раза, в то время как у 2,5% раствора ЭПС *P. atrosepticum* эти параметры (10,9 и 11,1, соответственно) различаются лишь на 1,5%. Другими словами, структура раствора ЭПС *P. atrosepticum* (а также альгината *P. oleovorans*) в состоянии покоя существенно не отличается от упорядоченной структуры раствора, возникающей из-за сдвигового напряжения, которое, в частности, может создаваться током жидкости. Это означает, что водные растворы некоторых ЭПС (в том числе ЭПС *P. atrosepticum*), несмотря на то, что характеризуются небольшими значениями эффективной вязкости, могут поддерживать этот уровень вязкости даже при интенсивном воздействии сдвигового течения омываемой жидкости. Это свойство ЭПС, по всей видимости, позволяет бактериям противостоять периферийному омыванию жидкости, что особенно



важно для фитопатогенов, колонизирующих проводящие воду сосуды ксилемы растения-хозяина.

### **3.5. Оценка способности ЭПС *P. atrosepticum* к формированию супрамолекулярных агрегатов**

Способность ЭПС *P. atrosepticum* к образованию агрегатов оценивали, определяя гидродинамический радиус частиц, формируемых целевыми полимерами при разных концентрациях (0,05%-5%), с помощью динамического светорассеяния. При низких концентрациях (0,05%) молекулы ЭПС *P. atrosepticum* формировали два типа частиц со средними гидродинамическими радиусами 11,4 нм (малые частицы,  $R_3$ ) и 60,3 нм (средние частицы,  $R_2$ ) (Рис. 18). Гидродинамический радиус средних частиц монотонно увеличивался по мере увеличения концентрации полимера в растворе и составлял 78,0, 92,5, 125,3, 168,0, 264,0 и 496,3 нм при концентрациях 0,15, 0,31, 0,62, 1,25, 2,5 и 5,0%, соответственно. При наибольших (из проанализированных) концентрациях ЭПС *P. atrosepticum* (2,5 и 5,0%) в растворе также формировались крупные агрегаты с гидродинамическим радиусом более 8000 нм ( $R_1$ ) (Рис. 18).

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

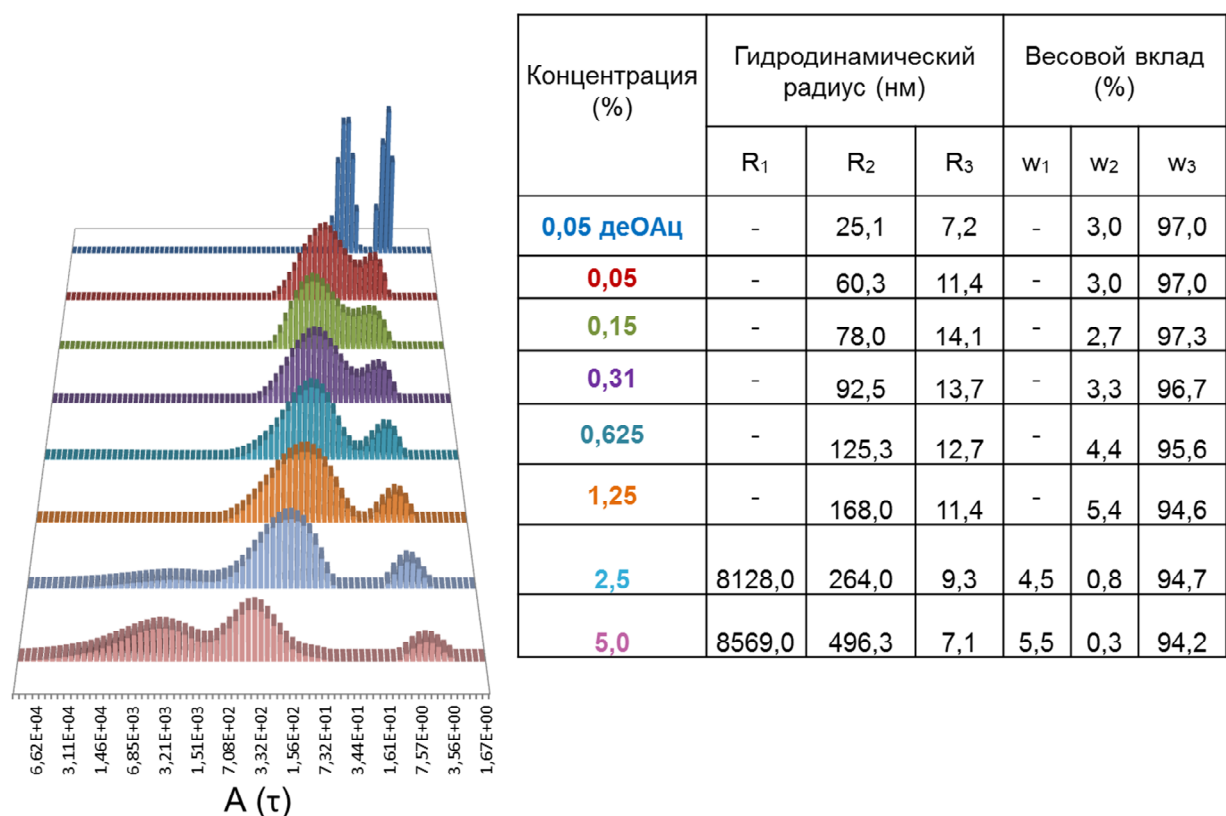


Рис. 18. Гидродинамический радиус (R) и весовой вклад (w) в общий уровень светорассеяния частиц ЭПС *Pectobacterium atrosepticum*, образующихся в водном растворе при разных концентрациях полимеров. A (τ) – амплитуда от времени. 0,05 деОАц – данные для частиц деацетилированной формы ЭПС при концентрации 0,05%. Весовые вклады частиц в общий уровень светорассеяния рассчитаны по формуле Шибаямы.

Для того чтобы получить информацию об «элементарных» частицах ЭПС *P. atrosepticum* мы попытались разрушить агрегаты целевых полимеров с помощью нагревания (90 °C), высокой осмотичности (3 М KCl), а также ультразвука (37 кГц, 80 °C, 1 ч). Однако ни один из перечисленных вариантов воздействия не приводил к уменьшению гидродинамического радиуса агрегатов.

Известно, что модифицирующие группы, в том числе ацетильные, вносят вклад в агрегацию молекул различных полисахаридов (Lima *et al.*, 2018). У ЭПС *P. atrosepticum* остатки галактозы в боковых цепях замещены ацетильными группами (раздел 3.2). В связи с этим мы предположили, что

эти группы могут обеспечивать агрегацию молекул ЭПС *P. atrosepticum*. Для проверки этого предположения мы проанализировали гидродинамические радиусы частиц деацетилизованной формы ЭПС (деАОц). Деацетилизованные ЭПС, как и нативные (ацетилизованные), формировали два типа частиц. Однако гидродинамические радиусы частиц деацетилизованных ЭПС были меньше (7,2 и 25,1 нм), чем нативных полимеров (11,4 и 60,3) (Рис. 14). Это означает, что ацетильные группы вносят вклад в агрегацию молекул ЭПС *P. atrosepticum*.

Способность к формированию агрегатов была ранее продемонстрирована на примере ЭПС фитопатогенных бактерий отличных от *P. atrosepticum*: *Rhizobium radiobacter*, *Xanthomonas sp.* и *Brenneria sp.* (Cai *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2018; Kavitate *et al.*, 2019). Размеры частиц ЭПС *Brenneria sp.* были около 90 нм и существенно не различались при концентрациях полимеров 0,1% и 1% (Xu *et al.*, 2018). ЭПС *R. radiobacter* и *Xanthomonas sp.* формировали достаточно крупные агрегаты с гидродинамическими радиусами около 1000 и 800 нм, соответственно (Cai *et al.*, 2017; Kavitate *et al.*, 2019). Однако размеры агрегатов этих ЭПС были проанализированы только при одной концентрации (0,5 % для ЭПС *R. radiobacter* и 0,2% для ксантана *Xanthomonas sp.*), и поэтому неизвестно, различается ли размер агрегатов этих полисахаридов при их разных концентрациях. В нашем исследовании мы проанализировали размеры частиц ЭПС *P. atrosepticum* в широком диапазоне концентраций (0,05-5%), благодаря чему нам удалось описать динамику частиц ЭПС при увеличивающейся концентрации полимеров и выявить крупные молекулярные агрегаты с гидродинамическим радиусом более 8000 нм.

Таким образом, нами выяснено, что ЭПС *P. atrosepticum* обладают такими свойствами (способность увеличивать вязкость водного раствора (раздел 3.4) и формировать крупные супрамолекулярные агрегаты (раздел 3.5)), которые могут обеспечить структурную целостность бактериальных эмболов (даже когда их первичный матрикс из фрагментов пектинового

полисахарида рамногалактуронана I разрушается). К сожалению, мы не можем определить точную концентрацию ЭПС *P. atrosepticum* в составе матрикса бактериальных эмболов или в целом *in planta*. Однако анализируемые нами концентрации (даже самые большие), судя по всему, являются физиологическими. Из голодающих культур мы выделяли значительно меньшее количество очищенного препарата ЭПС – 1-1,5 мг/л (0,0001%) (раздел 3.1). Однако в голодающих культурах титр клеток примерно в 50 меньше, чем титр клеток в инфицированных растениях (Gorshkov *et al.*, 2014). При этом распределение бактериальных клеток в тканях инфицированных растений неравномерное, и в составе бактериальных эмболов плотность клеток *P. atrosepticum* как минимум на порядок величин (а то и выше) больше, чем в среднем в тканях растения-хозяина (Рис. 2). Кроме того, удельная (в пересчете на одну бактериальную клетку) продукция ЭПС *in planta* примерно в пять раз больше, чем *in vitro* (Gorshkov *et al.*, 2017a). В дополнение к этому, при выделении ЭПС из супернатантов культур на первом этапе мы удаляли бактериальные клетки, с поверхностью которых может быть ассоциировано большее количество ЭПС, чем находится в растворе, а очистка препарата, безусловно, приводила к его частичной потере. Принимая все это во внимание можно сделать заключение, что анализируемые концентрации ЭПС (в том числе самые высокие) характерны для матрикса бактериальных эмболов.

### **3.6. Анализ антиоксидантных свойств ЭПС *P. atrosepticum***

Полисахариды, в том числе ЭПС, могут служить в качестве доноров электронов и обеспечивать таким образом детоксикацию АФК. При этом важную роль в детерминировании антиоксидантных свойств ЭПС могут играть модифицирующие группы, в том числе ацетильные (Andrew, Jayaraman, 2020). Образование бактериальных эмболов клетками *P. atrosepticum* сопряжено с увеличением уровня АФК в сосудах первичной ксилемы (Gorshkov *et al.*, 2016); поэтому наличие в составе матрикса

бактериальных эмболов соединений с антиоксидантными свойствами представляется необходимым для успешного выживания клеток пектобактерий. В связи с этим мы предположили, что ЭПС *P. atrosepticum* могут выполнять функцию антиоксидантов.

Для проверки этого предположения мы сравнили процессы окисления салицилата натрия гидроксил-радикалом, пирогаллола супероксид-радикалом, а также перекисного окисления липидов в присутствии и в отсутствие нативных или деацетилованных ЭПС *P. atrosepticum*. ЭПС *P. atrosepticum* подавляли окисление салициловой кислоты гидроксил-радикалом на 10, 22 и 27 % при концентрациях 0,02, 0,04 и 0,08 %, соответственно (Рис. 19А). Деацетилованные ЭПС в значительно меньшей степени ингибировали окисление салицилата натрия и только в наибольшей из проанализированных концентрации.

В наибольшей степени антиоксидантные свойства ЭПС *P. atrosepticum* были выражены в отношении супероксид-радикала. ЭПС подавляли автоокисление пирогаллола на 46, 64 и 71 % при концентрациях 0,02, 0,04 и 0,08 %, соответственно (Рис. 19Б). Деацетилованные ЭПС не приводили к снижению уровня автоокисления пирогаллола. Уровень перекисного окисления липидов был меньше на 11, 22, и 32% при концентрациях ЭПС 0,02, 0,04 и 0,08 %, соответственно; при этом деацетилованные ЭПС не влияли на перекисное окисление липидов (Рис. 19В). Таким образом, нами продемонстрировано, что ЭПС *P. atrosepticum* служат в качестве ловушек АФК, и это свойство во многом определяется наличием ацетильных групп в составе ЭПС. Способность обеспечивать детоксикацию АФК широко распространена среди ЭПС разных бактерий (Yildiz *et al.*, 2018; Andrew, Jayaraman, 2020; Nguyen *et al.*, 2020); однако среди ЭПС фитопатогенных бактерий только для ксантана *Xanthomonas sp.* и ЭПС *P. agglomerans* было продемонстрировано такое свойство (Wang *et al.*, 2007; Sran *et al.*, 2019).

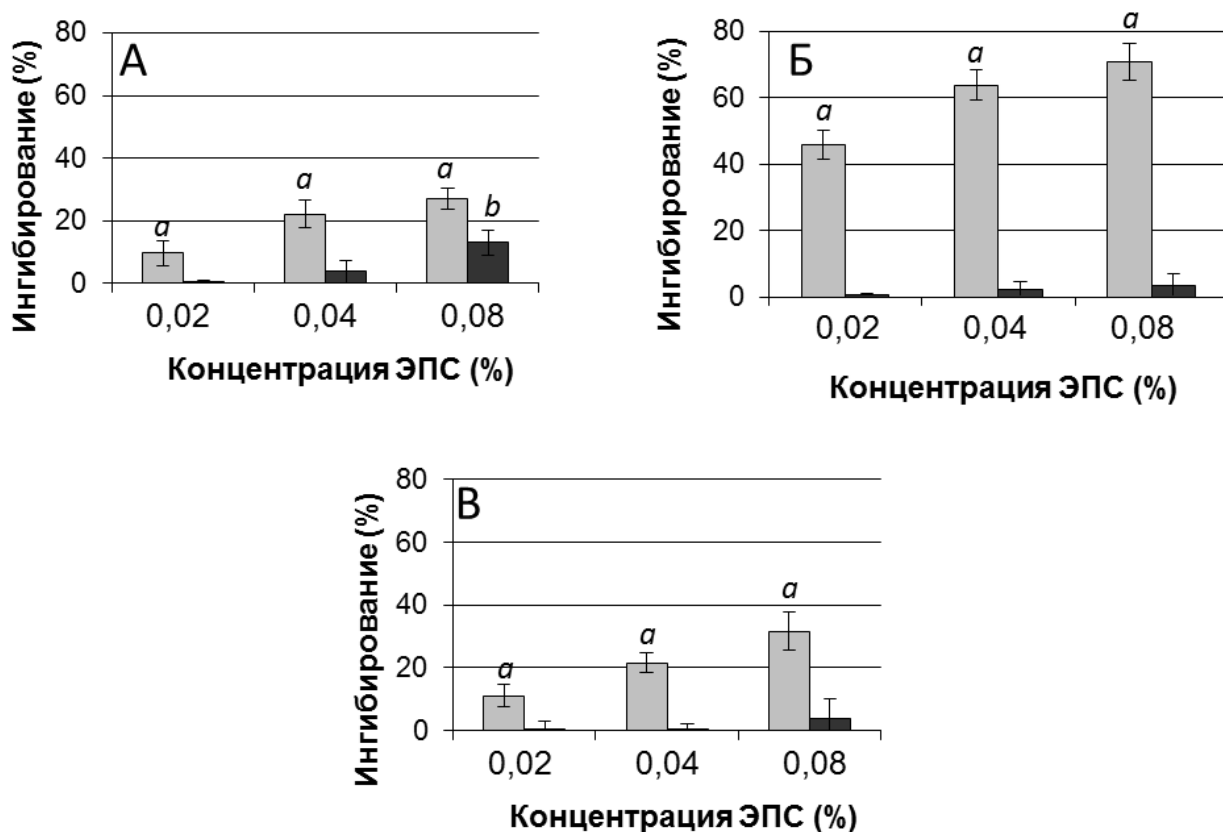


Рис. 19. Антиоксидантные свойства ЭПС *P. atrosepticum*. На диаграммах представлены уровни ингибирования окисления салицилата натрия гидроксил-радикалом (А), окисления пирогаллола супероксид-радикалом (Б), а также перекисного окисления липидов (В) в присутствии ЭПС *P. atrosepticum* (светло-серые столбцы) или деацетилированных ЭПС *P. atrosepticum* (темно-серые столбцы). Эксперименты проведены в пяти повторностях; *a* и *b* указывают на статистически значимые различия (тест Манна-Уитни,  $P < 0,05$ ).

Чтобы проверить, обеспечивает ли способность ЭПС *P. atrosepticum* вызывать детоксикацию АФК повышенную устойчивость клеток пектобактерий к действию окислителей, клетки инкубировали при разных концентрациях перекиси водорода (0, 1, 2 или 4 мМ) в присутствии или в отсутствие ЭПС (или деацетилированных ЭПС). При этом клетки *P. atrosepticum* стационарной фазы роста отмывали и ресуспендировали в безуглеродной среде АВ, а затем в клеточные суспензии добавляли (или не

добавляли) ЭПС и перекись водорода; через 24 ч после этого определяли титр КОЕ.

При 4 мМ перекиси водорода титр КОЕ в суспензиях клеток пектобактерий, не содержащих экзогенно добавленные ЭПС, был ниже детектируемого уровня, а в суспензиях с экзогенно добавленными ЭПС (до 0,05%) составлял  $2 \times 10^3$  КОЕ/мл (Рис. 20). При более низких концентрациях перекиси водорода (1 и 2 мМ) титр КОЕ в суспензиях с экзогенными ЭПС был в 5 и 250 раз, соответственно, больше, чем без экзогенных ЭПС. Деацетилированные ЭПС тоже защищали клетки пектобактерий от действия перекиси водорода; однако титр КОЕ в суспензиях с экзогенными нативными ЭПС был в 7-10 раз больше, чем в суспензиях с экзогенными деацетилированными ЭПС.

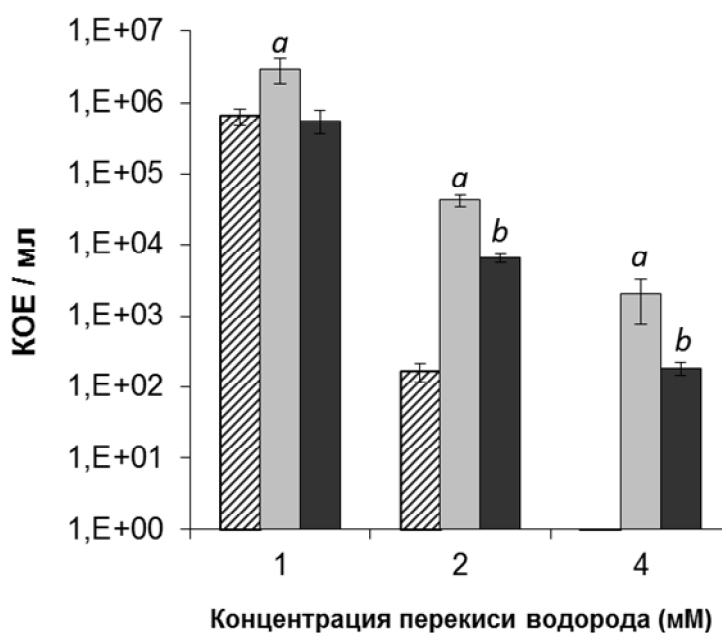


Рис. 20. Влияние ЭПС *P. atrosepticum* на устойчивость клеток *P. atrosepticum* к перекиси водорода. Клетки инкубировали в отсутствие (заштрихованные столбцы) или в присутствии нативных (ацетилированных) ЭПС (светло-серые столбцы) или деацетилированных ЭПС (темно-серые столбцы). Титр КОЕ определяли через 24 ч после внесения перекиси водорода (1, 2 или 4 мМ). Эксперимент проведен в трех биологических повторностях; *a* и *b* указывают на статистически значимые различия (тест Манна-Уитни,  $P < 0,05$ ).

Таким образом, нами выяснено, что ЭПС *P. atrosepticum* обладают выраженными антиоксидантными свойствами и способны защищать клетки пектобактерий от действия окислителей.

### 3.7. Анализ фитоиммунных свойств ЭПС *P. atrosepticum*

Поскольку ряд ЭПС фитопатогенных бактерий обладает фитоиммунными свойствами (см. раздел 1.2.4.3), мы проверили наличие элиситорных и фитоиммуносупрессорных свойств у ЭПС *P. atrosepticum*. При этом мы анализировали способность целевых полимеров активировать либо репрессировать как качественную (эффектор-индуцируемую), так и количественную (ПАМП-индуцируемую) устойчивость. Качественная устойчивость ассоциирована с развитием реакции гиперчувствительности – локальной быстрой гибели клеток в области присутствия элиситора (Jones, Dangl, 2006; Spoel, Dong, 2012). Такую реакцию у растений табака, в частности, вызывают фитопатогенные бактерии *Pseudomonas syringae*.

Для выяснения того, являются ли ЭПС *P. atrosepticum* индукторами или репрессорами качественной устойчивости, листья табака инфильтрировали: 1) стерильным 10 мМ раствором MgSO<sub>4</sub> (контроль); 2) водным 0,05% раствором ЭПС *P. atrosepticum*; 3) клетками *P. syringae*, суспендированными в 10 мМ MgSO<sub>4</sub> (титр ~ 10<sup>8</sup> КОЕ/мл); 4) 0,05% ЭПС *P. atrosepticum* и клетками *P. syringae*. В последнем случае, инфильтрацию раствора ЭПС *P. atrosepticum* проводили за 12 ч до обработки растений клетками *P. syringae*.

В течение 3 суток после обработки растений клетками *P. syringae* в зоне инфильтрации развивалась реакция гиперчувствительности (Рис. 21). Однако такой реакции не было выявлено при инфильтрации раствора ЭПС. Предварительная обработка ЭПС не сдерживала развития реакции гиперчувствительности, вызываемой *P. syringae* (Рис. 21). Таким образом, нами установлено, что ЭПС *P. atrosepticum* не индуцируют и не подавляют качественную устойчивость растений.



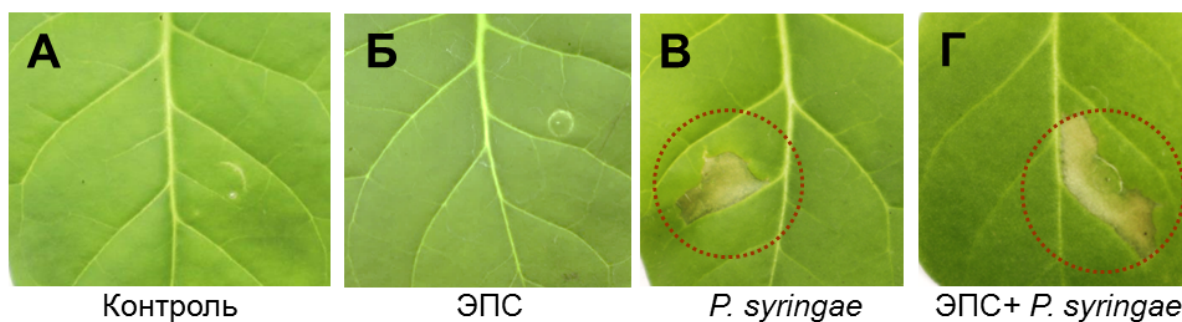


Рис. 21. Влияние ЭПС *P. atrosepticum* на развитие реакции гиперчувствительности у растений табака. Листья табака инфильтрировали 10 мМ MgSO<sub>4</sub> (контроль) (А); 0,05% ЭПС (Б); клетками *Pseudomonas syringae* (В); 0,05% ЭПС и через 12 ч клетками *P. syringae* (Г). Фотографии сделаны через 3 суток после инфильтрации.

Количественная устойчивость индуцируется целым набором консервативных метаболитов микроорганизмов (ПАМП, патоген-ассоциированный молекулярный паттерн), в том числе фрагментами хитина – хитоолигосахаридами. Поскольку ПАМП-индуцируемый иммунный ответ не сопряжен с признаками, которые можно оценить визуально (как реакция гиперчувствительности при качественной устойчивости), но связан с увеличением уровня перекиси водорода и индукцией антиоксидантных систем (включая каталазную активность) (Jones, Dangl, 2006; Zipfel, Robatzek, 2010), мы использовали эти параметры для того, что оценить возможное влияние ЭПС *P. atrosepticum* на этот тип фитоиммунного ответа.

Листья табак инфильтрировали: 1) стерильной водой (контроль); 2) водными растворами ЭПС *P. atrosepticum* (0,02 или 0,05%); 3) водными растворами деацетилированных ЭПС *P. atrosepticum* (0,02 или 0,05%); 4) 1 мкМ хитоолигосахаридов; 5) 0,02 или 0,05 % ЭПС *P. atrosepticum* и затем 1 мкМ хитоолигосахаридов; 6) 0,02 или 0,05 % деацетилированным ЭПС *P. atrosepticum* и затем 1 мкМ хитоолигосахаридов. В последних двух случаях инфильтрацию раствора ЭПС *P. atrosepticum* проводили за 12 ч до обработки растений хитоолигосахаридами.

Инфильтрация ЭПС *P. atrosepticum* в листья табака приводила лишь к незначительному увеличению уровня перекиси водорода (Рис. 22А) и не индуцировала каталазную активность (Рис. 22Б). Деацетилированные ЭПС *P. atrosepticum* тоже не влияли на уровни перекиси водорода и каталазной активности. В свою очередь, инфильтрация хитоолигосахаридов приводила к увеличению содержания перекиси водорода (Рис. 21А) и к индукции каталазной активности (Рис. 22Б). Однако если обработке хитоолигосахаридами предшествовала обработка ЭПС, содержание перекиси водорода увеличивалось в гораздо меньшей степени, чем без предварительной обработки ЭПС (Рис. 22А), а каталазная активность вовсе не индуцировалась по сравнению с контролем, необработанным хитоолигосахаридами (Рис. 22Б). Аналогичный эффект ЭПС мы регистрировали, если они вносились не заблаговременно, а совместно с хитоолигосахаридами (данные не приводятся).

В то же время, если предобработку листьев табака проводили деацетилированными (а не нативными) ЭПС, последующая инфильтрация хитоолигосахаридов приводила к увеличению уровней перекиси водорода и каталазной активности в той же степени как в непредобработанных ЭПС (или предобработанных водой) листьях. Таким образом, нами продемонстрировано, что ЭПС пектобактерий подавляют развитие ПАМП-индуцируемого иммунного ответа (количественной устойчивости) и обеспечивают снижение уровня АФК в инфицированном растении. Ацетильные группы, входящие в состав ЭПС, вносят значительный вклад в фитоиммуносупрессорные свойства этих полимеров.

Фитоиммунные свойства ЭПС разных фитопатогенных бактерий разнообразны. Например, ксантан, продуцируемый *X. campestris*, подавляет развитие реакции гиперчувствительности, индуцируемой медиаторами системы кворум сенсинга, у растений *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana bethamiana* и *Oryza sativa* (Kakkar *et al.*, 2015).

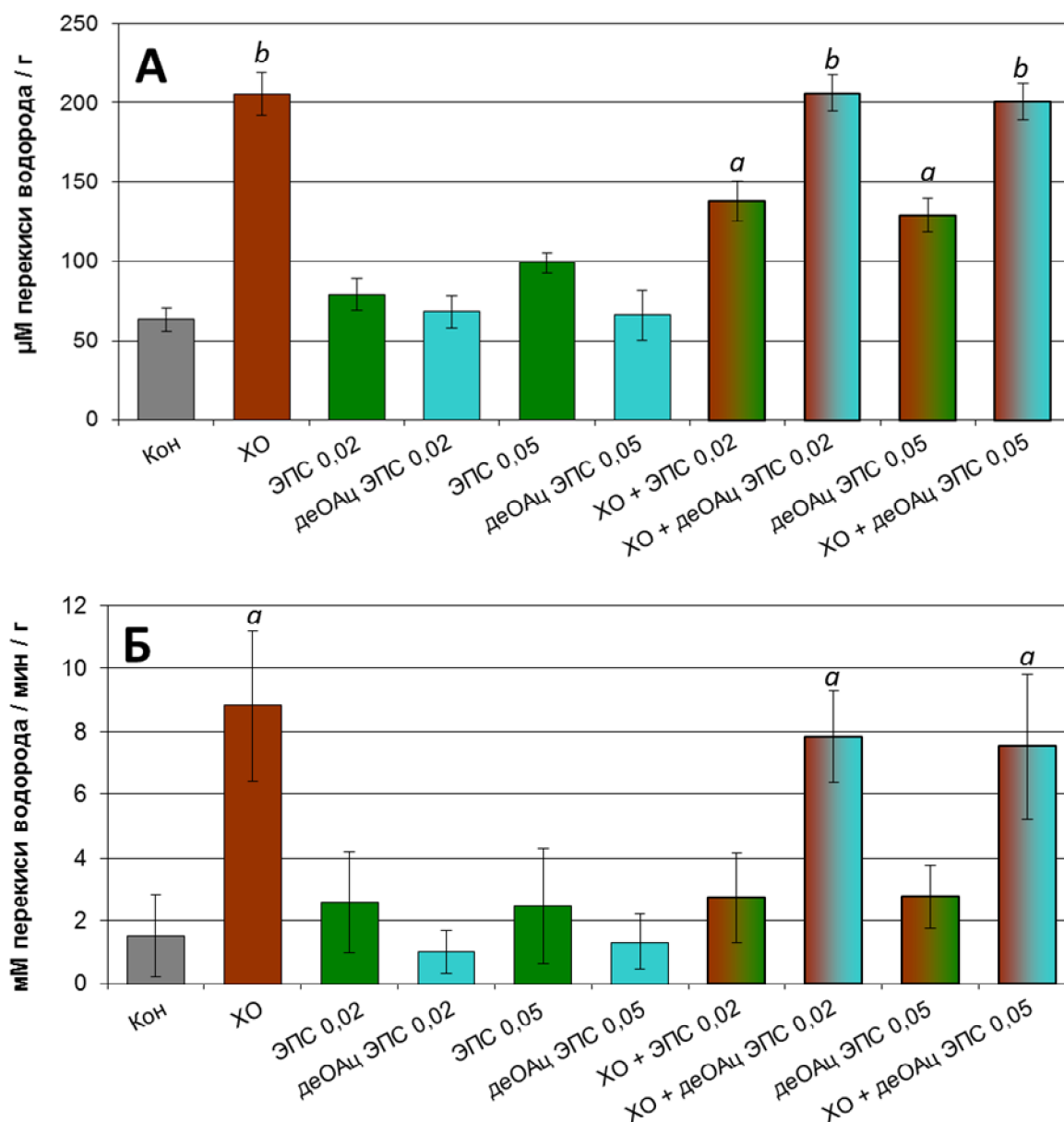


Рис. 22. Влияние ЭПС *P. atrosepticum* на ПАМП-индуцируемый иммунный ответ растений табака. А – содержание  $H_2O_2$ , Б – каталазная активность в листьях табака после инфильтрации воды (контроль, серые столбцы), 1 мкМ хитоолигосахаридов (ХО, коричневые столбцы), 0,02% или 0,05% ЭПС *P. atrosepticum* (ЭПС 0,02 / ЭПС 0,05, зеленые столбцы), 0,02% или 0,05% деацетилированных ЭПС *P. atrosepticum* (деОАц ЭПС 0,02 / деОАц ЭПС 0,05, бирюзовые столбцы), 1 мкМ хитоолигосахаридов и 0,02% или 0,05% ЭПС *P. atrosepticum* (ХО + ЭПС 0,02 / ХО + ЭПС 0,05, коричнево-зеленые столбцы), 1 мкМ хитоолигосахаридов и 0,02% или 0,05% деацетилированных ЭПС *P. atrosepticum* (ХО + деОАц ЭПС 0,02 / ХО + ЭПС

0,05, коричнево-бирюзовые столбцы). Содержание  $H_2O_2$  и каталазную активность определяли через 6 часов после обработки в пяти биологических повторностях и нормализовали на грамм сырого веса. *a* и *b* указывают на статистически значимые различия (тест Манна-Уитни,  $P < 0,05$ ).

Некоторые ЭПС (синтезируемые *P. syringae*, *X. campestris* и *Ralstonia solanacearum*) служат в качестве элиситоров (ПАМП) и индуцируют у растений такие защитные ответы как накопление АФК, синтез фитоалексинов, закрывание устьиц (Romeiro, Kimura, 1997; de Pinto *et al.*, 2003; Milling *et al.*, 2011; Bianco *et al.*, 2016). В нашей работе мы не нашли подтверждения тому, что ЭПС *P. atrosepticum* каким-то образом распознаются защитными системами растений и играют роль элиситоров.

Иммуносупрессорные свойства ЭПС в отношении ПАМП-индуцируемого иммунитета тоже были продемонстрированы ранее на примере фитопатогенных бактерий *X. campestris*, *P. syringae*, *E. amylovora* и *R. solanacearum*; при этом деацетилированная форма ксантана, производимого *X. campestris*, в меньшей степени проявляла фитоиммуносупрессорные свойства, чем нативные полимеры (Aslam *et al.*, 2008). Кроме того, неоднократно продемонстрировано, что мутантные штаммы разных фитопатогенных бактерий, неспособные продуцировать ЭПС, активируют иммунные ответы растений-хозяев значительно сильнее, чем родительские штаммы дикого типа, производящие ЭПС (Bugert, Geider, 1995; Araud-Razou *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 1999; Kemp *et al.*, 2004; Keshavarzi *et al.*, 2004; Yun *et al.*, 2006).

Таким образом, нами продемонстрировано, что помимо выполнения структурообразующих и антиоксидантных функций, ЭПС *P. atrosepticum* способны подавлять развитие иммунного ответа у растений-хозяев. Благодаря всем этим свойствам ЭПС можно рассматривать как фактор вирулентности *P. atrosepticum* и один из ключевых участников взаимодействия пектобактерий и растений.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

Мы предположили, что полимерная сеть в составе вторичного матрикса бактериальных эмболов может состоять из ЭПС, синтезируемых пектобактериями. Это предположение было основано на следующих основных фактах. Во-первых, у сходных с бактериальными эмболами структур – бактериальных биопленок (формируемых другими фитопатогенными бактериями) – внеклеточный матрикс состоит из ЭПС. Во-вторых, у пектобактерий аннотированы гены, кодирующие ферменты биосинтеза ЭПС; причем экспрессия этих генов индуцируется *in planta*.

Для детекции и дальнейшей характеристики целевых полимеров мы подобрали условия *in vitro*, в которых пектобактерии продуцируют ЭПС. Оказалось, что пектобактерии не синтезируют эти полимеры в ростовых условиях, и продукция ЭПС *in vitro* индуцируется при голодании клеток. Затем мы получили чистый препарат ЭПС пектобактерий, расшифровали структуру регулярного звена целевых полимеров и показали, что они действительно входят в состав матрикса бактериальных эмболов. При этом мы продемонстрировали, что бактериальные эмболы могут образовываться не только в неспецифичном для пектобактерий растении-хозяине (табак), но

и в специфичном хозяине (картофель). Причем принцип образования бактериальных эмболов в специфичном и неспецифичном хозяине, по-видимому, сходный, поскольку в инфицированных растениях картофеля, так же как и в инфицированных растениях табака, накапливаются «затравки» для формирования бактериальных эмболов – специфические фрагменты рамногалактуронана I. В состав вторичного матрикса бактериальных эмболов, формируемых в обоих видах растений, входят ЭПС пектобактерий.

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

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

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

## ВЫВОДЫ:

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

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

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

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

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

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



## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Афонин А.Н. Агроэкологический атлас России и сопредельных стран: экономически значимые растения, их вредители, болезни и сорные растения / А.Н. Афонин, С.Л. Грин, Н.И. Дзюбенко, А.Н. Фролов // [Интернет-версия 2.0]. 2008. <http://www.agroatlas.ru>.
2. Горшков, В.Ю. Бактериозы растений: молекулярные основы формирования растительно-микробных патосистем / В.Ю. Горшков // Казань: Изд-во Сергея Бузукина. – 2017. – 304 с.
3. Горшкова, Т.А. Пространственная структура полисахаридов растительных клеточных стенок и ее функциональная значимость / Т.А. Горшкова, Л.В. Козлова, П.В. Микшина // Биохимия. – 2013. – Т. 78. – С. 1068-1088.
4. Горшкова, Т.А. Растительная клеточная стенка как динамичная система. М.: Наука, 2007. 429 с.
5. Захарова, И.Я. Методы изучения микробных полисахаридов / И.Я. Захарова, Л.В. Косенко. – Наукова думка, 1982.- 192 с.
6. Кульшин, В. А. Улучшенный метод выделения липополисахаридов из грамотрицательных бактерий / В.А. Кульшин, А.П. Яковлев, С.Н. Аваева, Б.А. Дмитриев // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 1987. – Т. 5. – С. 44-46.
7. Aalto, M.K. ERD15 – an attenuator of plant ABA responses and stomatal aperture / M.K. Aalto, E. Helenius, T. Kariola, V. Pennanen, P. Heino, H. Horak, I. Puzorjova, H. Kollist, E.T. Palva // Plant Sci. – 2012. – Vol. 182. – P. 19-28.
8. Ackermann, M. A functional perspective on phenotypic heterogeneity in microorganisms / M. Ackermann // Nat. Rev. Microbiol. – 2015. – Vol. 13. – N. 8. – P. 497-508.
9. Adinolfi, M. Analysis of the polysaccharide components of the lipopolysaccharide fraction of *Pseudomonas caryophylli* / M. Adinolfi, M.M. Corsaro, C. De Castro, A. Evidente, R. Lanzetta, L. Mangoni, M. Parrilli // Carbohydr. Res. – 1995a. – Vol. 284. – N.1. – P. 119-133.

10. Adinolfi, M. The relative and absolute configurations of stereocenters in caryophyllose / M. Adinolfi, M.M. Corsaro, C. De Castro, A. Evidente, R. Lanzetta, L. Mangoni, M. Parrilli // *Carbohydr. Res.* – 1995b. – Vol. 274. – P. 223-232.
11. Ageichik, A.V., The role of type III secretion system in *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* virulence / A.V. Ageichik, A.N. Evtushenkov, E.A. Nikolaichik // *Plant Prot. Sci.* – 2002. – Vol. 38. – N. S2. – P. 523-527.
12. Albersheim, P. Plant cell walls / P. Albersheim, A. Darvill, K. Roberts, R. Sederoff, A. Staehelin. – Garland Science. – 2010. -429P.
13. Alfano, J. R. Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense / J.R. Alfano, A. Collmer // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 2004. – Vol. 42. – P. 385-414.
14. Alvarez, A. Activation of shikimate, phenylpropanoid, oxylipins, and auxin pathways in *Pectobacterium carotovorum* elicitors-treated moss / A. Alvarez, M. Montesano, E. Schmelz, I.P. de Leon // *Front Plant Sci.* – 2016. – Vol. 7. – P. 328.
15. Andhare, P. Characterization and rheological behaviour analysis of the succinoglycan produced by *Rhizobium radiobacter* strain CAS from curd sample / P. Andhare, C. Delattre, G. Pierre, P. Michaud, H. Pathak // *Food Hydrocoll.* – 2017. – Vol. 64. – P. 1-8.
16. Andrew, M. Structural features of microbial exopolysaccharides in relation to their antioxidant activity / M. Andrew, G. Jayaraman // *Carbohydr. Res.* – 2020. – Vol. 487. – P. 107881.
17. Ansermet, M. Influence of seed-borne and soil-carried inocula of *Dickeya* spp. on potato plant transpiration and symptom expression / M. Ansermet, S. Schaerer, I. Kellenberger, M. Tallant, B. Dupuis // *Eur. J Plant Pathol.* – 2016. – Vol. 145. – N. 2. – P. 459-467.
18. Antony, A.R. Biofilm instigation of plant pathogenic bacteria and its control measures / A.R. Antony, R. Janani, V.R. Kannan, // *Biofilms in Plant and Soil Health.* – 2017. – Vol. 409.

19. Araud-Razou, I. Detection and visualization of the major acidic exopolysaccharide of *Ralstonia solanacearum* and its role in tomato root infection and vascular colonization / I. Araud-Razou, J. Vasse, H. Montrozier, C. Etchebar, A. Trigalet // Eur. J Plant Pathol. – 1998. – Vol. 104. – N. 8. – P. 795-809.
20. Araújo, D. Assessment of the adhesive properties of the bacterial polysaccharide FucoPol / D. Araújo, V.D. Alves, J. Campos, I. Coelho, C. Sevrin, C. Grandfils, F. Freitas, M.A. Reis // Int. J. Biol. – 2016. – Vol. 92. – P. 383-389.
21. Aslam, S.N. Bacterial polysaccharides suppress induced innate immunity by calcium chelation / S.N. Aslam, M.A. Newman, G. Erbs, K.L. Morrissey, D. Chinchilla, T. Boller, T. Jensen, C. Castro, T. Ierano, A. Molinaro, R. Jackson, M. Knight, R.M. Cooper // Curr. Biol. – 2008. – Vol. 18. – N. 14. – P. 1078-1083.
22. Asselbergh, B. Abscisic acid deficiency leads to rapid activation of tomato defence responses upon infection with *Erwinia chrysanthemi* / B. Asselbergh, A.E. Achuo, M. Hofte, F.V. Gijsegem // Mol. Plant Pathol. – 2008. – Vol. 9. – P. 11-24.
23. Bajaj, I.B. Statistical approach to optimization of fermentative production of gellan gum from *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461 / I.B. Bajaj, P.S. Saudagar, R.S. Singhal, A. Pandey // J. Biosci. Bioeng. – 2006. – Vol. 102. – P. 150-156.
24. Bari, R. Role of plant hormones in plant defence responses / R. Bari, J.D. Jones // Plant Mol. Biol. – 2009. – Vol. 69. – N. 4. – P. 473-488.
25. Barnard, A.M. Quorum sensing in *Erwinia species* / A.M. Barnard, G.P. Salmond // Anal. Bioanal. Chem. – 2007. – Vol. 387. – N. 2. – P. 415-423.
26. Basler, M. Type 6 secretion dynamics within and between bacterial cells / M. Basler, J.J. Mekalanos // Science. – 2012. – Vol. 337. – N. 6096. – P. 815-815.
27. Bauer, D.W. *Erwinia chrysanthemi* Harpin Ech: An Elicitor of the Hypersensitive Response That Contributes to Soft-Rot Pathogenesis / D.W. Bauer, Z.M. Wei, S.V. Beer, A. Collmer // Mol. Plant Microbe Interact. – 1995. – Vol. 8. – P. 484-484.

28. Bazaka, K. Bacterial extracellular polysaccharides / K. Bazaka, R.J. Crawford, E.L. Nazarenko, E.P. Ivanova // Bacterial adhesion. – 2011. – P. 213-226.
29. Becker, A. Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective / A. Becker, F. Katzen, A. Pühler, L. Ielpi // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1998. – Vol. 50. – N. 2. – P. 145-152.
30. Bell, K.S. Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and characterization of virulence factors / K.S. Bell, M. Sebaihia, L. Pritchard, M.T. Holden, L.J. Hyman, M.C. Holeva, N.R. Thomson, S.D. Bentley, L.J. Churcher, K. Mungall, R. Atkin, N. Bason, K. Brooks, T. Chillingworth, K. Clark, J. Doggett, A. Fraser, Z. Hance, H. Hauser, K. Jagels, S. Moule, H. Norbertczak, D. Ormond, C. Price, M.A. Quail, M. Sanders, D. Walker, S. Whitehead, G.P. Salmond, P.R. Birch, J. Parkhill, I.K. Toth // PNAS. – 2004. – Vol. 101. – P. 11105-11110.
31. Bhat, K.A. Current status of post harvest soft rot in vegetables: a review / K.A. Bhat, S.D. Masood, N.A. Bhat, M.A. Bhat, S.M. Razvi, M.R. Mir, A. Sabina, N. Wani, M. Habib// Asian J. Plant Sci. – 2010. – Vol. 9. – N. 4. – P. 200-208.
32. Bhat, K.A. Studies on the effect of temperature on the development of soft rot of cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) caused by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* / K.A. Bhat, S.D. Masoodi, N.A. Bhat, M. Ahmad, M.Y. Zargar, S.A. Mir, M.A. Bhat // J. Phytol. – 2010. – Vol. 2. – N. 2.
33. Bianco, M.I. Xanthan pyruvilation is essential for the virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* / M.I. Bianco, L. Toum, P.M. Yaryura, N. Mielnichuk, G.E. Gudesblat, R. Roeschlin, M.R. Marano, L. Ielpi, A.A. Vojnov // Mol. Plant Microbe Interact. – 2016. – Vol. 29. – N. 9. – P. 688-699.
34. Bissett, D.L. Photoprotective effect of superoxide-scavenging antioxidants against ultraviolet radiation-induced chronic skin damage in the hairless mouse / D.L. Bissett, R. Chatterjee, D.P. Hannon // Photodermatol. Photoimmunol. Photomed. – 1990. – Vol. 7. – N. 2. – P. 56-62.

35. Boehm, A. Second messenger signalling governs *Escherichia coli* biofilm induction upon ribosomal stress / A. Boehm, S. Steiner, F. Zaehring, A. Casanova, F. Hamburger, D. Ritz, W. Keck, M. Ackermann, T. Schirmer, U. Jenal // *Mol. Microbiol.* – 2009. – Vol. 72. – N. 6. – P. 1500-1516.
36. Bolwell, G.P. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system / G.P. Bolwell, L.V. Bindschedler, K.A. Blee, V.S. Butt, D.R. Davies, S.L. Gardner, C. Gerrish, F. Minibayeva // *J. Exp. Bot.* – 2002. – Vol. 53. – N. 372. – P. 1367-1376.
37. Boyd, C.D. Second messenger regulation of biofilm formation: breakthroughs in understanding c-di-GMP effector systems / C.D. Boyd, G.A. O'Toole // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* – 2012. – Vol. 28. – P. 439-462.
38. Brader, G. Jasmonate-dependent induction of indole glucosinolates in *Arabidopsis* by culture filtrates of the nonspecific pathogen *Erwinia carotovora* / G. Brader, E. Tas, E.T. Palva // *Plant Physiol.* – 2001. – Vol. 126. – N. 2. – P. 849-860.
39. Bradshaw-Rouse, J.J. Agglutination of *Erwinia stewartii* strains with a corn agglutinin: correlation with extracellular polysaccharide production and pathogenicity / J.J. Bradshaw-Rouse, M.H. Whatley, D.L. Coplin, A. Woods, L. Sequeira, A. Kelman // *AEM.* – 1981. – Vol. 42. – N. 2. – P. 344-50.
40. Breton, C. Structures and mechanisms of glycosyltransferases / C. Breton, L. Šnajdrová, C. Jeanneau, J. Koča, A. Imberty // *Glycobiology.* – 2006. – Vol. 16. – N. 2. – P. 29R-37R.
41. Bugert, P. Molecular analysis of the *ams* operon required for exopolysaccharide synthesis of *Erwinia amylovora* / P. Bugert, K. Geider // *Mol. Microbiol.* – 1995. – Vol. 15. – N. 5. – P. 917-933.
42. Bukharov, A.V. Structure of the O-specific polysaccharide of *Xanthomonas campestris* NCPPB 45 lipopolysaccharide / A.V. Bukharov, I.M. Skvortsov, V.V. Ignatov, A.S. Shashkov, Y.A. Knirel, J. Dabrowski // *Carbohydr. Res.* – 1993. – Vol. 241. – P. 309-316.

43. Burr, T. Identification of the central quorum sensing regulator of virulence in the enteric phytopathogen, *Erwinia carotovora*: the VirR repressor / T. Burr, A.M. Barnard, M.J. Corbett, C.L. Pemberton, N.J. Simpson, G.P. Salmond // Mol. Microbiol. – 2006. – Vol. 59. – N. 1. – P. 113-125.
44. Burra, D.D. Salicylic and jasmonic acid pathways are necessary for defence against *Dickeya solani* as revealed by a novel method for blackleg disease screening of *in vitro* grown potato / D.D. Burra, P. Muhlenbock, E. Andreasson // Plant Biol (Stuttg). – 2015. – Vol. 17. – P. 1030-1038.
45. Büttner, D. Getting across—bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell / D. Büttner, U. Bonas // The EMBO journal. – 2002. – Vol. 21. – N. 20. – P. 5313-5322.
46. Bylund J. Exopolysaccharides from *Burkholderia cenocepacia* inhibit neutrophil chemotaxis and scavenge reactive oxygen species / J. Bylund, L.A. Burgess, P. Cescutti, R.K. Ernst, D.P. Speert // J. Biol. Chem. – 2006. – Vol. 281. – N. 5. – P. 2526-32.
47. Cai, S. Macromolecular interactions and synergy in xanthan/HPAM aqueous solutions / S. Cai, X. He, K. Liu, A.M. Rodrigues, R. Zhang // RSC advances. – 2017. – Vol. 7. – N. 66. – P. 41630-41639.
48. Caruso, C. Production and biotechnological potential of extracellular polymeric substances from sponge-associated Antarctic bacteria / C. Caruso, C. Rizzo, S. Mangano, A. Poli, P. Di Donato, I. Finore, B. Nicolaus, G. Di Marco, L. Michaud, A. Lo Giudice // AEM. – 2018. – Vol. 84. – N. 4. – P. e01624-17.
49. Casillo, A. Structure-activity relationship of the exopolysaccharide from a psychrophilic bacterium: a strategy for cryoprotection / A. Casillo, E. Parrilli, F. Sannino, D.E. Mitchell, M.I. Gibson, G. Marino, R. Lanzetta, M. Parrilli, S. Cosconati, E. Novellino, A. Randazzo // Carbohydr. Polym. – 2017. – Vol. 156. – P. 364-71.
50. Castiblanco, L.F. New insights on molecular regulation of biofilm formation in plant-associated bacteria / L.F. Castiblanco, G.W. Sundin // J. Integr. Plant Biol. – 2016. – Vol.58. – N. 4. – P. 362-372.

51. Charkowski, A. The role of secretion systems and small molecules in soft-rot Enterobacteriaceae pathogenicity / A. Charkowski, C. Blanco, G. Condemine, D. Expert, T. Franza, C. Hayes, N. Hugouvieux-Cotte-Pattat, E. López Solanilla, D. Low, L. Moleleki, M. Pirhonen, A. Pitman, N. Perna, S. Reverchon, P.R. Palenzuela, M.S. Francisco, I. Toth, S. Tsuyumu, J. van der Waals, J. van der Wolf, F.V. Gijsegem, C. Yang, I. Yedidia // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 2012. – Vol. 50. – P. 425-449.
52. Charkowski, A.O. The soft rot *Erwinia* / A.O. Charkowski // *In Plant-associated bacteria*. Springer, Dordrecht. – 2007. – P. 423-505.
53. Chatterjee, A. Inactivation of *rsmA* leads to overproduction of extracellular pectinases, cellulases, and proteases in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in the absence of the starvation/cell density-sensing signal, N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone / A. Chatterjee, Y. Cui, Y. Liu, C.K. Dumenyo, A.K. Chatterjee // *AEM*. – 1995. – Vol. 61. – N. 5. – P. 1959-1967.
54. Chatterjee, S. Living in two worlds: the plant and insect lifestyles of *Xylella fastidiosa* / S. Chatterjee, R.P.P. Almeida, S. Lindow // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 2008. – Vol. 46. – P. 243-271.
55. Chawla, P.R. Microbial cellulose: fermentative production and applications / P.R. Chawla, I.B. Bajaj, S.A. Survase, R.S. Singhal // *Food Technol. Biotechnol.* – 2009. – Vol. 47. – N. 2. – P. 107-124.
56. Chouly, C. NMR studies of succinoglycan repeating-unit octasaccharides from *Rhizobium meliloti* and *Agrobacterium radiobacter* / C. Chouly, I.J. Colquhoun, A. Jodelet, G. York, G. C. Walker // *Int. J. Biol. Macromol.* – 1995. – Vol. 17. – N. 6. – P. 357-363.
57. Condemine, G. The PecT repressor coregulates synthesis of exopolysaccharides and virulence factors in *Erwinia chrysanthemi* / G. Condemine, A. Castillo, F. Passeri, C. Enard // *Mol. Plant Microbe Interact.* – 1999. – Vol. 12. – N. 1. – P. 45-52.
58. Corbett, M. Identification of a new quorum-sensing-controlled virulence factor in *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* secreted via the type II targeting

- pathway / M. Corbett, S. Virtue, K. Bell, P. Birch, T. Burr, L. Hyman, K. Lilley, S. Poock, I. Toth, G. Salmond // *Mol. Plant Microbe Interact.* – 2005. – Vol. 18. – P. 334–342.
59. Costechareyre, D. Cyt toxin expression reveals an inverse regulation of insect and plant virulence factors of *Dickeya dadantii* / D. Costechareyre, B. Dridi, Y. Rahbé, G. Condemine // *Environ. microbiol.* – 2010. – Vol. 12. – N. 12. – P. 3290-3301.
60. Côté, G.L. Alternan / G.L. Côté // *Biopolymers.* – 2002. – Vol. – 5. – P. 323-350.
61. Coulthurst, S.J. DsbA plays a critical and multifaceted role in the production of secreted virulence factors by the phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* / S.J. Coulthurst, K.S. Lilley, P. E. Hedley, H. Liu, I.K. Toth, G.P. Salmond // *J. Biol. Chem.* – 2008. – Vol. 283. – N. 35. – P. 23739-23753.
62. Crépin, A. Quorum sensing signaling molecules produced by reference and emerging soft-rot bacteria (*Dickeya* and *Pectobacterium* sp. ) / A. Crépin, C. Barbey, A. Beury-Cirou, V. Hélias, L. Taupin, S. Reverchon, W. Nasser, D. Faure, A. Dufour, N. Orange, M. Feuilloley, K. Heurlier, J. Burini, X. Latour // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7. – N. 4. – P. e35176.
63. Cui, Y. Identification of a global repressor gene, *rsmA*, of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* that controls extracellular enzymes, N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone, and pathogenicity in soft-rotting *Erwinia* spp. / Y. Cui, A. Chatterjee, Y. Liu, C.K. Dumenyo, A.K. Chatterjee // *J. Bacteriol.* – 1995. – Vol. 177. – N. 17. – P. 5108-5115.
64. Cuthbertson, L. Pivotal roles of the outer membrane polysaccharide export and polysaccharide copolymerase protein families in export of extracellular polysaccharides in gram-negative bacteria / L. Cuthbertson, I.L. Mainprize, J.H. Naismith, C. Whitfield // *Microbiol Mol Biol Rev.* – 2009. – Vol. 73. – N. 1. – P. 155-177.
65. Czajkowski, R. Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: a review / R. Czajkowski, M.C. Perombelon,



J. A. van Veen, J. M. van der Wolf // Plant Pathol. – 2011. – Vol. 60. – N. 6. – P. 999-1013.

66. Czajkowski, R. Detection, identification and differentiation of *Pectobacterium* and *Dickeya* species causing potato blackleg and tuber soft rot: a review / R. Czajkowski, M.C.M., Pérombelon, S. Jafra, E. Lojkowska, M. Potrykus, J.M. Van Der Wolf, W. Sledz, // Ann. Appl. Biol. – 2015. – Vol. 166. – N. 1. – P. 18-38.

67. Czajkowski, R. Downward vascular translocation of a green fluorescent protein-tagged strain of *Dickeya* sp. (biovar 3) from stem and leaf inoculation sites on potato / R. Czajkowski, W.J. De Boer, J.A. Van Veen, J.M. Van Der Wolf // Phytopathology. – 2010a. – Vol. 100. – N. 11. – P. 1128-1137.

68. Czajkowski, R. Systemic colonization of potato plants by a soilborne, green fluorescent protein-tagged strain of *Dickeya* sp. biovar 3 / Czajkowski, W.J. De Boer, H. Velvis, J.M. Van Der Wolf // Phytopathology. – 2010b. – Vol. 100. – N. 2. – P. 134-142.

69. da Silva, F.R. Fastidious gum: the *Xylella fastidiosa* exopolysaccharide possibly involved in bacterial pathogenicity / F.R. da Silva, A.L. Vettore, E.L. Kemper, A. Leite, P. Arruda // FEMS Microbiol. Lett. – 2001. – Vol. 203. – N. 2. – P. 165-171.

70. Danhorn, T. Biofilm formation by plant-associated bacteria / T. Danhorn, C. Fuqua // Annu. Rev. Microbiol. – 2007. – Vol. 61. – P. 401-422.

71. Davidsson, P.R. Pathogenicity of and plant immunity to soft rot pectobacteria / P.R. Davidsson, T. Kariola, O. Niemi, T. Palva // Front. Plant Sci. – 2013. – Vol. 4. – P. 191.

72. Davies, D.G. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm / D.G. Davies, M.R. Parsek, J.P. Pearson, B.H. Iglewski, J.W. Costerton, E. P. Greenberg // Science. – 1998. – Vol. 280. – N. 5361. – P. 295-298.

73. De La Fuente, L. Assessing adhesion forces of type I and type IV pili of *Xylella fastidiosa* bacteria by use of a microfluidic flow chamber / L. De La

- Fuente, E. Montanes, Y. Meng, Y. Li, T.J. Burr, H.C. Hoch, M. Wu // AEM. – 2007. – Vol. 73. – N. 8. – P. 2690-2696.
74. de Pinto, M.C. Exopolysaccharides produced by plant pathogenic bacteria affect ascorbate metabolism in *Nicotiana tabacum* / M.C. de Pinto, P. Lavermicocca, A. Evidente, M.M. Corsaro, S. Lazzaroni, L. De Gara // Plant Cell Physiol. – 2003. – Vol. – 44. – N. 8. – P. 803-810.
75. de Torres-Zabala, M. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* hijacks the Arabidopsis abscisic acid signalling pathway to cause disease / M. de Torres-Zabala, W. Truman, M.H. Bennett, G. Lafforgue, J.W. Mansfield, P. Rodriguez Egea, L. Bögre, M. Grant // The EMBO journal. – 2007. – Vol. 26. – N. 5. – P. 1434-1443.
76. Dellagi, A. Microbial siderophores exert a subtle role in Arabidopsis during infection by manipulating the immune response and the iron status / A. Dellagi, D. Segond, M. Rigault, M. Fagard, C. Simon, P. Saindrenan, D. Expert // Plant physiology. – 2009. – Vol. 150. – N. 4. – P. 1687-1696.
77. Dellagi, A. Siderophore-mediated upregulation of *Arabidopsis* ferritin expression in response to *Erwinia chrysanthemi* infection / A. Dellagi, M. Rigault, D. Segond, C. Roux, Y. Kraepiel, F. Cellier, J.F. Briat, F. Gaymard, D. Expert // Plant J. – 2005. – Vol. 43. – P. 262-272.
78. Dey, A. The role of prenucleation clusters in surface-induced calcium phosphate crystallization / A. Dey, P.H. Bomans, F.A. Müller, J. Will, P.M. Frederik, G. de With, N.A. Sommerdijk // Nat. Mater. – 2010. – Vol. 9. – N. 12. – P. 1010-1014.
79. Ding, Q. Physicochemical studies of extracellular polysaccharides of *Erwinia chrysanthemi* spp. / Q. Ding, M. LaBelle, B. Y. Yang // Carbohydr. Polym. – 2003. – Vol. 51. – N. 3. – P. 333-346.
80. Dong, T. Role of RpoS in virulence of pathogens / T. Dong, H.E. Schellhorn // Infect. Immun. – 2010. – Vol. 78. – N. 3. – P. 887-897.

81. Donlan, R.M. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms / R.M. Donlan, J.W. Costerton // Clin Microbiol Rev. – 2002. – Vol. 15. – N. 2. – P. 167-193.
82. Du, Q. The role of HD-ZIP III transcription factors and miR165/166 in vascular development and secondary cell wall formation / Q. Du, H. Wang // Plant Signal Behav. – 2015. – Vol. 10. – N. 10. – P. e1078955.
83. Du, Y. The apoplast as battleground for plant–microbe interactions / Y. Du, M. Stegmann, J.C.M. Villamil // New Phytologist. – 2016. – Vol. 209. – N. 1. – P. 34-38.
84. Dubiella, U. Calcium-dependent protein kinase/NADPH oxidase activation circuit is required for rapid defense signal propagation / U. Dubiella, H. Seybold, G. Durian, E. Komander, R. Lassig, C.P. Witte, W.X. Schulze, T. Romeis // PNAS. – 2013. – Vol. 110. – N. 21. – P. 8744-8749.
85. Dubois, M. Colorimetric method for determination of sugars and related substances / M. Dubois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.T. Rebers, F. Smith // Anal. Chem. – 1956. – Vol. 28. – N. 3. – P. 350-356.
86. Dumitriu, S. Polysaccharides: structural diversity and functional versatility Ed. / S. Dumitriu. - CRC press, 2004. -1188P.
87. Edmunds, A.C. Cyclic di-GMP modulates the disease progression of *Erwinia amylovora* / A.C. Edmunds, L.F. Castiblanco, G.W. Sundin, C.M. Waters // J Bacteriol. – 2013. – Vol. 195. – N. 10. – P. 2155-2165.
88. Enard, C. Systemic virulence of *Erwinia chrysanthemi* 3937 requires a functional iron assimilation system / C. Enard, A. Dioloz, D. Expert // J Bacteriol. – 1988. – Vol. 170. – P. 2419-2426.
89. Evans, L.R. Structure of succinoglycan from an infectious strain of *Agrobacterium radiobacter* / L.R. Evans, A. Linker, G. Impallomeni // Int. J. Biol. Macromol. – 2000. – Vol. 27. – N. 5. – P. 319-326.
90. Expert, D. *Dickeya dadantii* pectic enzymes necessary for virulence are also responsible for activation of the *Arabidopsis thaliana* innate immune system / D.

- Expert, O. Patrit, V.E. Shevchik, C. Perino, V. Boucher, C. Creze, E. Wenes, M. Fagard // *Mol Plant Pathol.* – 2018. – Vol. 19. – P. 313-327.
91. Fedonenko, Y.P. Immunochemical characterization of the capsular polysaccharide of *Azospirillum irakense* KBC1 / Y.P. Fedonenko, G.L. Burygin, I.A. Popova, E.N. Sigida, A.K. Surkina, E.L. Zdrovenko, S.A. Konnova // *Curr. Microbiol.* – 2013. – Vol. 67. – N. 2. – P. 234-239.
92. Fedonenko, Y.P. Structure of the O-polysaccharide of the lipopolysaccharide of *Azospirillum irakense* KBC1 / Y.P. Fedonenko, O.N. Konnova, G.V. Zatonsky, A.S. Shashkov, S.A. Konnova, E.L. Zdrovenko, V.V. Ignatov, Y.A. Knirel // *Carbohydr. Res.* – 2004. – Vol. 339. – N. – 10. – P. 1813-1816.
93. Ferreira, F. Structural studies of the extracellular polysaccharide from *Butyrivibrio fibrisolvens* strain CF3 / F. Ferreira, L. Kenne, M.A. Cotta, R.J. Stack // *Carbohydr. Res.* – 1997. – Vol. 301. –N. 3-4. – P. 193-203.
94. Fikowicz-Krosko, J. Systemic colonization and expression of disease symptoms on bittersweet nightshade (*Solanum dulcamara*) infected with a GFP-tagged *Dickeya solani* IPO2222 (IPO2254) / J. Fikowicz-Krosko, R. Czajkowski // *Plant disease.* – 2018. – Vol. 102. – N. 3. – P. 619-627.
95. Flemming, H.C. The biofilm matrix / H.C. Flemming, J. Wingender // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2010. – Vol.8. – N. 9. – P. 623-633.
96. Franklin, M.J. Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* extracellular polysaccharides, alginate, Pel and Psl / M.J. Franklin, D.E. Nivens, J.T. Weadge, P. L. Howell // *Front Microbiol.* – 2011. – Vol. 2. – P. 167.
97. Franklin, M.J. *Pseudomonas aeruginosa* AlgG is a polymer level alginate C5-mannuronan epimerase / M.J. Franklin, C.E. Chitnis, P. Gacesa, A. Sonesson, D.C. White, D.E. Ohman // *J Bacteriol.* – 1994. – Vol. 176. – P. 1821–1830.
98. Franza, T., *Erwinia chrysanthemi* requires a second iron transport route dependent of the siderophore achromobactin for extracellular growth and plant infection / T. Franza, B. Mahe, D. Expert // *Mol Microbiol.* – 2005. – Vol. 55. – P. 261-275.

99. Freitas, F. Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications / F. Freitas, V.D. Alves, M.A. Reis // Trends Biotechnol. – 2011b. – Vol. 29. – N. 8. – P. 388-398.
100. Freitas, F. Emulsifying behaviour and rheological properties of the extracellular polysaccharide produced by *Pseudomonas oleovorans* grown on glycerol byproduct / F. Freitas, V.D. Alves, M. Carvalheira, N. Costa, R. Oliveira, M.A. Reis // Carbohydr. Polym. – 2009. – Vol. 78. – N. 3. – P. 549-556.
101. Freitas, F. Fucose-containing exopolysaccharide produced by the newly isolated *Enterobacter* strain A47 DSM 23139 / F. Freitas, V.D. Alves, C.A. Torres, M. Cruz, I. Sousa, M.J. Melo, A.M. Ramos, M.A. Reis // Carbohydr. Polym. – 2011a. – Vol. – 83. – N. 1. – P. 159-165.
102. Fry, S.C. Fingerprinting of polysaccharides attacked by hydroxyl radicals in vitro and in the cell walls of ripening pear fruit / S.C. Fry, J.C. Dumville, J.G. Miller // Biochem J. – 2001. – Vol. 357. – N. 3. – P. 729-737.
103. Fry, S.C. Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals / S.C. Fry // Biochem J. – 1998. – Vol. 332. – N. 2. – P. 507-515.
104. Ger, M.J. Ectopically expressed sweet pepper ferredoxin PFLP enhances disease resistance to *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* affected by harpin and protease - mediated hypersensitive response in Arabidopsis / M.J. Ger, G.Y. Louh, Y.H. Lin, T.Y. Feng, H.E. Huang // Mol. Plant Pathol. – 2014. – Vol. 15. – N. 9. – P. 892-906.
105. Ghafoor, A. Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture / A. Ghafoor, I.D. Hay, B.H. Rehm // AEM. – 2011. – Vol. 77. – N. 15. – P. 5238-5246.
106. Gidley, M.J. Structure and gelation of *Rhizobium* capsular polysaccharide / M.J. Gidley, I.C. Dea, G. Eggleston, E.R. Morris // Carbohydr. Res. – 1987. – Vol. 160. – P. 381-396.

107. Glucksmann, M.A. Family of glycosyl transferases needed for the synthesis of succinoglycan by *Rhizobium meliloti* / M.A. Glucksmann, T.L. Reuber, G.C. Walker // J. Bacteriol. – 1993. – Vol. – 175. – N. 21. – P. 7033-7044.
108. Gorshkov, V. Dissociation of a population of *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 in tobacco plants: formation of bacterial emboli and dormant cells / V. Gorshkov, A. Daminova, M. Ageeva, O. Petrova, N. Gogoleva, N. Tarasova, Y. Gogolev // Protoplasma. – 2014. – Vol. 251. – N. 3. – P. 499-510.
109. Gorshkov, V. Global gene expression analysis of cross-protected phenotype of *Pectobacterium atrosepticum* / V. Gorshkov, S. Kwenda, O. Petrova, E. Osipova, Y. Gogolev, L.N. Moleleki // PLoS One. – 2017b. – Vol. 12. – N. 1. – P. e0169536.
110. Gorshkov, V. *Pectobacterium atrosepticum* exopolysaccharides: identification, molecular structure, formation under stress and *in planta* conditions / V. Gorshkov, B. Islamov, P. Mikshina, O. Petrova, G. Burygin, E. Sigida, A. Shashkov, A. Daminova, M. Ageeva, B. Idiyatullin, V. Salnikov, Y. Zuev, T. Gorshkova, Y. Gogolev // Glycobiology. – 2017a. – Vol. 27. – N. 11. – P. 1016-1026.
111. Gorshkov, V. The Knockout of Enterobactin-Related Gene in *Pectobacterium atrosepticum* Results in Reduced Stress Resistance and Virulence towards the Primed Plants / V. Gorshkov, O. Parfirova, O. Petrova, N. Gogoleva, E. Kovtunov, V. Vorob'ev, Y. Gogolev // Int. J. Mol. Sci. – 2021b. – Vol.22. – N. 17. – P. 9594.
112. Gorshkov, V. The modification of plant cell wall polysaccharides in potato plants during *Pectobacterium atrosepticum*-caused infection / V. Gorshkov, I. Tsers, B. Islamov, M. Ageeva, N. Gogoleva, P. Mikshina, O. Parfirova, O. Gogoleva, O. Petrova, T. Gorshkova, Y. Gogolev // Plants. – 2021c. – Vol. 10. – N. 7. – P. 1407.
113. Gorshkov, V. 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 / V. Gorshkov, R.

- Gubaev, O. Petrova, A. Daminova, N. Gogoleva, M. Ageeva, O. Parfirova, M. Prokchorchik, Y. Nokolaichik, Y. Gogolev // Eur. J. Plant Pathol. – 2018. – Vol. 152. – N. 4. – P. 957-976.
114. Gorshkov, V.Y. Cell-to-cell communication in the populations of enterobacterium *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* SCRI1043 during adaptation to stress conditions / V.Y. Gorshkov, O.E. Petrova, N.E. Gogoleva, Y.V. Gogolev // FEMS Immunol Med Microbiol. – 2010. – Vol. – 59. – N. 3. – P. 378-385.
115. Gorshkov, V.Y. Differential modulation of the lipoxygenase cascade during typical and latent *Pectobacterium atrosepticum* infections / V.Y. Gorshkov, Y.Y. Toporkova, I.D. Tsers, E.O. Smirnova, A.V. Ogorodnikova, N.E. Gogoleva, O.I. Parfirova, O.E. Petrova, Y.V. Gogolev. // Ann. Bot. – 2021a. – doi.org/10.1093/aob/mcab108
116. Gorshkov, V.Y. Pathogen-induced conditioning of the primary xylem vessels—a prerequisite for the formation of bacterial emboli by *Pectobacterium atrosepticum* / V.Y. Gorshkov, A.G. Daminova, P. V. Mikshina, O.E. Petrova, M.V. Ageeva, V.V. Salnikov, T.A. Gorshkova, Y.V. Gogolev // Plant Biol. – 2016. – Vol. – 18. – N. 4. – P. 609-617.
117. Grenier, A.M. The phytopathogen *Dickeya dadantii* (*Erwinia chrysanthemi* 3937) is a pathogen of the pea aphid / A.M. Grenier, G. Duport, S. Pages, G. Condemine, Y. Rahbé // AEM. – 2006. – Vol. 72. – N. 3. – P. 1956-1965.
118. Gupta, P. Bacterial exopolysaccharide mediated heavy metal removal: a review on biosynthesis, mechanism and remediation strategies / P. Gupta, B. Diwan // Biotechnol. Rep. – 2017. – Vol. 13. – P. 58-71.
119. Habibi, H. Effective variables on production and structure of xanthan gum and its food applications: A review / H. Habibi, K. Khosravi-Darani // Biocatal. Agric. Biotechnol. – 2017. – Vol. 10. – P. 130-140.
120. Haque, M.M. Role of PhoP–PhoQ two-component system in pellicle formation, virulence and survival in harsh environments of *Dickeya dadantii* 3937 / M.M. Haque, H. Hirata, S. Tsuyumu // J. Gen. Plant Pathol. – 2012. – Vol. 78. – N. 3. – P176-189.

121. Haque, M.M. SlyA, a MarR family transcriptional regulator, is essential for virulence in *Dickeya dadantii* 3937 / M.M. Haque, M.S. Kabir, L.Q. Aini, H. Hirata, S. Tsuyumu // J.Bacteriol. – 2009. – Vol. 191. – N. 17. – P. 5409-5418.
122. Hashemi Tameh, M. *Pectobacterium atrosepticum* biosensor for monitoring blackleg and soft rot disease of potato / M. Hashemi Tameh, E. Primiceri, M.S. Chiriaco, P. Poltronieri, M. Bahar, G. Maruccio // Biosensors. – 2020. – Vol. 10. – N. 6. – P. 64.
123. Hay, I.D. Bacterial biosynthesis of alginates / I.D. Hay, Z. Ur Rehman, A. Ghafoor, B.H. Rehm // J. Chem. Technol. Biotechnol. – 2010. – Vol. 85. – N. 6. – P. 752-759.
124. Hay, I.D. Genetics and regulation of bacterial alginate production / I.D. Hay, Y. Wang, M.F. Moradali, Z.U. Rehman, B.H. Rehm // Environ. Microbiol. – 2014. – Vol. 16. – N. 10. – P. 2997-3011.
125. Hayashi, K. Major exopolysaccharide, EPS I, is associated with the feedback loop in the quorum sensing of *Ralstonia solanacearum* strain OE1 - 1 / K. Hayashi, W. Senuma, K. Kai, A. Kiba, K. Ohnishi, Y. Hikichi // Mol. Plant Pathol. – 2019. – Vol. 20. – N. 12. – P. 1740-1747.
126. Hayward, A.C. Latent infections by bacteria / A.C. Hayward // Annu. Rev. Phytopathol. – 1974. – Vol. 12. – N. 1. – P. 87-97.
127. He, S.Y. Type III protein secretion systems in plant and animal pathogenic bacteria / He, S.Y. // Annu. Rev. Phytopathol. – 1998. – Vol. 36. – N. 1. – P. 363-392.
128. Helias, V. Internal colonization pathways of potato plants by *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* / V.H. Helias, D. Andrivon, B. Jouan // Plant Pathol. – 2000. – Vol. 49. – P. 33-42.
129. Hengge, R. Principles of c-di-GMP signalling in bacteria / R. Hengge // Nat. Rev. Microbiol. – 2009. – Vol. 7. – N. 4. – P. 263-273.
130. Henry, E. Recognition of bacterial plant pathogens: local, systemic and transgenerational immunity / E. Henry, K.A. Yadeta, G. Coaker // New Phytol. – 2013. – Vol. 199. – N. 4. – P. 908-915.



131. Herb, M. Functions of ROS in macrophages and antimicrobial immunity / M. Herb, M. Schramm // *Antioxidants*. – 2021. – Vol. – 10. – N. – 2. – P. 313.
132. Herrera, C.M. *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* exhibits surface motility, which is a critical aspect of Stewart's wilt disease development on maize / C.M. Herrera, M.D. Koutsoudis, X. Wang, S.B. Von Bodman // *Mol Plant Microbe Interact*. – 2008. – Vol. 21. – N. 10. – P. 1359-1370.
133. Ho, B.T. *Vibrio cholerae* type 6 secretion system effector trafficking in target bacterial cells / B.T. Ho, Y. Fu, T.G. Dong, J.J. Mekalanos // *PNAS*. – 2017. – Vol. 114. – N. 35. – P. 9427-9432.
134. Hogan, C.S. The type III secreted effector DspE is required early in *Solanum tuberosum* leaf infection by *Pectobacterium carotovorum* to cause cell death, and requires Wx (3–6) D/E motifs / C.S. Hogan, B.M. Mole, S.R. Grant, D.K. Willis, A.O. Charkowski // *PloS one*. – 2013. – Vol. 8. – N. 6. – P. e65534.
135. Holden, V.I., Diverging roles of bacterial siderophores during infection / V.I. Holden, M.A. Bachman // *Metallomics*. – 2015. – Vol. 7. – N. 6. – P. 986-995.
136. Holeva, M.C. Use of a pooled transposon mutation grid to demonstrate roles in disease development for *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* putative type III secreted effector (DspE/A) and helper (HrpN) proteins / M.C. Holeva, K.S. Bell, L.J. Hyman, A.O. Avrova, S.C. Whisson, P. R. Birch, I.K. Toth // *Mol Plant Microbe Interact*. – 2004. – Vol. 17. – N. 9. – P. 943-950.
137. Ionescu, M. Overproduction of exopolysaccharides by an *Escherichia coli* K-12 rpoS mutant in response to osmotic stress / M. Ionescu, S. Belkin // *AEM*. – 2009. – Vol. 75. – N. 2. – P. 483-492.
138. Islam, S.T. Synthesis of bacterial polysaccharides via the Wzx/Wzy-dependent pathway / S.T. Islam, J.S. Lam // *Can. J. Microbiol*. – 2014. – Vol. 60. – N. 11. – P. 697-716.
139. Jahn, C.E. The *Dickeya dadantii* biofilm matrix consists of cellulose nanofibres, and is an emergent property dependent upon the type III secretion system and the cellulose synthesis operon / C.E. Jahn, D.A. Selimi, J.D. Barak, A.O. Charkowski // *Microbiology*. – 2011. – Vol. 157. – N. 10. – P. 2733-2744.

140. Jahn, C.E. The flagellar sigma factor *fliA* is required for *Dickeya dadantii* virulence / C.E. Jahn, D.K. Willis, A.O. Charkowski // *Mol Plant Microbe Interact.* – 2008. – Vol. 21. – N. 11. – P. 1431-1442.
141. Jansson, P.E. Structural studies of the *Rhizobium trifolii* extracellular polysaccharide / P.E. Jansson, B. Lindberg, H. Ljunggren // *Carbohydr. Res.* – 1979. – Vol. – 75. – P. 207-220.
142. Jennings, L.K., Pel is a cationic exopolysaccharide that cross-links extracellular DNA in the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix / L.K. Jennings, K.M. Storek, H.E. Ledvina, C. Coulon, L.S. Marmont, I. Sadovskaya, P.R. Secor, B.S. Tseng, M. Scian, A. Filloux, D.J. Wozniak, P. L. Howell, M.R. Parsek // *PNAS.* – 2015. – Vol. 112. – N. 36. – P. 11353-11358.
143. Jones, J.D. The plant immune system / J.D. Jones, J.L. Dangl // *Nature.* – 2006. – Vol. 444. – N. 7117. – P. 323-329.
144. Jones, S.M. The L-phase of *Erwinia carotovora* var. *atroseptica* and its possible association with plant tissue / S.M. Jones, A.M. Paton // *J. Appl. Microbiol.* – 1973. – Vol. 36. – N. 4. – P. 729-737.
145. Jørgensen, F. RpoS-dependent stress tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* / F. Jørgensen, M. Bally, V. Chapon-Herve, G. Michel, A. Lazdunski, P. Williams, G.S.A.B. Stewart // *Microbiology.* – 1999. – Vol. 145. – N. 4. – P. 835-844.
146. Joshi, J.R. Effects of plant antimicrobial phenolic compounds on virulence of the genus *Pectobacterium* / J.R. Joshi, S. Burdman, A. Lipsky, I. Yedidia // *Res. Microbiol.* – 2015. – Vol. 166. – N. 6. – P. 535-545.
147. Joshi, J.R. Plant phenolic acids affect the virulence of *Pectobacterium aroidearum* and *P. carotovorum* ssp. *brasiliense* via quorum sensing regulation / J.R. Joshi, S. Burdman, A. Lipsky, S. Yariv, I. Yedidia // *Mol Plant Pathol.* – 2016a. – Vol. 17. – P. 487-500.
148. Joshi, J.R. Plant phenolic volatiles inhibit quorum sensing in pectobacteria and reduce their virulence by potential binding to ExpI and ExpR proteins / J.R. Joshi, N. Khazanov, H. Senderowitz, S. Burdman, A. Lipsky, I. Yedidia // *Sci Rep.* – 2016b. – Vol. 6. – P. 38126.

149. Kakkar, A. *Xanthomonas campestris* cell-cell signalling molecule DSF (diffusible signal factor) elicits innate immunity in plants and is suppressed by the exopolysaccharide xanthan / A. Kakkar, N.R. Nizampatnam, A. Kondreddy, B.B. Pradhan, S. Chatterjee // *J. Exp. Bot.* – 2015. – Vol.66. – N.21. – P. 6697-6714.
150. Kariola, T. Early responsive to dehydration 15, a negative regulator of abscisic acid responses in *Arabidopsis* / T. Kariola, G. Brader, E. Helenius, J. Li, P. Heino, E.T. Palva // *Plant Physiol.* – 2006. – Vol. 142. – P. 1559-1573.
151. Karkhanis, Y.D. A new and improved microassay to determine 2-keto-3-deoxyoctonate in lipopolysaccharide of Gram-negative bacteria / Y.D. Karkhanis, J.Y. Zeltner, J.J. Jackson, D.J. Carlo // *Anal. Biochem.* – 1978. – Vol. 85. – N.2. – P. 595-601.
152. Karpinets, T.V. Bacterial stationary-state mutagenesis and mammalian tumorigenesis as stress-induced cellular adaptations and the role of epigenetics / T.V. Karpinets, D.J. Greenwood, I.P. Pogribny, N.F. Samatova // *Current Genomics.* – 2006. – Vol. 7. – N. 8. – P. 481-496.
153. Katzen, F. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum mutants: effects on xanthan biosynthesis and plant virulence / F. Katzen, D.U. Ferreira, C.G. Oddo, M.V. Ielmini, A. Becker, A. Pühler, L. Ielpi // *J. Bacteriol.* – 1998. – Vol. 180. – N. 7. – P. 1607-1617.
154. Kaur, V. Production and characterization of exopolysaccharide produced by *Alcaligenes faecalis* B14 isolated from indigenous soil / V. Kaur, M.B. Bera, P.S. Panesar, H.K. Chopra // *Int. J. biotechnol. bioeng.* – 2013. – Vol. 4. – N. 4. – P. 365-374.
155. Kavitate, D. Physical and functional characterization of succinoglycan exopolysaccharide produced by *Rhizobium radiobacter* CAS from curd sample / D. Kavitate, C. Delattre, P.B. Devi, G. Pierre, P. Michaud, P. H. Shetty, P. Andhare // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2019. – Vol. – 134. – P. 1013-1021.
156. Kazemi-Pour, N. The secretome of the plant pathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi* / N. Kazemi-Pour, G. Condemine, N. Hugouvieux-Cotte-Pattat // *Proteomics.* – 2004. – Vol. 4. – N. 10. – P. 3177-3186.

157. Kemp, B.P. *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* *gumD* gene is essential for EPS production and pathogenicity and enhances epiphytic survival on cassava (*Manihot esculenta*) / B.P. Kemp, J. Horne, A. Bryant, R.M. Cooper // *Physiol. Mol. Plant Pathol.* – 2004. – Vol. 64. – P. 209–218.
158. Keshavarzi, M. Basal defenses induced in pepper by lipopolysaccharides are suppressed by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* / M. Keshavarzi, S. Soylu, I. Brown, U. Bonas, M. Nicole, J. Rossiter, J. Mansfield // *Mol Plant Microbe Interact.* – 2004. – Vol. 17. – P. 805-815.
159. Khan, N. Growth and yield of field crops grown under drought stress condition is influenced by the application of PGPR / N. Khan, A. Bano // *In Field Crops: Sustainable Management by PGPR.* – 2019. – P. 337-349.
160. Khan, N. Water conservation and plant survival strategies of rhizobacteria under drought stress / N. Khan, S. Ali, H. Tariq, S. Latif, H., Yasmin, A. Mehmood, M.A. Shahid // *Agronomy.* – 2020. – Vol. 10. – N.11. – P. 1683.
161. Kieu, N.P. Iron deficiency affects plant defence responses and confers resistance to *Dickeya dadantii* and *Botrytis cinerea* / N.P. Kieu, A. Aznar, D. Segond, M. Rigault, E. Simond-Cote, C. Kunz, M.C. Soulie, D. Expert, A. Dellagi // *Mol Plant Pathol.* – 2012. – Vol. 13. – P. 816-827.
162. Kilcoyne, M. Structural investigation of the O-specific polysaccharides of *Morganella morganii* consisting of two higher sugars / M. Kilcoyne, A.S. Shashkov, A.S. Sofya, Y.A. Knirel, E.V. Vinogradov, J. Radziejewska-Lebrecht, R. Galimska-Stypa, A.V. Savage // *Carbohydr. Res.* – 2002. – Vol. 337. – N. 18. – P. 1697-1702.
163. Kim, D.S. Antioxidant response of Arabidopsis plants to gamma irradiation: genome-wide expression profiling of the ROS scavenging and signal transduction pathways / D.S. Kim, J.B. Kim, E.J. Goh, W.J. Kim, S.H. Kim, Y.W. Seo, C.S. Jang, S.Y. Kang // *J. Plant Physiol.* – 2011. – Vol. 168. – N. 16. – P. 1960-1971.
164. Koczan, J.M. Contribution of *Erwinia amylovora* exopolysaccharides amylovoran and levan to biofilm formation: implications in pathogenicity / J.M.

Koczan, M.J. McGrath, Y. Zhao, G. W. Sundin, // *Phytopathology*. – 2009. – Vol. 99. – N. 11. – P. 1237-1244.

165. Kondakova, A.N. Structure of the O-polysaccharide of *Pseudomonas mandelii* CYar1 containing 3, 6-dideoxy-4-C-[(S)-1-hydroxyethyl]-D-xylo-hexose (yersiniose A) / A.N. Kondakova, M.S. Drutskaya, A.S. Shashkov, S.A. Nedospasov, V.N. Akimov, N.P. Arbatsky, V.F. Galchenko, Y.A. Knirel // *Carbohydr. Res.* – 2013. – Vol. 381. – P. 138-141.

166. Kraemer, D. Mobilization and isotope fractionation of chromium during water-rock interaction in presence of siderophores / D. Kraemer, R. Frei, S. Viehmann, M. Bau // *J. Appl. Geochem.* – 2019. – Vol. 102. – P. 44-54.

167. Kraepiel, Y. Analysis of the plant *bos1* mutant highlights necrosis as an efficient defence mechanism during *D. dadantii/Arabidopsis thaliana* interaction / Y. Kraepiel, J. Pedron, O. Patrit, E. Simond-Côte, V. Hermand, F. Van Gijsegem // *PLoS One*. – 2011. – Vol. 6. – N. 4. – P. e18991.

168. Kröner, A. Quantitative resistance of potato to *Pectobacterium atrosepticum* and *Phytophthora infestans*: integrating PAMP-triggered response and pathogen growth / A. Kröner, G. Hamelin, D. Andrivon, F. Val // *PloS one*. – 2011. – Vol. 6. – N. 8. – P. e23331.

169. Kubheka, G.C. Colonization patterns of an mCherry-tagged *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* strain in potato plants / G.C. Kubheka, T.A. Coutinho, N. Moleleki, L.N. Moleleki // *Phytopathology*. – 2013. – Vol. 103. – N. 12. – P. 1268-1279.

170. Kumar, A. Application of xanthan gum as polysaccharide in tissue engineering: A review / A. Kumar, K.M. Rao, S.S. Han // *Carbohydr. Polym.* – 2018. – Vol. 180. – P. 128-144.

171. Kumar, A.S. Bacterial exopolysaccharides—a perception / A.S. Kumar, K. Mody, B. Jha, // *J. Basic Microbiol.* – 2007. – Vol. 47. – N. 2. – P. 103-117.

172. Lagonenko, L. Impact of salicylic acid on biofilm formation by plant pathogenic bacteria / L. Lagonenko, A. Lagonenko, A. Evtushenkov // *J. Biol. Earth Sci.* – 2013. – Vol. 3. – N. 2. – P. 176-181.

173. Lai, T. Oxidative damage involves in the inhibitory effect of nitric oxide on spore germination of *Penicillium expansum* / T. Lai, B. Li, G. Qin, S. Tian // *Curr. Microbiol.* – 2011. – Vol. 62. – N. 1. – P. 229-234.
174. Lapwood, D. H., The spread of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and subsp. *carotovora* from stem lesions and degenerating seed tubers to progeny tubers in soil / D.H. Lapwood, R.I. Harris // *Potato Res.* – 1982. – Vol. 25. – P. 41-50.
175. Lattner, D. <sup>13</sup>C-NMR study of the interaction of bacterial alginate with bivalent cations / D. Lattner, H.C. Flemming, C. Mayer // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2003. – Vol. 33. – N. 1-3. – P. 81-88.
176. Lee, D.S. *Arabidopsis* GDSL lipase 2 plays a role in pathogen defense via negative regulation of auxin signaling / D.S. Lee, B.K. Kim, S.J. Kwon, H.C. Jin, O.K. Park // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2009. Vol. 379. – P. 1038-1042.
177. Leigh, J.A. Exopolysaccharides in plant-bacterial interactions / J.A. Leigh, D.L. Coplin // *Annu Rev Microbiol.* – 1992. – Vol. 46. – N. 1. – P. 307-46.
178. Li, H. Biosynthetic pathway of sugar nucleotides essential for welan gum production in *Alcaligenes sp.* CGMCC2428 / H. Li, H. Xu, H. Xu, S. Li, P. K. Ouyang // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2010. – Vol. 86. – N. 1. – P. 295-303.
179. Li, P. Cyanobacterial exopolysaccharides: their nature and potential biotechnological applications / P. Li, S.E. Harding, Z. Liu // *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* – 2001. – Vol. 18. – N. 1. – P. 375-404.
180. Liang, Z.X. The expanding roles of c-di-GMP in the biosynthesis of exopolysaccharides and secondary metabolites / Z.X. Liang // *Nat. Prod. Rep.* – 2015. – Vol. 32. – N. 5. – P. 663-683.
181. Lidstrom, M.E. The role of physiological heterogeneity in microbial population behavior / M.E. Lidstrom, M.C. Konopka // *Nature chemical biology.* – 2010. – Vol. 6. – N. 10. – P. 705-712.
182. Lima, M.R. Hydrophobization of cashew gum by acetylation mechanism and amphotericin B encapsulation / M.R. Lima, H.C. Paula, F.O. Abreu, R.B. da Silva,

- F.M. Sombra, R.C. de Paula // Int. J. Biol. Macromol. – 2018. – Vol. 108. – P. 523-530.
183. Limoli, D.H. Bacterial extracellular polysaccharides in biofilm formation and function / D.H. Limoli, C.J. Jones, D.J. Wozniak // Microbiol. Spectr. – 2015. – Vol. 3. – N. 3. – P. 523-530.
184. Liu, H. Quorum sensing coordinates brute force and stealth modes of infection in the plant pathogen *Pectobacterium atrosepticum* / H. Liu, S.J. Coulthurst, L. Pritchard, P. E. Hedley, M. Ravensdale, S. Humphris, T. Burr, G. Takle, M. Brurberg, P. R.J. Birch, G.P. C. Salmond, I.K. Toth, (2008). PLoS pathogens. – 2008. – Vol. 4. – N. 6. – P. e1000093.
185. Liu, S.B. Structure and ecological roles of a novel exopolysaccharide from the Arctic sea ice bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain SM20310 / S.B. Liu, X.L. Chen, H.L. He, X.Y. Zhang, B.B. Xie, Y. Yu, B. Chen, B.C. Zhou, Y.Z. Zhang // AEM. – 2013. – Vol. 79. – N. 1. – P. 224-230.
186. Liu, Y. *kdgR<sub>Ecc</sub>* negatively regulates genes for pectinases, cellulase, protease, Harpin<sub>Ecc</sub>, and a global RNA regulator in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* / Y. Liu, G. Jiang, Y. Cui, A. Mukherjee, W.L. Ma, A.K. Chatterjee // J. Bacteriol. – 1999. – Vol. 181. – N. 8. – P. 2411-2421.
187. Luzzatto, T. Efficient, long-lasting resistance against the soft rot bacterium *Pectobacterium carotovorum* in calla lily provided by the plant activator methyl jasmonate / T. Luzzatto, M. Yishay, A. Lipsky, A. Ion, E. Belausov, I. Yedidia // Plant Pathology. – 2007. – Vol. 56. – N. 4. – P. 692-701.
188. Luzzatto-Knaan, T. Priming of protein expression in the defence response of *Zantedeschia aethiopica* to *Pectobacterium carotovorum* / T. Luzzatto-Knaan, Z. Kerem, A. Doron - Faigenboim, I. Yedidia // Mol. Plant Pathol. – 2014. – Vol. 15. – N. 4. – P. 364-378.
189. Mäe, A. Transgenic plants producing the bacterial pheromone N-acyl-homoserine lactone exhibit enhanced resistance to the bacterial phytopathogen *Erwinia carotovora* / A. Mäe, M. Montesano, V. Koiv, E.T. Palva // Mol Plant Microbe Interact. – 2001. – Vol. 14. – N. 9. – P. 1035-1042.

190. Mahdis H.T. *Pectobacterium atrosepticum* biosensor for monitoring blackleg and soft rot disease of potato / H.T. Mahdis, E. Primiceri, M.S. Chiriaco, P. Poltronieri, M. Bahar, G. Maruccio // Biosensors. – 2020. – Vol. 10. – N. 6. – P. 64.
191. Mansfield, J. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology / J. Mansfield, S. Genin, S. Magori, V. Citovsky, M. Sriariyanum, P. Ronald, M.A.X Dow, V. Verdier, S.V. Beer, M.A. Machado, I.A.N. Toth, G. Salmond, G.D. Foster // Mol. Plant Pathol. – 2012. – Vol. 13. – N. 6. – P. 614-629.
192. Marketon, M.M. Quorum sensing controls exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti* / M.M. Marketon, S.A. Glenn, A. Eberhard, J.E. González // J. Bacteriol. – 2003. – Vol. – 185. – N. 1. – P. 325-331.
193. Marquez-Villavicencio, M.D.P. Soft rot disease severity is affected by potato physiology and *Pectobacterium taxa* / M.D.P. Marquez-Villavicencio, R. L. Groves, A.O. Charkowski // Plant Disease. – 2011. – Vol. 95. – N.3. – P. 232-241.
194. Marty, N. Influence of nutrient media on the chemical composition of the exopolysaccharide from mucoid and non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* / N. Marty, J.L. Dournes, G. Chabanon, H. Montrozier // FEMS Microbiol. Lett. – 1992. – Vol. 98. – N. 1-3. – P. 35-44.
195. Marx, J.G. Production of cryoprotectant extracellular polysaccharide substances (EPS) by the marine psychrophilic bacterium *Colwellia psychrerythraea* strain 34H under extreme conditions / J.G. Marx, S.D. Carpenter, J.W. Deming // Can J Microbiol. – 2009. – Vol. 55. – N. 1. – P. 63–72.
196. Mattinen, L. Host-extract induced changes in the secretome of the plant pathogenic bacterium *Pectobacterium atrosepticum* / L. Mattinen, R. Nissinen, T. Riipi, N. Kalkkinen, M. Pirhonen // Proteomics. – 2007. – Vol. 7. – N. 19. – P. 3527-3537.
197. Mattinen, L. Identification and characterization of Nip, necrosis-inducing virulence protein of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* / L. Mattinen, M. Tshuikina, A. Mäe, M. Pirhonen // Mol Plant Microbe Interact. – 2004. – Vol. 17. – N. 12. – P. 1366-1375.



198. Mattos, K.A. Nitrogen-fixing bacterium *Burkholderia brasiliensis* produces a novel yersiniose A-containing O-polysaccharide / K.A. Mattos, A.R. Todeschini, N. Heise, C. Jones, J.O. Previato, L. Mendonça-Previato // *Glycobiology*. – 2005. – Vol. 15. – N. 3. – P. 313-321.
199. McIntosh, M. Curdlan and other bacterial (1→3)-β-D-glucans / M. McIntosh, B.A. Stone, V.A. Stanisich // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2005. – Vol. 68. – N. 2. – P. 163-173.
200. Meneley, J.C. Establishment of an Inactive Population / J.C. Meneley, M.E. Stanghellini // *Phytopathology*. – 1975. – Vol. 65. – P. 670-673.
201. Menggad, M. Mutations in *ams* genes of *Erwinia amylovora* affect the interactions with host plants / M. Menggad, J. Laurent // *Eur. J. Plant Pathol.* – 1998. – Vol. 104. – N. 3. – P. 313-22.
202. Miguel, E. Evidence against a direct antimicrobial role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the infection of plants by *Erwinia chrysanthemi* / E. Miguel, C. Poza-Carrión, López-E. Solanilla, I. Aguilar, A. Llama-Palacios, F. García-Olmedo, P. Rodríguez-Palenzuela // *Mol Plant Microbe Interact.* – 2000. – Vol. 13. – N. 4. – P. 421-429.
203. Milling, A. *Ralstonia solanacearum* extracellular polysaccharide is a specific elicitor of defense responses in wilt-resistant tomato plants / A. Milling, L. Babujee, C. Allen // *Plos one*. – 2011. – Vol. 6. – N. 1. – P. e15853.
204. Mohd Nadzir, M. Biomedical applications of bacterial exopolysaccharides: A review / M. Mohd Nadzir, R.W. Nurhayati, F.N. Idris, M.H. Nguyen // *Polymers*. – 2021. – Vol. 13. – N. 4. – P. 530.
205. Moleleki, L.N. A quorum sensing - defective mutant of *Pectobacterium carotovorum* ssp. *brasiliense* 1692 is attenuated in virulence and unable to occlude xylem tissue of susceptible potato plant stems / L.N. Moleleki, R.G. Pretorius, C.K. Tanui, G. Mosina, J. Theron // *Mol. Plant Pathol.* – 2017. – Vol. 18. – N. 1. – P. 32-44.
206. Molinaro, A. Structural elucidation of the O-chain of the lipopolysaccharide from *Xanthomonas campestris* strain 8004 / A. Molinaro, A. Silipo, R. Lanzetta,

- M.A. Newman, J.M. Dow, M. Parrilli // Carbohydr. Res. – 2003. – Vol. 338. – N. 3. – P. 277-281.
207. Mongae, A. The use of fluorescent reporter protein tagging to study the interaction between Root-Knot Nematodes and Soft Rot *Enterobacteriaceae* / A. Mongae, G.C. Kubheka, N. Moleleki, L.N. Moleleki // Lett. Appl. Microbiol. – 2013. – Vol. 56. – N. 4. – P. 258-263.
208. Montesano, M. Multiple defence signals induced by *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* elicitors in potato / M. Montesano, G. Brader, I.N.É. Ponce De León, E.T. Palva // Mol. Plant Pathol. – 2005. – Vol. 6. – N. 5. – P. 541-549.
209. Moosavi-Nasab, M. Structural and rheological properties of succinoglycan biogums made from low-quality date syrup or sucrose using *Agrobacterium radiobacter* inoculation / M. Moosavi-Nasab, A.R. Taherian, M. Bakhtiyari, A. Farahnaky, H. Askari // Food Bioproc Tech. – 2012. – Vol. 5. – N. 2. – P. 638-647.
210. Morona, R. Sequence-structure relationships in polysaccharide copolymerase (PCP) proteins / R. Morona, L. Purins, A. Tocilj, A. Matte, M. Cygler // Trends Biochem Sci. – 2009. – Vol. 34. – N. 2. – P. 78-84.
211. Mukherjee, A. Global regulation in *Erwinia species* by *Erwinia carotovora* *rsmA*, a homologue of *Escherichia coli* *csrA*: repression of secondary metabolites, pathogenicity and hypersensitive reaction / A. Mukherjee, Y. Cui, Y. Liu, C.K. Dumenyo, A.K. Chatterjee // Microbiology. – 1996. – Vol. 142. – N. 2. – P. 427-434.
212. Muldoon, J. Structure of an acidic polysaccharide from a marine bacterium *Pseudoalteromonas distincta* KMM 638 containing 5-acetamido-3, 5, 7, 9-tetra-deoxy-7-formamido-L-glycero-L-manno-nonulosonic acid / J. Muldoon, A.S. Shashkov, N.S. Sofya, S.V. Tomshich, N.A. Komandrova, L.A. Romanenko, Y.A. Knirel, A.V. Savage // Carbohydr. Res. – 2001. – Vol. 330. – N. 2. – P. 231-239.
213. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // Physiol. Plant – 1962. – Vol. 15. – N. 3. – P. 473-497.

214. Neu, T.R. Structural studies of an emulsion-stabilizing exopolysaccharide produced by an adhesive, hydrophobic *Rhodococcus* strain / T.R. Neu, T. Dengler, B. Jann, and K. Poralla // *Microbiology*. – 1992. – Vol. 138. – N. 12. – P. 2531-2537.
215. Newman, K.L. Cell-cell signaling controls *Xylella fastidiosa* interactions with both insects and plants / K.L. Newman, R.P. Almeida, A.H. Purcell, S.E. Lindow // *PNAS*. – 2004. – Vol. 101. – N. 6. – P. 1737-1742.
216. Nguyen, P.T. Exopolysaccharide production by lactic acid bacteria: the manipulation of environmental stresses for industrial applications / P.T. Nguyen, T.T. Nguyen, D.C. Bui, P. T. Hong, Q.K. Hoang, H.T. Nguyen // *AIMS microbiology*. – 2020. – Vol. 6. – N. 4. – P. 451.
217. Nichols, C.M. Bacterial exopolysaccharides from extreme marine environments with special consideration of the southern ocean, sea ice, and deep-sea hydrothermal vents: a review / C.M. Nichols, J. Guezennec, J.P. Bowman // *Mar. Biotechnol.* – 2005. – Vol. 7. – N. 4. – P. 253-271.
218. Niknezhad, S.V. Exopolysaccharide production of *Pantoea* sp. BCCS 001 GH: physical characterizations, emulsification, and antioxidant activities / S.V. Niknezhad, G. Najafpour-Darzi, M.H. Morowvat, Y. Ghasemi // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2018. – Vol. 118. – P. 1103-1111.
219. Nimtz, M. Structure of amylovoran, the capsular exopolysaccharide from the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* / M. Nimtz, A. Mort, T. Domke, V. Wray, Y. Zhang, F. Qiu, D. Coplin, K. Geider // *Carbohydr. Res.* – 1996. – Vol. 287. – N. 1. – P. 59-76.
220. Nwodo, U.U. Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects / U.U. Nwodo, E. Green, A.I. Okoh // *Int. J. Mol. Sci.* – 2012. – Vol. 13. – N. 11. – P. 14002-14015.
221. Osman, S.F. Exopolysaccharides of the phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* / S.F. Osman, W.F. Fett, M.L. Fishman // *J. Bacteriol.* – 1986. – Vol. 166. – N. 1. – P. 66-71.

222. O'Toole, G. Biofilm formation as microbial development / G. O'Toole, H.B. Kaplan, R. Kolter // *Annu. Rev. Microbiol.* – 2000. – Vol. 54. – N. 1. – P. 49-79.
223. Palmer, R.J. Developmental biology of biofilms: implications for treatment and control / R.J. Palmer, D.C. White// *Trends Microbiol.* – 1997. – Vol. 5. – N. 11. – P. 435-440.
224. Palva, T.K. Salicylic acid induced resistance to *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in tobacco / T.K. Palva, M. Hurtig, P. Saindrenan, E.T. Palva // *Mol Plant Microbe Interact.* – 1994. – Vol. 7. – P. 356-363.
225. Pemberton, C.L. Novel quorum-sensing-controlled genes in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*: identification of a fungal elicitor homologue in a soft-rotting bacterium / C.L. Pemberton, N.A. Whitehead, M. Sebaihia, K.S. Bell, L.J. Hyman, S.J. Harris, A.J. Matlin, N.D. Robson, P. R.J. Birch, J.P. Carr, I.K. Toth, G.P.C. Salmond // *Mol Plant Microbe Interact.* – 2005. – Vol. 18. – N. 4. – P. 343-353.
226. Peng, J. Preparation of a novel water-soluble gel from *Erwinia amylovora* levan / J. Peng, W. Xu, D. Ni, W. Zhang, T. Zhang, C. Guang, W. Mu // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2019. – Vol. 122. – P. 469-478.
227. Pérez-Mendoza, D. N-Acetylglucosamine-dependent biofilm formation in *Pectobacterium atrosepticum* is cryptic and activated by elevated c-di-GMP levels / D. Pérez-Mendoza, S.J. Coulthurst, J. Sanjuán, G.P. Salmond // *Microbiology.* – 2011. – Vol. 157. – N. 12. – P. 3340-3348.
228. Pérombelon, M.C.M. Potato diseases caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis / M.C.M. Pérombelon // *Plant pathology.* – 2002. – Vol. 51. – N. 1. – P. 1-12.
229. Perombelon, M. Ecology of the soft rot erwinias / M. Perombelon, A. Kelman // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 1980. – V. 18. – P. 361-387.
230. Pérombelon, M.C.M. Studies on the initiation of bacterial soft rot in potato tubers / M.C.M. Pérombelon, R. Lowe // *Potato Res.* – 1975. – Vol. 18. – N. 1. – P. 64-82.

231. Petrova, O. Stress response in *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 under starvation conditions: adaptive reactions at a low population density / O. Petrova, V. Gorshkov, A. Daminova, M. Ageeva, L.N. Moleleki, Y. Gogolev // Res. Microbiol. – 2014. – Vol. 165. – N. 2. – P. 119-127.
232. Piisila, M. The F-box protein MAX2 contributes to resistance to bacterial phytopathogens in *Arabidopsis thaliana* / M. Piisila, M.A. Keceli, G. Brader, L. Jakobson, I. Joesaar, N. Sipari, H. Kollist, E.T. Palva, T. Kariola // BMC Plant Biol. – 2015. – Vol. 15. – P. 53
233. Pirhonen, M. A small diffusible signal molecule is responsible for the global control of virulence and exoenzyme production in the plant pathogen *Erwinia carotovora* / M. Pirhonen, D. Flego, R. Heikinheimo, E.T. Palva // The EMBO journal. – 1993. – Vol. 12. – N. 6. – P. 2467-2476.
234. Plessis, A. New ABA-hypersensitive *Arabidopsis* mutants are affected in loci mediating responses to water deficit and *Dickeya dadantii* infection / A. Plessis, R. Cournol, D. Effroy, V.S. Perez, L. Botran, Y. Kraepiel, A. Frey, B. Sotta, G. Cornic, J. Leung, J. Giraudat, A. Marion-Poll, H.M. North // PLoS One. – 2011. – Vol. 6. – P. e20243.
235. Pollock, T.J. Gellan-related polysaccharides and the genus *Sphingomonas*. / T.J. Pollock // J. Gen. Microbiol. – 1993. – Vol. 139. – P. 1939–1945.
236. Pontier, D. Activation of hsr 203, a plant gene expressed during incompatible plant-pathogen interactions, is correlated with programmed cell death / D. Pontier, M. Tronchet, P. Rogowsky, E. Lam, D. Roby // Mol Plant Microbe Interact. – 1998. – Vol. 11. – N. 6. – P. 544-554.
237. Premjet, S. The effect of ingredients of sugar cane molasses on bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* ATCC 10245 / S. Premjet, D. Premjet, Y. Ohtani // Sen'i Gakkaishi. – 2007. – Vol. 63. – N. – 8. – P. 193-199.
238. Prigent-Combaret, C. The nucleoid-associated protein Fis directly modulates the synthesis of cellulose, an essential component of pellicle–biofilms in the phytopathogenic bacterium *Dickeya dadantii* / C. Prigent-Combaret, O. Zghidi-

- Abouzid, G. Effantin, P. Lejeune, S. Reverchon, W. Nasser // *Mol. Microbiol.* – 2012. – Vol. 86. – N. 1. – P. 172-186.
239. Ramey, B.E. Biofilm formation in plant–microbe associations / B.E. Ramey, M. Koutsoudis, S.B. von Bodman, C. Fuqua // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2004. – Vol. 7. – N. 6. – P. 602-609.
240. Ray, T.C. Structure of the sidechain of lipopolysaccharide from *Erwinia amylovora* T / T.C. Ray, A.R. Smith, R. Wait, R.C. Hignett, // *Eur. J. Biochem.* – 1987. – Vol. 170. – N. 1 - 2. – P. 357-361.
241. Rehm, B.H. Alginate production: precursor biosynthesis, polymerization and secretion. In *Alginates: biology and applications* / B.H. Rehm // Springer, Berlin, Heidelberg. – 2009. -269P.
242. Rehm, B.H. Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications B.H. Rehm // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2010. – Vol. 8. – P. 578–592.
243. Reinhold, B.B. Detailed structural characterization of succinoglycan, the major exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti* Rm1021 / B.B. Reinhold, S.Y. Chan, T.L. Reuber, A. Marra, G.C. Walker, V.N. Reinhold // *J. Bacteriol. Res.* – 1994. – Vol. 176. – N. 7. – P. 1997-2002.
244. Reuber, T.L. The acetyl substituent of succinoglycan is not necessary for alfalfa nodule invasion by *Rhizobium meliloti* Rm1021 / T.L. Reuber, G.C. Walker // *J. Bacteriol.* – 1993. – Vol. 175. – N. 11. – P. 3653-3655.
245. Robert-Seilaniantz, A. Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism / A. Robert-Seilaniantz, M. Grant, J.D. Jones // *Annu Rev Phytopathol.* – 2011. – Vol. 49. – P. 317-343.
246. Robert-Seilaniantz, A. Pathological hormone imbalances / A. Robert-Seilaniantz, L. Navarro, R. Bari, J.D. Jones // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2007. – Vol. 10. – N. 4. –P. 372-379.
247. Rojas, C.M. 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*

- clevelandii* seedlings / C.M. Rojas, J.H. Ham, W.L. Deng, J.J. Doyle, A. Collmer // PNAS. – 2002. – Vol. 99. – N. 20. – P. 13142-13147.
248. Rojas, C.M. Regulation of primary plant metabolism during plant-pathogen interactions and its contribution to plant defense / C.M. Rojas, M. Senthil-Kumar, V. Tzin, K. Mysore // Front. Plant Sci. – 2014. – Vol. 5. – P. 17.
249. Rolfe, B.G. Defective infection and nodulation of clovers by exopolysaccharide mutants of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* / B.G. Rolfe, R.W. Carlson, R.W. Ridge, F.B. Dazzo, P. F. Mateos, C.E. Pankhurst // Funct. Plant Biol. – 1996. – Vol. 23. – N. 3. – P. 285-303.
250. Romeiro, R.S. Induced resistance in pepper leaves infiltrated with purified bacterial elicitors from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* / R.S. Romeiro, O. Kimura // J Phytopath. – 1997. – Vol. 145. – N. 11 - 12. – P. 495-498.
251. Roper, M.C. *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*: lessons learned from a xylem-dwelling pathogen of sweet corn / M.C. Roper // Mol. Plant Pathol. – 2011. – Vol. 12. – N. 7. – P. 628-637.
252. Rossmann, S. Soft rot *Enterobacteriaceae* are carried by a large range of insect species in potato field / S. Rossmann, M.W. Dees, J. Perminow, R. Meadow, M.B. Brurberg // AEM. – 2018. – Vol. 84. – N. 12. – P. e00281-18.
253. Rudolph, K.W. The role of extracellular polysaccharides as virulence factors for phytopathogenic pseudomonads and xanthomonads / K.W. Rudolph, M. Gross, F. Ebrahim-Nesbat, M. Nöllenburg, A. Zomorodian, K. Wydra, M. Neugebauer, U. Hetter, B. El-Shouny, Z. Klement. – In Molecular mechanisms of bacterial virulence, Springer, Dordrecht, 1994. – P. 357-378.
254. Ruffing, A.M. Transcriptome profiling of a curdlan-producing *Agrobacterium* reveals conserved regulatory mechanisms of exopolysaccharide biosynthesis / A.M. Ruffing, R.R. Chen // Microb. Cell Fact. – 2012. – Vol. 11. – N. 1. – P. 1-13.
255. Sanalibaba, P. Exopolysaccharides production by lactic acid bacteria / P. Sanalibaba, G.A. Çakmak // Appl. Microbiol. Open Access. – 2016. – Vol. 2. – N. 2. – P. 1000115.

256. Santander, R.D. Exploring new roles for the *rpoS* gene in the survival and virulence of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* / R.D. Santander, M. Monte-Serrano, J.J. Rodríguez-Herva, E. López-Solanilla, P. Rodríguez-Palenzuela, E.G. Biosca // FEMS Microbiol. Ecol. – 2014. – Vol. 90. – N. 3. – P. 895-907.
257. Sauviac, L. An extracytoplasmic function sigma factor acts as a general stress response regulator in *Sinorhizobium meliloti*. / L. Sauviac, H. Philippe, K. Phok, C. Bruand // J. Bacteriol. – 2007. – Vol. 189. – N. 11. – P. 4204-4216.
258. Schmid, J. Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies / J. Schmid, V. Sieber, B. Rehm // Front Microbiol. – 2015. – Vol.6. – P. 496.
259. Segond, D. NRAMP genes function in *Arabidopsis thaliana* resistance to *Erwinia chrysanthemi* infection / D. Segond, A. Dellagi, V. Lanquar, M. Rigault, O. Patrit, S. Thomine, D. Expert // Plant J. – 2009. – Vol. 58. – P. 195-207.
260. Senchenkova, S.N. Structure of the O-polysaccharide of *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* GSPB 436 / S.N. Senchenkova, Y.A. Knirel, A.S. Shashkov, M. Ahmed, A. Mavridis, K. Rudolph // Carbohydr. Res. – 2003. – Vol. 338. – P. 2025.
261. Senchenkova, S.N. Structure of the O-polysaccharide of *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* GSPB 9205 containing a new higher branched monosaccharide / S.N. Senchenkova, A.S. Shashkov, Y.A. Knirel, M. Ahmed, A. Mavridis, K. Rudolph // Russ. Chem. Bull. – 2005. – Vol. 54. – N. 5. – P. 1276-1281.
262. Shashkov, A.S. Structure of the phenol-soluble polysaccharide from *Shewanella putrefaciens* strain A6/ A.S. Shashkov, V.I. Torgov, E.L. Nazarenko, V.A. Zubkov, N.M. Gorshkova, R.P. Gorshkova, G. Widmalm // Carbohydr. Res. – 2002. – Vol. 337. – N. 12. – P. 1119-1127.
263. Shee, C. Impact of a stress-inducible switch to mutagenic repair of DNA breaks on mutation in *Escherichia coli* / C. Shee, J.L. Gibson, M.C. Darrow, C. Gonzalez, S.M. Rosenberg // PNAS. – 2011. – Vol. 108. – N. 33. – P. 13659-13664.



264. Shibayama, M. Distribution analyses of multi-modal dynamic light scattering data / M. Shibayama, T. Karino, S. Okabe // *Polymer*. – 2006. – Vol. 47. – N. 18. – P. 6446-6456.
265. Siamer, S. Expression of the bacterial type III effector DspA/E in *Saccharomyces cerevisiae* down-regulates the sphingolipid biosynthetic pathway leading to growth arrest / S. Siamer, I. Guillas, M. Shimobayashi, C. Kunz, M.N. Hall, M.A. Barny // *J. Biol. Chem.* – 2014. – Vol. 289. – N. 26. – P. 18466-18477.
266. Smol'kina, O.N. Capsular polysaccharide of the bacterium *Azospirillum lipoferum* Sp59b: structure and antigenic specificity / O.N. Smol'kina, V.V. Kachala, Y.P. Fedonenko, G.L. Burygin, E.L. Zdorovenko, L.Y. Matora, S.A. Konnova, V.V. Ignatov // *Biochemistry (Moscow)*. – 2010. – Vol. 75. – N. 5. – P. 606-613.
267. Snyder, D.S. Structure of a capsular polysaccharide isolated from *Salmonella enteritidis* / D.S. Snyder, D. Gibson, C. Heiss, W. Kay, P. Azadi // *Carbohydr. Res.* – 2006. – Vol. 341. – N. 14. – P. 2388-2397.
268. Spoel, S.H. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells / S.H. Spoel, X. Dong // *Nat. Rev. Immunol.* – 2012. – Vol. 12. – N. 2. – P. 89-100.
269. Sran, K.S. Structural characterization and antioxidant potential of a novel anionic exopolysaccharide produced by marine *Microbacterium aurantiacum* FSW-25 / K.S. Sran, B. Bisht, S. Mayilraj, A.R. Choudhury // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2019. – Vol. 131. – P. 343-352.
270. Srivastava, J.K. Plant-microbe interaction in aquatic system and their role in the management of water quality: a review / J.K. Srivastava, H. Chandra, S.J. Kalra, P. Mishra, H. Khan, P. Yadav // *Appl. Water Sci.* – 2017. – Vol. 7. – N. 3. – P. 1079-1090.
271. Stael, S. Plant innate immunity—sunny side up? / S. Stael, P. Kmiciek, P. Willems, K. Van Der Kelen, N.S. Coll, M. Teige, F. Van Breusegem // *Trends Plant Sci.* – 2015. – Vol. 20. – N. 1. – P. 3-11.

272. Stankowski, J.D. Location of a second O-acetyl group in xanthan gum by the reductive-cleavage method / J.D. Stankowski, B.E. Mueller, S.G. Zeller // Carbohydr. Res. – 1993. – Vol. 241. – P. 321-326.
273. Starr, K.F. Characterization of the *Kingella kingae* polysaccharide capsule and exopolysaccharide / K.F. Starr, E.A. Porsch, C. Heiss, I. Black, P. Azadi, J.W. St. Geme III // PLoS One. – 2013. – Vol. 8. – N. 9. – P. e75409.
274. Survila, M. Peroxidase-generated apoplastic ROS impair cuticle integrity and contribute to DAMP-elicited defenses / M. Survila, P. R. Davidsson, V. Pennanen, T. Kariola, M. Broberg, N. Sipari, P. Heino, E.T. Palva // Front Plant Sci. – 2016. - Vol. 7. – P. 1945.
275. Sutherland, I.W. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework / I.W. Sutherland // Microbiology. – 2001b. – Vol. 147. – N. 1. – P. 3-9.
276. Sutherland, I.W. The biofilm matrix—an immobilized but dynamic microbial environment / I.W. Sutherland // Trends Microbiol. – 2001a. – Vol. 9. – N. 5. – P. 222-227.
277. Tabibloghmany, F.S. An overview of healthy and functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria in the dairy industry / F.S. Tabibloghmany, E. Ehsandoost // European J. Nutr. Food Saf. – 2014. – P. 63-86.
278. Tait, M.I. Effect of growth conditions on the production, composition and viscosity of *Xanthomonas campestris* exopolysaccharide / M.I. Tait, I.W. Sutherland, A.J. Clarke-Sturman // Microbiology. – 1986. – Vol. 132. – N. 6. – P. 1483-1492.
279. Thaler, J.S. Cross-talk between jasmonate and salicylate plant defense pathways: effects on several plant parasites / J.S. Thaler, R. Karban, D.E. Ullman, K. Boege, R.M. Bostock // Oecologia. – 2002. – Vol. 131. – N. 2. – P. 227-235.
280. Tian, L. Impact of the exopolysaccharides Pel and Psl on the initial adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to sand / L. Tian, S. Xu, W.C. Hutchins, C.H. Yang, J. Li // Biofouling. – 2014. – Vol. 30. – N. 2. – P. 213-222.

281. Tischler, A.D., Cyclic diguanylate (c-di-GMP) regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation / A.D. Tischler, A. Camilli // Mol. Microbiol. – 2004. – Vol. 53. – N. 3. – P. 857-869.
282. Torres, L.G. Viscous behaviour of xanthan aqueous solutions from a variant strain of *Xanthomonas campestris* / L.G. Torres, E. Brito, E. Galindo, L. Choplin // J Ferment Bioengineer. – 1993. – Vol. 75. – N. 1. – P. 58-64.
283. Torres, M.A. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens / M.A. Torres, J.D. Jones, J.L. Dangl // Plant Physiol. – 2006. – Vol. 141. – N. 2. – P. 373-378.
284. Toth, I.K. Rotting softly and stealthily / I.K. Toth, P. R. Birch // Curr. Opin. Plant Biol. – 2005. – Vol. 8. – N. 4. – P. 424-429.
285. Tsers, I. Plant soft rot development and regulation from the viewpoint of transcriptomic profiling / I. Tsers, V. Gorshkov, N. Gogoleva, O. Parfirova, O. Petrova, Y. Gogolev // Plants. – 2020. – Vol. 9. – N. 9. – P. 1176.
286. Tsrer, L. Biology, epidemiology and management of *Rhizoctonia solani* on potato / L. Tsrer // J Phytopath. – 2010. – Vol. 158. – N. 10. – P. 649-658.
287. Van Gijsegem, F. Molecular interactions of *Pectobacterium* and *Dickeya* with plants. In Plant Diseases Caused by *Dickeya* and *Pectobacterium* species / F. Van Gijsegem, N. Hugouvieux-Cotte-Pattat, Y. Kraepiel, E. Lojkowska, L.N. Moleleki, V. Gorshkov, I. Yedidia. – Springer Cham., 2021. – P. 85-147.
288. Van Gijsegem, F., Manipulation of ABA content in *Arabidopsis thaliana* modifies sensitivity and oxidative stress response to *Dickeya dadantii* and influences peroxidase activity / F.V. Gijsegem, J. Pedron, O. Patrit, E. Simond-Cote, A. Maia-Grondard, P. Petriacq, R. Gonzalez, L. Blottiere, Y. Kraepiel // Front Plant Sci. – 2017. – Vol. 8. – P. 456.
289. Vanhooren, P.T. Microbial production of clavan, an L-fucose rich exopolysaccharide / P.T. Vanhooren, E.J. Vandamme // In Progress in Biotechnology. – 2000. – Vol. 17. – P. 109-114.

290. Vidal, S. Salicylic acid and the plant pathogen *Erwinia carotovora* induce defense genes via antagonistic pathways / S. Vidal, I.P. de León, J. Denecke, E.T. Palva // *Plant J.* – 1997. – Vol. 11. – P. 115-123.
291. Videira, P. Biochemical characterization of the  $\beta$ -1, 4-glucuronosyltransferase GelK in the gellan gum-producing strain *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461 / P. Videira, A. Fialho, R.A. Geremia, C. Breton, I. SÁ-Correia // *Biochem. J.* – 2001. – Vol. 358. – N. 2. – P. 457-464.
292. Vuong, C. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence / C. Vuong, S. Kocianova, J.M. Voyich, Y. Yao, E.R. Fischer, F.R. DeLeo, M. Otto // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279. – N. 52. – P. 54881-54886.
293. Wang, H. Structure and protective effect of exopolysaccharide from *P. agglomerans* strain KFS-9 against UV radiation / H. Wang, X. Jiang, H. Mu, X. Liang, H. Guan // *Microbiol. Res.* – 2007. – Vol. 162. – P. 124-129.
294. Wang, J. Extremophilic exopolysaccharides: A review and new perspectives on engineering strategies and applications / J. Wang, D.R. Salem, R.K. Sani // *Carbohydr. Polym.* – 2019. – Vol. 205. – P. 8-26.
295. Waters, C.M. Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae* through modulation of cyclic di-GMP levels and repression of *vpsT* / C.M. Waters, W. Lu, J.D. Rabinowitz, B.L. Bassler // *J. Bacteriol. Res.* – 2008. – Vol. 190. – N. 7. – P. 2527-2536.
296. Webb, L.E. Infection of potato tubers with soft rot bacteria / L.E. Webb, R.K.S. Wood // *Ann. Appl. Biol.* – 1974. – Vol. 76. – N. 1. – P. 91-98.
297. Westphal, O. Methods in carbohydrate chemistry / O. Westphal, K. Jann // *Methods carbohydr. chem.* – 1965. – Vol. 5. – P. 83.
298. Whitehead, N.A. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria / N.A. Whitehead, A.M. Barnard, H. Slater, N.J. Simpson, G.P. Salmond // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2001. – Vol. 25. – N. 4. – P. 365-404.
299. Whitney, J.C. Dimeric c-di-GMP is required for post-translational regulation of alginate production in *Pseudomonas aeruginosa* / J.C. Whitney, G.B. Whitfield,

- L.S. Marmont, P. Yip, A.M. Neculai, Y.D. Lobsanov, H. Robinson, D.E. Ohman, P. L. Howell // *J. Biol. Chem.* – 2015. – Vol. 290. – N. 20. – P. 12451-12462.
300. Wilkinson, J.F. The extracellular polysaccharides of bacteria / J.F. Wilkinson // *Bacteriol. Rev.* – 1958. – Vol. 22. – N. 1. – P. 46-73.
301. Winkler, W.C. Regulation of bacterial gene expression by riboswitches / W.C. Winkler, R.R. Breaker // *Annu. Rev. Microbiol.* – 2005. – Vol. 59. – P. 487-517.
302. Wyatt, N.B. Rheology and viscosity scaling of the polyelectrolyte xanthan gum / N.B. Wyatt, M.W. Liberatore // *J. Appl. Polym. Sci.* – 2009. – Vol. 114. – N. 6. – P. 4076-4084.
303. Xu., W. Physicochemical properties of a high molecular weight levan from *Brenneria* sp. EniD312 / W. Xu, Q. Liu, Y. Bai, S. Yu, T. Zhang, B. Jiang, W. Mu // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2018. – Vol 109. – P. 810-818.
304. Yamazaki, M. Linkage of genes essential for synthesis of a polysaccharide capsule in *Sphingomonas* strain S88 / M. Yamazaki, L. Thorne, M. Mikolajczak, R.W. Armentrout, T.J. Pollock // *J. Bacteriol.* – 1996. – Vol. 178. – N. 9. – P. 2676-2687.
305. Yang, B.Y. Extracellular polysaccharides of *Erwinia futeululu*, a bacterium associated with a fungal canker disease of *Eucalyptus* spp. / B.Y. Yang, Q. Ding, R. Montgomery // *Carbohydr. Res.* – 2002. – Vol. 337. – N. 24. – P. 2469-2480.
306. Yang, J. Bicarbonate-mediated transcriptional activation of divergent operons by the virulence regulatory protein, RegA, from *Citrobacter rodentium* / J. Yang, E. Hart, M. Tauschek, G.D. Price, E.L. Hartland, R.A. Strugnell, R.M. Robins-Browne // *Mol. Microbiol.* – 2008. – Vol. 68. – N. 2. – P. 314-327.
307. Yang, S. Global effect of indole-3-acetic acid biosynthesis on multiple virulence factors of *Erwinia chrysanthemi* 3937 / S. Yang, Q. Zhang, J. Guo, A.O. Charkowski, B.R. Glick, M. Ibekwe, D.A. Cooksey, C.H. Yang // *Appl Environ Microbiol.* – 2007. – Vol.73. – P. 1079–1088.

308. Yap, M. The *Erwinia chrysanthemi* type III secretion system is required for multicellular behavior / M. Yap, C.H. Yang, J.D. Barak, C.E. Jahn, & A.O. Charkowski // J. Bacteriol. – 2005. – Vol. 187. – N. 2. – P. 639-648.
309. Yeo, J. *In vivo* biochemistry: single-cell dynamics of cyclic di-GMP in *Escherichia coli* in response to zinc overload / J. Yeo, A.B. Dippel, X.C. Wang, M.C. Hammond // Biochemistry. – 2018. – Vol. 57. – N. 1. – P. 108-116.
310. Yildiz, H. Microbial exopolysaccharides: Resources and bioactive properties / H. Yildiz, N. Karatas, // Process Biochem. – 2018. – Vol. 72. – P. 41-46.
311. Young, D.H. Binding of *Pseudomonas solanacearum* fimbriae to tobacco leaf cell walls and its inhibition by bacterial extracellular polysaccharides / D.H. Young, L. Sequeira // Physiol Mol Plant Path. – 1986. – Vol. 28. – N. 3. – P. 393-402.
312. Yu, J. Involvement of the exopolysaccharide alginate in the virulence and epiphytic fitness of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* / J. Yu, A. Peñaloza-Vázquez, A.M. Chakrabarty, C.L. Bender // Mol. Microbiol. – 1999. – Vol. 33. – P. 712-720.
313. Yun, M.H. Xanthan induces plant susceptibility by suppressing callose deposition / M.H. Yun, P. S. Torres, M. El Oirdi, L.A. Rigano, R. Gonzalez-Lamothe, M.R. Marano A.P. Castagnaro, M.A. Dankert, K. Bouarab, A.A. Vojnov // Plant Physiol. – 2006. – Vol. 141. – P. 178-187.
314. Zainab, N. Deciphering metal toxicity responses of flax (*Linum usitatissimum* L.) with exopolysaccharide and ACC-deaminase producing bacteria in industrially contaminated soils / N. Zainab, B.U. Din, M.T. Javed, M.S. Afridi, T. Mukhtar, M.A. Kamran, A.A. Khan, J. Ali, W.N. Jatoi, M.F.H. Munis, H.J. Chaudhary // Plant Physiol Biochem. – 2020. – Vol. 152. – P. 90-99.
315. Zdrovenko, E.L. Structure of the O-antigen of *Budvicia aquatica* 20186, a new bacterial polysaccharide that contains 3, 6-dideoxy-4-C-[(S)-1-hydroxyethyl]-D-xylo-hexose (yersiniose A) / E.L. Zdrovenko, O.A. Valueva, L.D. Varbanets, A.S. Shashkov, Y.A. Knirel // Carbohydr. Res. – 2012. – Vol. 352. – P. 219-222.

316. Zhan, X.B. Recent advances in curdlan biosynthesis, biotechnological production, and applications / X.B. Zhan, C.C. Lin, H.T. Zhang // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2012. – Vol. 93. – N. 2. – P. 525-531.
317. Zhang, J. Plant immunity triggered by microbial molecular signatures / J. Zhang, J.M. Zhou // *Molecular plant.* – 2010. – Vol. 3. – N. 5. – P. 783-793.
318. Zhou, F. Exopolysaccharides produced by *Rhizobium radiobacter* S10 in whey and their rheological properties / F. Zhou, Z. Wu, C. Chen, J. Han, L. Ai, B. Guo // *Food Hydrocoll.* – 2014. – Vol. 36. – P. 362-368.
319. Zipfel, C. Pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity: veni, vidi...? / C. Zipfel, S. Robatzek // *Plant physiol.* – 2010. – Vol. 154. – N. 2. – P. 551-554.
320. Zubkov, V.A. Synthesis of 3, 6-dideoxy-4-C-(41-hydroxyethyl) hexopyranoses (yersinioses) from 1, 6-anhydro- $\beta$ -D-glucopyranose / V.A. Zubkov, R.P. Gorshkova, Y.S. Ovodov, A.F. Sviridov, A.S. Shashkov // *Carbohydr. Res.* – 1992. – Vol. 225. – N. 2. – P. 189-207.
321. Zurbriggen, M.D. ROS signaling in the hypersensitive response: when, where and what for? / M.D. Zurbriggen, N. Carrillo, M.R. Hajirezaei // *Plant Signal. Behav.* – 2010. – Vol. 5. – N. 4. – P. 393-396.
322. <http://ephytia.inra.fr/en/D/4480>.